

# **Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard, 2000**

# Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard, 2000

<b>in opdracht van</b>	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA
------------------------	---

<b>uitvoering</b>	ing. C.M. Keijzers; ing. D. van Hussen; Dr. J.F. Postma
<b>namens opdrachtgever</b>	de heer J. Oosterbaan

<b>rapportnummer</b>	<b>code opdrachtgever</b>	<b>status</b>
1607		Eindrapport

<b>autorisatie</b>	<b>naam</b>	<b>paraaf</b>	<b>datum</b>
opgemaakt	ing. C.M. Keijzers		14-9-2000
goedgekeurd	Dr. J.F. Postma		14-9-2000



Citeren als: AquaSense (2004). Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard, 2000, - In opdracht van: Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA. AquaSense rapportnummer: 1607.

## AquaSense

Kruislaan 411a  
 Postbus 95125  
 1090 HC Amsterdam  
 telefoon 020-5922244  
 telefax 020-5922249

© AquaSense

Het copyright van deze notitie is uitdrukkelijk voorbehouden aan AquaSense. Niets uit dit rapport mag worden vermenigvuldigd op welke manier dan ook zonder schriftelijke toestemming van AquaSense, noch mag het worden gebruikt voor elk ander doel dan waarvoor het is vervaardigd zonder deze toestemming.

# Inhoud

<b>Inhoud</b>	i
<b>Samenvatting</b>	1
<b>1. Inleiding</b>	3
<b>2. Methoden</b>	5
2.1. Bemonstering en voorbehandeling.....	5
2.2. Fysisch-chemische analyses .....	6
2.3. Bioassays.....	6
2.3.1. Acute test met <i>Vibrio fischeri</i> .....	7
2.3.2. Chronische test met <i>Daphnia magna</i> .....	8
2.3.3. Chronische test met <i>Chironomus riparius</i> .....	10
2.3.4. Kwaliteitstesten testorganismen.....	11
2.4. Bioaccumulatie in oligochaeten .....	11
2.5. TU-analyses .....	14
2.6. Uitwerken van de resultaten en beoordeling .....	15
<b>3. Resultaten en discussie</b>	17
3.1. Fysisch-chemische analyses .....	17
3.1.1. Sedimentkarakterisering.....	17
3.1.2. Sedimentverontreinigingsgraad.....	18
3.2. Bioassays.....	18
3.2.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden.....	18
3.2.2. Resultaten bioassays.....	20
3.2.3. TU-waarden sediment.....	21
3.3. Bioaccumulatie in oligochaeten .....	22
3.4. Beoordeling van de resultaten.....	27
3.4.1. Directe effecten (spoor A).....	27
3.4.2. Indirecte effecten (spoor B).....	28

<b>4. Literatuur</b>	<b>31</b>
<b>5. Bijlagen</b>	<b>33</b>

# Samenvatting

In opdracht van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) heeft AquaSense de toxiciteit van een aantal sedimenten afkomstig van de Gamerense Waard bepaald met chemische en ecotoxicologische analyses.

De lokaties werden op 3 en 4 mei 2000 bemonsterd. De sedimenten werden allereerst onderworpen aan fysisch-chemische analyses om het sediment te karakteriseren en de verontreinigingsgraad te bepalen. Tevens werden met behulp van bioassays de mogelijke effecten van de sedimentmonsters op een drietal organismen bestudeerd, namelijk de lichtgevende bacterie *Vibrio fischeri* (acute Microtox<sup>®</sup> test), de watervlo *Daphnia magna* en de muggenlarve *Chironomus riparius* (chronische testen). Ook zijn bioaccumulatie-experimenten uitgevoerd met oligochaeten om een uitspraak te kunnen doen over de biologische beschikbaarheid en/of eventuele doorvergiftigingsrisico's.

De resultaten van het onderzoek worden samengevat in de onderstaande tabel. Hieruit blijkt dat geen van de sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakten. Voor de microtox en *C. riparius* komt dit overeen met de verwachting op basis van de resultaten van de zogenaamde Toxic-Unit (TU) analyse, waarbij de gehalten van de verontreinigingen in het sediment werden vergeleken met toxiciteitsgegevens van de aanwezige stoffen. Op basis van deze TU-analyse werden voor *D. magna* hier en daar wel lichte effecten verwacht en dan vooral als gevolg van de concentraties aan metalen en PAK's. Een dergelijk verschil is echter niet opzienbarend.

Uit bioaccumulatieproeven met oligochaete wormen bleek dat veel metalen en PCB's verhoogd biologisch beschikbaar waren. De geaccumuleerde gehalten in de wormen van enkele beruchte, persistente verbindingen (cadmium, kwik en PCB) gaven aanleiding om een risico van doorvergiftiging van deze stoffen via ongewervelde dieren naar (water)vogels te veronderstellen.

Samenvattend blijkt uit de resultaten van de beoordeling (tabel 1), dat voor geen van de onderzochte sedimentmonsters ecologische risico's als gevolg van directe effecten werden aangetoond, terwijl voor drie sedimentmonsters ernstige ecologische risico's als gevolg van indirecte effecten werden geconcludeerd (W2N, W4N en O32Z), en bij de beoordeling van O5Z verhoogde indirecte risico's werden gevonden.

**Tabel 1** Resultaten van de uitgevoerde beoordeling c.f. van Elswijk (2000).

Locatie	Directe effecten				Risico's voor doorvergiftiging		
	Effecten op benthos	Effecten in bioassays	Verklaarbaarheid	Actueel risico ?	Risico voor toppredatoren <sup>1)</sup>	Verklaarbaarheid <sup>2)</sup>	Actueel risico ?
W2N	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja
W4N	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja
O5Z	?	-	n.r.	nee	verhoogd	n.r.	nee
O32Z	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja

?: macrofauna analyses worden door het RIZA uitgevoerd

-: geen negatieve effecten geconstateerd

<sup>1)</sup> ernstig risico wanneer bioaccumulatie-niveau's de MTR-waarde meer dan 10x overschrijden; verhoogd risico indien deze MTR-waarde minder dan 10\* wordt overschreden

# 1. Inleiding

In het kader van een meerjarig onderzoek werd de toxiciteit van een aantal sedimenten afkomstig uit de Gamerense Waard bepaald. Om deze sedimenten te kunnen beoordelen, zijn in opdracht van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) bioassays uitgevoerd met de lichtgevende bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*), de watervlo *Daphnia magna* en larven van de dansmug *Chironomus riparius*. De bioassays zijn uitgevoerd conform de TRIADE-richtlijn (Maas *et al.*, 1993). Daarnaast werden bioaccumulatie testen met aquatische oligochaeten uitgevoerd. Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van oligochaeten die, alvorens ze bloot te stellen aan het te testen sediment, gedurende 1 maand zijn gehouden in slib uit het Drontermeer, om zo de concentraties van eventueel aanwezige verontreinigingen te verlagen.

Tevens werd van elk sediment monster de verontreinigingsgraad vastgesteld door het uitvoeren van verschillende chemische analyses.

Naast een overzicht van de gebruikte methoden worden de resultaten van de bioassays weergegeven en kort bediscussieerd.





## 2. Methoden

### 2.1. Bemonstering en voorbehandeling

De lokaties werden op 3 en 4 mei 2000 bemonsterd door Rijkswaterstaat, Directie Oost-Nederland in samenwerking met het RIZA. Per lokatie werd 50 liter sediment verzameld in 5 kunststof emmers met een inhoud van 10 liter. De monsters werden gekoeld opgeslagen bij Rijkswaterstaat. Nadat de monsters verzameld waren, werden de monsters naar AquaSense getransporteerd. Hier werden de monsters direct na binnenkomst geregistreerd en voorzien van een AquaSense monsternummer (Ecolims-nummer). De 5 emmers van ieder monster werden vervolgens bij elkaar gevoegd, mechanisch geroerd en weer over de emmers verdeeld, waarna één monster ten behoeve van chemische analyses werd genomen. Het bovenstaande water werd na 24 uur bezinken verwijderd. Tot het moment van gebruik werden de sedimentmonsters in het donker bij 5°C in een koelcel opgeslagen.

In tabel 2.1 worden de monsterdata en de Ecolimsnummers van de sedimentmonsters weergegeven. Voor een uitgebreide beschrijving van de sedimentmonsters wordt verwezen naar bijlage 3. Het bodemtype van de sedimentmonsters werd gekarakteriseerd op basis van fysisch/chemische analyses (zie tabel 3.1).

Tabel 2.1 Bijzonderheden van de sedimentmonsters.

Locatie	Monster- datum	Ecolims- nummer
W2N	03-05-00	309659
W4N	03-05-00	309660
O5Z	04-05-00	309661
O32Z	04-05-00	309662

In bijlage 3 worden de volgende bijzonderheden van de sedimentmonsters weergegeven:

- Monstercode RWS;
- AquaSense Ecolims-nummer;
- Monsterdatum;
- Type sediment;
- Manier van poriewaterwinning (centrifugeren of uitpersen);
- Poriewateropbrengst;
- Datum waarop de testen zijn ingezet.

## 2.2. Fysisch-chemische analyses

### Chemie bodem

De fysisch-chemische analyses betreffen de gehalten aan droge stof en organische stof (gloeiverlies), de korrelgrootte verdeling (fracties <2, <16, <63 en <210µm) als mede de concentraties van 8 metalen, 16 PAK's (EPA), 7 PCB's, OCB's, minerale olie, EOX, totaal N en P (bijlage 1). Op basis van de analyseresultaten werd de vervuilingsgraad bepaald volgens de Evaluatienota Water (Ministerie van Verkeer en Waterstaat, 1994; bijlage 2).

## 2.3. Bioassays

Volgens de TRIADE-benadering werden chronische bioassays met de muggenlarve *Chironomus riparius* en de watervlo (kreeftachtige) *Daphnia magna* uitgevoerd. De eerste soort betreft een sedimentbewonend (benthisch) organisme, de tweede soort een organisme dat in de waterkolom erboven leeft (pelagisch). Deze soorten worden op twee verschillende manieren blootgesteld: respectievelijk via een sediment/water-systeem en via geïsoleerd (porie)water. Poriewatertesten zijn in het algemeen goed bruikbaar voor het beoordelen van verontreinigde sedimenten omdat in een

evenwichtssituatie de opname van stoffen uit het sediment veelal plaats vindt via de waterfase (Lahr, 1988, geciteerd in Maas *et al.* 1993).

Omdat sedimenten dermate sterk verontreinigd kunnen zijn dat acute toxiciteit kan worden aangetoond, werd conform de TRIADE-benadering ook een (acute) poriewatertest met de luminescerende bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*) uitgevoerd.

De bioaccumulatie van verontreinigingen werd bepaald middels een TRIADE-test met oligochaete wormen (Maas *et al.*, 1993) die eveneens in het sediment leven.

In verband met mogelijke effecten van fysische en chemische parameters als zuurgraad, zuurstofgehalte, geleidbaarheid, nitriet en ammoniumgehalte op de organismen werden vlak voor het inzetten van de testen in het blanco- en het onverdunde testmedium (poriewater of boven het sediment staande water) de volgende fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten:

- Zuurgraad (met pH-meter);
- Zuurstofgehalte (met zuurstofelectrode);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

In de chronische testen (*D. magna* en *C. riparius*) werden deze parameters tenminste ook éénmaal per week gedurende de testen, bij verversen van het medium (*D. magna*) en bij beëindiging van de testen gemeten.

Voor de testen met *V. fischeri*, *D. magna* en *C. riparius* zijn randvoorwaarden gesteld aan deze parameters als kwaliteitsborging. Indien aan deze randvoorwaarden wordt voldaan, worden geen effecten verwacht op de organismen.

Met de resultaten van de chemische analyses werden zogenaamde Toxic Unit (TU) berekeningen uitgevoerd om eventueel waargenomen effecten in de bioassays te verklaren.

Hieronder wordt per bioassay kort de werkwijze beschreven.

### **2.3.1. Acute test met *Vibrio fischeri***

Poriewater werd door middel van centrifugatie uit de voorbehandelde sedimentmonsters gewonnen. Binnen 4 uur na winnen werd met dit poriewater de acute test met de bacterie *Vibrio fischeri* uitgevoerd volgens NVN 6516 (1993) aangevuld met de TRIADE-methodebeschrijving (Maas *et al.*, 1993) en de WSC-notitie (den Besten & Schmidt, 1994).

In de Microtox-test werd met een lichtmeter (Microtox<sup>®</sup>) de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan de 4 volgende concentraties testmedium: 45, 22.5, 11.25 en 5.625 volume%. De test- en incubatietemperatuur

bedroeg 15°C. De analyses werden in duplo uitgevoerd, waarna per blootstellingsduur één gemiddelde EC<sub>20</sub>-waarde en de bijbehorende TI-waarde (Toxiciteits Index) werd bepaald. Deze waarden werden bepaald met behulp van de programmatuur behorende bij het Microtox-teststelsel.

De EC<sub>20</sub>-waarde (Effect Concentratie) is gedefinieerd als de concentratie testmedium, waarbij na een gegeven blootstellingsduur een afname van 20% van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (= verdunningsmedium) kan worden waargenomen. De TI-waarde wordt vervolgens berekend door 100 te delen door deze EC<sub>20</sub>-waarde. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC<sub>20</sub>-waarden, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster aan te geven.

Vlak voor het inzetten van de testen werden in het onverdunde poriewater de volgende fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten:

- Zuurstofgehalte (met gecombineerde zuurstof- en temperatuurelectrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Amoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

### **2.3.2. Chronische test met *Daphnia magna***

De bioassays met *Daphnia magna* zijn uitgevoerd conform de "Methodebeschrijving voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering" (Maas *et al.*, 1993).

Poriewater werd door middel van centrifugeren (slibmonsters) of uitpersen (zandmonsters) gewonnen uit de voorbehandelde sedimentmonsters. Dit poriewater werd gefiltreerd over een 0,45 µm filter en tot gebruik hooguit 1 week gekoeld bewaard, in donkere afgesloten glazen potten. Alle gebruikte glasvezel- en membraanfilters werden voorgespoeld met 1 liter milli-Q water. Het poriewater werd belucht (>75 - 100%) indien het zuurstofgehalte vlak voor gebruik lager was dan 50 % van de verzadigingswaarde. Na belichting werd nogmaals gemeten of aan dit criterium werd voldaan (zie §3.2-overschrijdingen randvoorwaarden voor meer informatie over zuurstofconcentraties tijdens de testen).

Door verdunning met Elendt-medium<sup>1</sup> werden de volgende 4 concentraties poriewater aangemaakt: 10, 32, 56 en 100 volume% poriewater. Per concentratie werden 10 testvatjes gevuld met 30 ml

---

<sup>1</sup> Standaardmedium bestaande uit gedemineraliseerd water waaraan enkele zouten en vitaminen toegevoegd zijn. Dit medium wordt gebruikt bij het kweken van *D. magna*.

testmedium. Als blanco-testmedium werd Elendt-medium gebruikt. In ieder testvatje werd één watervlo (leeftijd < 24 uur) ingezet.

De testduur bedroeg 16 dagen. Gedurende de bioassays werd tweemaal per week het testmedium verversen en werd het aantal geproduceerde jongen geteld en verwijderd. Het tellen en verwijderen van de jongen werd tevens éénmaal per week tussen de beide verversingen uitgevoerd. Dagelijks werd de overleving van de ingezette watervloien gecontroleerd, eventuele reproductie genoteerd en werd gevoerd met een *Scenedesmus*-suspensie.

Als maat voor de reproductiecapaciteit werd uit de "cohort life-table"<sup>2</sup> per poriewaterconcentratie de gemiddelde intrinsieke populatiegroeisnelheid ( $r_m$ ) berekend (Maas *et al.*, 1993). Met name het moment van eerste reproductie (eerste worp) en de aantallen nakomelingen per worp zijn bepalend voor deze parameter. Met een parametrische test (bijv. William's) uit het ToxCalc-pakket (Tidepool, 1995) werd getoetst of de verschillen in de gemiddelde  $r_m$ -waarden per concentratie significant waren ten opzichte van de bij die serie behorende blanco. Indien zelfs na transformatie van de  $r_m$ -waarden niet kon worden voldaan aan de randvoorwaarden voor het mogen uitvoeren van de Williams-test<sup>3</sup>, werd gebruik gemaakt van een verdelingsvrije (niet-parametrische) rang-som-test. Op basis van deze statistische analyse werd de NOECreproductie-waarde bepaald. Bij niet-gelijke replica's werd de "Bonferoni adjusted T-test" gebruikt uit het TOXCALC-pakket (Tidepool, 1995). De NOECsterfte-waarde werd gelijk gesteld aan die testconcentratie waarbij  $\leq 20\%$  sterfte optrad, mits sprake was van een trend in drie opeenvolgende verdunningen van poriewater (Maas *et al.*, 1993). Indien in hetzij de reproductie ( $r_m$ -waarde) hetzij de sterfte geen sprake was van een duidelijke trend in opeenvolgende verdunningen, werd een indicatieve NOEC-waarde vastgesteld aan de hand van de beschikbare informatie over het verloop binnen de geteste concentratiereeks. Tevens werd (indien mogelijk) de poriewater concentratie bepaald die aan het einde van de test 50% sterfte van de watervloien gaf ( $LC_{50}$ ). Indien er voldaan werd aan de ANOVA-criteria werd voor de bepaling van de  $LC_{50}$ -waarde een parametrische methode (bijv. maximum likelihood probit) toegepast. Indien er niet voldaan werd aan de ANOVA-criteria werd een niet-parametrische methode (bijv. de getrimde Spearman-Kärber) toegepast.

Gedurende de testen werden in de blanco en het onverdunde testmedium enkele fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten. Deze parameters werden aan het begin en gedurende de test eenmaal per week (vóór en na verversen) bepaald:

---

<sup>2</sup> Tabel met daarin het aantal nakomelingen per ingezet vrouwtje gedurende de test (Begon *et al.*, 1986).

<sup>3</sup> Voorwaarden voor de uitvoering van deze test zijn: normaal verdeelde waarnemingen en homogeniteit van varianties. Normaliteit en homogeniteit worden met Toxcalc getest met behulp van respectievelijk de Shapiro-Wilk's en de Bartlett's test (Tidepool, 1995).

- Zuurstofgehalte (met gecombineerde zuurstof- en temperatuur-electrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

Indien de randvoorwaarden in de onverdunde poriewatermonsters werden overschreden, werden aanvullende metingen uitgevoerd in het verdunde testmedium.

### 2.3.3. Chronische test met *Chironomus riparius*

De chronische toxiciteitstest met *Chironomus riparius* werd uitgevoerd volgens de "Methodebeschrijving voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering" (Maas *et al.*, 1993).

Voor deze test werd het benodigde sediment gezeefd over een 500 µm zeef. Met dit sediment werd een mengsel aangemaakt bestaande uit 1 volumedeel sediment en 4 volumedelen DSW-medium. Na 24 uur schudden werden 4 testvatjes gevuld met 50 ml van dit mengsel. Van het mengselrestant werd na vijf dagen bezinken het elutriaat gewonnen, waarmee drie testvatjes tot ca. 100 ml werden gevuld. Per testvatje met elutriaat werden *ad random* 2 halve eipakketten (≤ 2 dagen oud) van *Chironomus riparius* ingezet. Na 4 dagen werd beoordeeld of beide eipakkethelften waren uitgekomen (met een nauwkeurigheid van circa 10%) en werden de uitgekomen larven gevoerd met een 2% Trouvit-oplossing. Na 7 dagen werden uit het elutriaat individuen van het 2<sup>e</sup> larvale stadium gehaald. Per testvatje met sediment/DSW-mengsel werden 25 van deze larven ingezet. Drie maal per week werden de testvatjes belucht en werd gevoerd met een 2% Trouvit-oplossing. Na 28 dagen werden de larven voorzichtig over een zeef met een maaswijdte van 250 µm uitgespoeld. Het aantal larven werd geteld en van alle 4<sup>e</sup> stadium (L4) larven tezamen werd vervolgens het drooggewicht bepaald. Hieruit werd het gemiddelde drooggewicht per L4-larf afgeleid.

Als referentie voor de beoordeling van de sedimentmonsters werden sedimenten uit het Veluwemeer (zand) en uit de vaargeul van het Drontermeer (slib) getest.

Met behulp van de ANOVA- en de post-hoc Bonferoni T-test werd getoetst of de waarnemingen voor één van de volgende parameters significant ( $P \leq 0,05$ ) verschilde van de referentie:

- gemiddelde sterfte;
- gemiddelde larvale ontwikkeling;
- gemiddeld drooggewicht van de L4-larven.

Hierbij werd gebruik gemaakt van het SPSS-softwarepakket (Norusis, 1992). Indien niet aan de voorwaarden voor parametrische testen werd

voldaan, werden de gegevens log-getransformeerd. Indien ook na transformatie niet kon worden voldaan aan de randvoorwaarden voor het mogen uitvoeren van parametrische testen, werd gebruik gemaakt van de verdelingsvrije (niet-parametrische) Kruskal-Wallis test. Daarnaast werd een onderscheid gemaakt tussen slibrijke en zandige sedimenten, die elk getoetst zijn ten opzichte van het betreffende referentiesediment. Hierbij werd gebruik gemaakt van de resultaten van de korrelgrootte verdeling.

Gedurende de testen werden enkele fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten in het elutriaat vóór het inzetten van de eipakketten en een week daarna. In het bovenstaande water van het sediment/DSW-mengsel werden deze parameters vóór het inzetten van de larven en daarna éénmaal per week gemeten:

- Zuurstofgehalte (met gecombineerde zuurstof- en temperatuur-electrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter);

### **2.3.4. Kwaliteitstesten testorganismen**

#### ***Vibrio fischeri***

Ter controle van de gevoeligheid van de bacterie *Vibrio fischeri* is een test uitgevoerd met fenol als referentiestof. In deze test werd de fenolconcentratie bepaald waarbij na 5 minuten blootstelling 20 % afname van de bioluminescentie t.o.v. de blanco kon worden waargenomen.

De resultaten van de kwaliteitscontrole zijn weergegeven in bijlage 4. De gevoeligheid van *V. fischeri* voor fenol viel binnen de gestelde acceptatieranges.

#### ***Daphnia magna* en *Chironomus riparius***

De laboratoriumkweken van *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* van AquaSense worden periodiek onderworpen aan een gevoeligheidstest. In deze test wordt de kaliumdichromaatconcentratie bepaald waarbij 50% van de watervlooien na 24 uur immobiel is (24u-EC<sub>50</sub> volgens ISO 6341, 1989), dan wel de concentratie waarbij 50% van de muggenlarven na 96 uur dood is (96u -LC<sub>50</sub> volgens Grootelaar & Mulder, 1991).

De resultaten van de gevoeligheidscontrole van de AquaSense kweken zijn weergegeven in bijlage 4. De gevoeligheid van *D. magna* en *C. riparius* voor kaliumdichromaat viel binnen de gestelde acceptatieranges.

## 2.4. Bioaccumulatie in oligochaeten

De biologische beschikbaarheid van stoffen in het sediment en het doorvergiftigingsrisico werden bepaald aan de hand van bioaccumulatietesten met oligochaeten volgens de TRIADE-benadering.

### *Voorkweek*

De in de bioaccumulatie-experimenten gebruikte oligochaeten waren afkomstig uit de dierenspecialzaak. Deze oligochaeten werden gedurende een periode van 4 weken, voorafgaand aan de eigenlijke experimenten, gehouden in schoon referentiesediment. Hiervoor werd gebruik gemaakt van slib afkomstig uit de vaargeul van het Drontermeer. Met deze voorkweek werd getracht de concentraties van de eventueel reeds in de oligochaeten aanwezige toxicanten te verlagen.

Ten behoeve van de voorkweek werd een bak van circa 1\*0,5m gevuld met een dunne laag slib (2cm). Per bak werd circa 7,5 liter sediment (gezeefd over 500 µm) en circa 20 liter DSW<sup>4</sup> gebruikt, waarna 400 gram (natgewicht) aan oligochaeten werd toegevoegd. Tijdens de voorkweek werden de oligochaeten drie keer per week gevoerd met een 10% aquariaanoplossing (gewicht/volume, in milli Q). Per 20 gram oligochaeten (natgewicht) werd telkens 1 ml voedingsmedium toegevoegd. Eén keer per week werd het waterniveau gecontroleerd en waar nodig aangepast met Milli Q. De bak werd permanent belucht.

De voorkweek werd beëindigd door de inhoud van de bak met behulp van het bovenstaande DSW over een 500 µm zeef te spoelen. De oligochaeten werden vervolgens overgezet in schoon DSW. Hierin verbleven ze gedurende 24 uur, waarin meerdere malen een deel van het DSW werd ververst.

Uit de voorkweek bak werd een monster van de oligochaeten genomen, ten behoeve van chemische analyses. Hiermee werden de toxicantconcentraties in het uitgangsmateriaal vastgelegd.

### *Bioaccumulatie-experiment*

De bioaccumulatie-experimenten met oligochaeten werden uitgevoerd conform Maas *et al.* (1993). Per sediment monster werden twee sediment-watersystemen aangemaakt. Voor elk sediment-watersystemen werd hiertoe 1 liter nat sediment (gezeefd over 500µm) met 4 liter DSW gemengd. De sediment-watersystemen werden gedurende 24 uur geschud bij 20 ± 2°C en vervolgens uitgeschonken in 5 liter aquaria, waarna het sediment bij 20°C kon bezinken. Tijdens het bezinken werd matig belucht.

De experimenten werden uitgevoerd in glazen 5 liter aquaria en per experiment werd 20 gram natgewicht aan oligochaeten ingezet. De

---

<sup>4</sup> Dutch Standard Water (DSW) is gedemineraliseerd water waaraan enkele zouten toegevoegd zijn. DSW-medium wordt volgens TRIADE-richtlijn gebruikt als standaardwater.



experimenten werden in afgedekte aquaria in het donker uitgevoerd bij een temperatuur van  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . De aquaria werden permanent belucht. De verdampende hoeveelheid water werd twee maal per week met milli-Q water aangevuld. De oligochaeten zijn gedurende het experiment 3 keer per week gevoerd, waarbij per bak 1 ml van een 10% (m/v) Aquariaan oplossing werd toegevoegd.

Gedurende de testen werden wekelijks naast de zuurgraad, de temperatuur en het zuurstofgehalte ook het nitriet- en ammoniumgehalte (met behulp van Merck-testkits) en de geleidbaarheid (met behulp van een geleidbaarheidsmeter) (semi)-kwantitatief gemeten in een speciaal daartoe genomen watermonster.

Aan het einde van de test werd de inhoud van de testsystemen met behulp van kraanwater over een  $300 \mu\text{m}$  zeef gespoeld (dit werd waar nodig enkele malen herhaald). De oligochaeten werden vervolgens op een  $250 \mu\text{m}$  zeef gebracht, die was ondergedompeld in bovenstaand water afkomstig van het sediment-watersysteem. Dit systeem bleef gedurende 24 uur staan, tijdens welke de oligochaeten door de zeef kruipen en de sediment resten op de zeef achterblijven. Het water werd hierbij belucht om sterfte van de oligochaeten te voorkomen. Tenslotte werden de aldus verkregen oligochaeten op een in DSW ondergedompelde  $200 \mu\text{m}$  zeef overgebracht, waarbij de laatste restanten sediment en faeces verwijderd konden worden. Van de aldus verzamelde oligochaeten werd vervolgens het natgewicht bepaald.

Voor de chemische analyses werd het oligochaeten materiaal verdeeld over een glazen en een kunststof potje. Het oligochaetenmateriaal verzameld uit de twee sediment-watersystemen die per sedimentmonster waren aangemaakt werd hiertoe gepoold. De ingevroren oligochaeten monsters werden vervolgens aan OMEGAM gestuurd voor analyse. Om een uitspraak te kunnen doen over de biologische beschikbaarheid zijn dezelfde verontreinigingen gemeten als in het sediment (zie § 2.2). Tevens werden het vetgehalte en het drooggewicht bepaald.

Met de resultaten van de chemische analyses wordt de toe- of afname van de stofgehalten ten opzichte van de blanco berekend. De gehalten van verontreinigingen in het uitgangsmateriaal (blanco,  $t=0$ ) zijn soms hoger dan na blootstelling aan de sedimentmonsters. Dit betekent dat de oligochaeten (een deel) van de stoffen zijn kwijt geraakt en/of dat de stoffen verdund zijn in de organismen. Dit kan bijvoorbeeld doordat de opgenomen hoeveelheid per organisme gelijk is gebleven, maar het drooggewicht (in geval van metalen) of het vetgehalte (in geval van de overige stoffen) is toegenomen. Dit proces wordt ook wel groeiverdunning genoemd. Voor deze stoffen is het zeer lastig om uitspraken te doen over de biologische beschikbaarheid en/of eventuele doorvergiftigingsrisico's. Daarom is verder alleen een beoordeling opgesteld voor de stoffen waarvoor een duidelijke toename in gehalte ( $\geq 30\%$ ) ten opzichte van de uitgangssituatie is waargenomen.

Voor de beoordeling van de biologische beschikbaarheid van stoffen op basis van de resultaten van bioaccumulatie testen is gebruik gemaakt van de volgende criteria (den Besten, 1997):

Criteria:	beoordeling biologische beschikbaarheid:
$G/V < 1$	niet verhoogd
$1 \leq G/V < 10$	verhoogd
$G/V \geq 10$	sterk verhoogd

waarbij:

G = Gemeten biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF);

V = Voorspelde BSAF op basis van de evenwicht-partitie theorie<sup>5</sup> (zie ook den Besten, 1996).

## 2.5. TU-analyses

Om vast te kunnen stellen welke in het sediment gemeten contaminanten een mogelijke rol bij het tot stand komen van eventueel waargenomen negatieve effecten speelden of om het verwachte effect te schatten, werd gebruik gemaakt van de resultaten van de op het sediment uitgevoerde chemische analyses en van toxiciteitsgegevens van het RIZA (den Besten, 1997 + enkele recente nog niet gepubliceerde data).

De berekeningen zijn uitgevoerd volgens het Toxic Unit (TU)-concept, om zo de totale toxiciteit van groepen verontreinigingen in de sedimentmonsters in te kunnen schatten. De Toxic Units zijn op basis van de chemische analyses uit bijlage 1 berekend ( $TU_{\text{chemie}}$ ). De  $TU_{\text{chemie}}$ -waarde wordt berekend door de voor standaardbodem gecorrigeerde concentratie van een bepaalde verbinding te delen door de bijbehorende NOEC-waarde. Bij deze standaardisatie wordt niet gebruik gemaakt van de zogenaamde afkapgrenzen<sup>6</sup>. Door van individuele chemische verbindingen met eenzelfde werkingsmechanisme de bijbehorende  $TU_{\text{chemie}}$ -waarden voor één specifiek testorganisme op te tellen, wordt een gesommeerde TU-waarde voor deze stoffen in het sedimentmonster verkregen. Indien deze waarde groter is dan 1, bestaat er een matige kans op het waarnemen van effecten. Indien deze waarde groter is dan 3 is deze kans groot.

<sup>5</sup> **Evenwicht-partitie:** Met behulp van bestaande, relatief eenvoudige formules is het mogelijk om in geval van een evenwichtssituatie een schatting te maken van de verhouding tussen de hoeveelheid toxicant die gebonden is aan de waterbodem, opgelost is in het (porie)water en in het testorganisme aanwezig (gebioaccumuleerd) is.

<sup>6</sup> Binnen WABOOS wordt gestandaardiseerd op basis van het org. stof gehalte en het lutumgehalte. Als het org. stof gehalte <2% of >30% wordt echter met deze grenswaarden gerekend. Hetzelfde geldt voor een lutumgehalte <3%. Deze afkapgrenzen zijn niet gebruikt voor de TU-berekening.

## 2.6. Uitwerken van de resultaten en beoordeling

Tot nu toe werden de resultaten van het onderzoek gerapporteerd conform de TRIADE-benadering (Maas *et al.*, 1993). Hierbij worden fysisch-chemische parameters en biologische effectparameters (bioassays en veldinventarisatie) gecombineerd om de risico's van de waterbodemonverontreiniging voor het milieu te beoordelen. Hiervoor zijn in de TRIADE-richtlijn criteria geformuleerd waarmee op basis van iedere afzonderlijke parameter een sedimentmonster kan worden ingedeeld in één van de drie volgende klassen:

Klasse	Overschrijding criterium	Interpretatie (chemisch resp. biologisch)
-	geen overschrijding	niet tot weinig verontreinigd / geen tot gering effect
±	overschrijding criterium 1	matig verontreinigd / matig effect
+	overschrijding criterium 2	ernstig verontreinigd / ernstig effect

Recent is echter ook een concept voor een nieuwe "Richtlijn Nader Onderzoek" gereed gekomen. De in deze richtlijn voorgestelde beoordeling verschilt enigszins van de tot nu toe gehanteerde werkwijze. Deze verschillen zijn niet zozeer in de beoordelingscriteria van de testresultaten gelegen (zie Maas *et al.*, 1993), maar meer in de manier waarop deze gepresenteerd worden. Eén van de punten is bijvoorbeeld dat een duidelijk onderscheid wordt aangebracht tussen de beoordeling van directe en indirecte effecten. Ook de verklaarbaarheid van de effecten heeft een meer herkenbare plaats gekregen. Ook voor het huidige rapport is deze nieuwe werkwijze reeds aangehouden.

Het eindoordeel van de bioassay-resultaten is per monster gelijkgesteld aan het toetsingsresultaat van de (voor dat monster) gevoeligste parameter. De verklaarbaarheid van de in bioassays waargenomen effecten is bepaald door per stof te kijken in hoeverre de concentratie in het sediment het in de literatuur gerapporteerde no-observed-effect-niveau (NOEC) voor de betreffende bioassay overschrijdt. Per stof zijn NOEC-overschrijdingsfactoren berekend door het gestandaardiseerde gehalte van elke contaminant te delen door de NOEC van die contaminant. Dit levert per stof en per testorganisme het aantal "toxic units" (TU's). Voor de interpretatie van de bioassayuitkomsten is gesteld dat wanneer de som-TU van een bepaalde stofgroep de waarde 1 overschrijdt, dit een indicatie is dat de gevonden effecten zijn veroorzaakt door verontreinigingen in het sediment (m.a.w., er is voldoende verklaarbaarheid).

De risico's die optreden als gevolg van bioaccumulatie in voedselketens (risico's voor effecten op toppredatoren) zijn beoordeeld op basis van bioaccumulatie testen. Gemeten bioaccumulatie-niveaus in oligochaeten zijn vergeleken met MTR's zoals beschreven in Den Besten (1997). Overschrijding van de MTR met een factor van meer dan 10 is

aangeduid met “ernstig risico”. Ook in het geval van de risico’s via bioaccumulatie wordt in principe gekeken naar de “verklaarbaarheid”: in hoeverre wordt onder de geldende locatie-specifieke omstandigheden de waterbodemkwaliteit verantwoordelijk geacht voor de opname van contaminanten in de voedselketen. Dit is echter vooral van belang indien gebruik gemaakt wordt van organismen die in het veld zijn verzameld. Bij het uitvoeren van bioaccumulatie-testen wordt gewerkt met schoon bovenstaand water en is eventuele bioaccumulatie noodzakelijkerwijs het gevolg van de in het sediment aanwezige verontreinigingen.

## 3. Resultaten en discussie

### 3.1. Fysisch-chemische analyses

#### 3.1.1. Sedimentkarakterisering

In tabel 3.1 worden de fysisch-chemische analysegegevens weergegeven, waarmee de waterbodems van de onderzochte locaties tot bodemtypen zijn gekarakteriseerd. De ruwe gegevens staan in bijlage 1.

**Tabel 3.1** Sedimentkarakterisering op basis van de criteria van Den Besten (1997).  
O.S.= organische stof; D.S. = droge stof.

Locatie	O.S. (% D.S.)	< 16 µm (% D.S.)	< 63 µm (% D.S.)	> 210 µm (% D.S.)	Vocht (%)	tot. fosfaat (mg/kg)	Kj-N (mg/kg)	Algemene karakterisering
W2N	1,8	3,3	5,5	60,1	24,3	300	390	zand
W4N	0,0 <sup>1</sup>	< 0,1	0,8	90,7	19,0	110	67	zand
O5Z	6,3	22,5	39,2	23,1	44,2	990	1400	stabiel slib
O32Z	4,5	27,5	41,4	28,9	43,0	920	1000	stabiel slib

<sup>1</sup>: De gloeirest is vastgesteld op 100% en het org. stofgehalte ( { 100 - gloeirest } \*0.9) daarmee op 0%. Dit monster kan dus gezien worden als een zeer zandig monster met een org. stofgehalte onder de detectielimiet. Voor de TU-analyses wordt gerekend met een org. stof gehalte van 0.25%.

### 3.1.2. Sedimentverontreinigingsgraad

De ruwe resultaten van de chemische analyses van de sedimenten zijn opgenomen in bijlage 1. De resultaten van de chemische analyse en van de toetsing van de gehalten van toxicanten volgens de waterbodemonormering uit de Evaluatienota Water zijn weergegeven in tabel 3.2 (zie ook bijlage 2). In deze tabel worden tevens de klasse-bepalende verontreinigingen aangegeven.

**Tabel 3.2** Verontreinigingsgraad van het sediment volgens de Evaluatienota Water (met de aangepaste beoordeling interventiewaarde PAK).

Locatie	Metalen	Chloorbenzenen	PCB's	OCB's	PAK's	Olie	Eind	Klasse bepalende verontreinigingen bij klasse 3 en 4
W2N	1	3 <sup>1</sup>	2	≤ 3 <sup>2</sup>	2	1	2	HCB
W4N	0						0 <sup>3</sup>	
O5Z	2	3	3	2	3	1	3	HCB, PAK's, PCB's
O32Z	2	3	3	2	2	1	3	HCB, PCB's

<sup>1</sup>: verontreinigingen vallen in een hogere klasse in vergelijking tot de eindbeoordeling. Dit wordt veroorzaakt doordat bij de eindbeoordeling gebruik wordt gemaakt van een toetsingsregel.

<sup>2</sup>: voor een aantal stoffen was de detectielimiet hoger dan de bepaalde klasse.

<sup>3</sup>: waarden van chloorbenzenen, PCB's, OCB's, PAK's en olie liggen onder de detectielimiet en zijn tevens niet te standaardiseren doordat het org. stof gehalte niet berekend kon worden.

## 3.2. Bioassays

Het tijdstip van de uitvoering van de bioassays is te vinden in bijlage 3. De ruwe resultaten van de bioassays met *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* worden weergegeven in bijlagen 5-11 en worden in de volgende paragrafen samengevat.

### 3.2.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden

#### Geldigheidscriteria

De gehanteerde richtlijnen geven criteria aan voor de geldigheid van de toxiciteitstesten. In tabel 3.3 zijn deze criteria en de geconstateerde waarden per test weergegeven voor de toegepaste bioassays.

Bij alle testen werd voldaan aan de betreffende geldigheidscriteria.

**Tabel 3.3** Geldigheidscriteria voor de toxiciteitstesten.

Parameters	Criterium	Geconstateerde waarden
<b>Microtox</b> (NVN 6516, 1993)		
Afname luminescentie in de blanco's (Rt)	$0,6 < Rt < 1,3$	0,9 - 1,0
% afwijking tussen duplowaarden t.b.v. bepaling EC <sub>20</sub> -waarde	≤ 15*	≤ 15*
<b>Daphnia magna</b> (Maas <i>et al.</i> , 1993; OECD 202, 1993)		
sterftepercentage ouderdieren in blanco	≤ 20	10
geboorte eerste nakomelingen in blanco	≤ 9 dagen	7 - 9
gemiddeld aantal nakomelingen per ouderdier in de blanco	≥ 30	49,8
variatiecoëfficiënt van het gemiddeld aantal geproduceerde jongen in blanco	≤ 25 %	16,6
<b>Chironomus riparius</b> (Maas <i>et al.</i> , 1993)		
sterftepercentage in zandig referentiesediment	≤ 10	7
larvale stadium in zandig referentiesediment ≥ L4	≥ 80 %	89
gemiddelde drooggewicht L4-larven in zandig referentiesediment (mg)	≥ 0,3	0,42
sterftepercentage in slibrijk referentiesediment	≤ 10	5
larvale stadium in slibrijk referentiesediment ≥ L4	≥ 80 %	91
gemiddelde drooggewicht L4-larven in slibrijk referentiesediment (mg)	≥ 0,3	0,37

\*: waarde wordt berekend en getoetst aan het criterium door het dataverwerkingsprogramma, maar wordt hierbij niet als getalswaarde weergegeven.

### Randvoorwaarden

De resultaten van de semi-kwantitatieve controle van enkele fysische en chemische parameters (zie §2.3) worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* weergegeven in respectievelijk bijlage 5, 7 en 10.

Door het RIZA zijn criteria (randvoorwaarden) voor deze parameters opgesteld. Wanneer gedurende de bioassays wordt voldaan aan deze randvoorwaarden, worden géén negatieve effecten van deze parameters verwacht. De randvoorwaarden voor deze parameters worden eveneens vermeld in de genoemde bijlagen.

### Acute test met *Vibrio fischeri* (bijlage 5)

Voor alle monsters kon voor de gemeten parameters worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

### Chronische test met *Daphnia magna* (bijlage 7)

Bij de bioassay met *D. magna* werd in het poriewater monster O5Z een onderschrijding van de randvoorwaarde voor zuurstof in het onverdunde poriewater geconstateerd. De zuurstofconcentratie in de 56 volume % van het monster voldeed wel aan het gestelde criterium. Daarnaast

werden er geen negatieve effecten op de watervlooiën vastgesteld. Deze onderschrijding heeft de testresultaten dan ook niet beïnvloed. Voor alle andere monsters en parameters werd aan de gestelde randvoorwaarden voldaan.

### **Chronische test met *Chironomus riparius*** (bijlage 10)

In de eerste week van de bioassays worden de eieren en larven van *C. riparius* alleen via de waterfase (elutriaat) blootgesteld. Na deze eerste week worden de larven blootgesteld in sediment/water systemen. De randvoorwaarden worden in dit geval gemeten in het bovenstaande water.

Het elutriaat bleek voor alle parameters aan de gestelde randvoorwaarden te voldoen. Daarentegen bleek de zuurstofconcentratie in het bovenstaande water van het gebruikte slibreferentiesediment in de laatste week (net) niet aan de gestelde randvoorwaarde voor het zuurstofgehalte te voldoen (34 % i.p.v. >35). Toch voldeed het referentiesediment aan de gestelde geldigheidscriteria wat betreft overleving, ontwikkeling en groei (tabel 3.3). Deze minimale onderschrijding heeft de testresultaten dan ook niet beïnvloed.

Voor alle andere parameters kon in het bovenstaande water voor de monsters aan de gestelde randvoorwaarden worden voldaan.

## **3.2.2. Resultaten bioassays**

De "ruwe" testresultaten van de bioassays worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* weergegeven in respectievelijk bijlage 6, 8, 9 en 11. Deze resultaten zijn beknopt samengevat in de tabel 3.4.

### **Acute test met *Vibrio fischeri***

Bij de Microtox-test is sprake van een acuut effect indien de EC<sub>20</sub>-waarde lager is dan 45 volume% (=hoogste test concentratie).

In geen van de vier poriewatermonsters werd een acuut toxisch effect gemeten met de Microtox<sup>®</sup> toets. De EC<sub>20</sub>-waarde van alle monsters was hoger dan 45 volume-%, hetgeen overeenkomt met een toxiciteitsindex (TI) kleiner dan 2.

### **Chronische test met *Daphnia magna***

Bij de chronische bioassay met *D. magna* is sprake van een toxisch effect indien de NOEC<sub>reproductie</sub> en/of de NOEC<sub>sterfte</sub> kleiner is dan 100 vol%.

Uit de resultaten bleek dat geen van de sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakten op de watervlo *Daphnia magna*.



**Tabel 3.4.** Resultaten van de bioassays (d.w. = drooggewicht; n.v.t. = niet van toepassing).

	Acuut	Chronisch						
organisme	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>			<i>Chironomus riparius</i>			
testduur	5, 15 en 30 minuten	14-17 dagen			28 dagen			
effect-parameter	laagste EC <sub>20</sub> (vol. %)	NOEC reproductie (vol. %)	NOEC sterfte (vol. %)	LC <sub>50</sub> (vol. %)	sterfte (%)	% larven in stadium L2, L3 of dood	d.w L4-larven (mg)	d.w. % t.o.v. referentie
slib-referentie					5	9	0,37	
zand-referentie					7	11	0,42	
W2N	> 45	100	100	>100	15	22	0,43	2,3 <sup>1</sup>
W4N	> 45	100	100	>100	13	21	0,37	-11,6 <sup>1</sup>
O5Z	> 45	100	100	>100	12	14	0,60	58,9 <sup>2</sup>
O32Z	> 45	100	100	>100	15	23	0,53	40,7 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: getest t.o.v. de zandreferentie.

<sup>2</sup>: getest t.o.v. de slibreferentie.

### Chronische test met *Chironomus riparius*

Bij de chronische bioassay met *C. riparius* is sprake van een toxisch effect indien een statistisch significant verschil voor een van de bepaalde parameters wordt aangetoond in vergelijking met de waarde in het referentiesediment.

Wanneer de resultaten van de sedimentmonsters vergeleken worden met de resultaten van het referentiesediment, dan blijkt geen van de sediment monsters een significant negatief effect te hebben.

### 3.2.3. TU-waarden sediment

Uit de resultaten van de uitgevoerde toxiciteitstesten (tabel 3.4) blijkt dat geen van de sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakte. Voor de microtox en *C. riparius* komt dit overeen met de verwachting op basis van de resultaten van de TU-analyses (bijlage 12, tabel 3.5). Op basis van deze resultaten werden hier en daar wel lichte effecten verwacht voor *D. magna* en dan vooral als gevolg van de concentraties aan metalen en PAK's. Bij deze TU-analyse dient wel gerealiseerd te worden, dat de berekeningen worden uitgevoerd met de laagst aangetroffen NOEC-waarden en niet bijv. geometrisch gemiddelde waarden als er meerdere testresultaten bekend zijn. Dit betekent, dat monsters waarbij de  $\Sigma$  TU-waarden groter is dan 1, terwijl er geen effecten worden aangetroffen, niet onverwacht zijn (er wordt een worst - case benadering gevolgd).

**Tabel 3.5.** Overzicht van de per testorganisme en sedimentmonster berekende  $\Sigma TU_{\text{chemie}}$  - waarden op basis van de geanalyseerde verbindingen. Alle  $TU$ 's zijn op basis van NOEC-waarden in mg/kg sediment.  $\Sigma TU_{\text{chemie}}$  -waarden  $> 1$  zijn onderstreept weergegeven.  $\Sigma TU_{\text{chemie}}$  -waarden  $> 3$  zijn onderstreept en vet gedrukt weergegeven.  $\Sigma TU_{\text{chemie}}$  -waarden  $< 0.5$  zijn niet weergegeven. Individuele  $TU$ -waarden  $< 0.1$  zijn niet in de berekening meegenomen.

test met:		<i>Vibrio fischeri</i> (acuut)	<i>Daphnia magna</i> (chronisch)	<i>Chironomus riparius</i> (chronisch)
Locatie	Stofgroep			
W2N	Metalen PAK's PCB's OCB's		0,87 <u>1,12</u>	
W4N <sup>1</sup>	Metalen PAK's PCB's OCB's			
O5Z	Metalen PAK's PCB's OCB's		<u>1,39</u> <u>1,40</u>	0,69
O32Z	Metalen PAK's PCB's OCB's		<u>1,55</u> <u>1,14</u>	0,94

<sup>1</sup>: fractie  $< 16 \mu\text{m}$  en gloeirest van slib liggen onder de detectielimiet. Voor de  $TU$ -analyse is gebruik gemaakt van een hypothetisch org. stof gehalte van 0.25% en een geschat lutumgehalte op basis van de detectiegrens van de fractie  $< 16 \mu\text{m}$  (0.1%).

### 3.3. Bioaccumulatie in oligochaeten

#### Randvoorwaarden tijdens de bioaccumulatietest

Een overzicht van de resultaten van de semi-kwantitatieve controle van enkele fysische en chemische parameters (zie §2.4) is weergegeven in bijlage 13.

Door het RIZA (Maas *et al.*, 1993) zijn criteria (randvoorwaarden) voor deze parameters vermeld. Wanneer gedurende de bioassay wordt voldaan aan deze randvoorwaarden, worden géén negatieve effecten van deze parameters verwacht. De randvoorwaarden voor deze parameters worden eveneens vermeld in de genoemde bijlage.

Voor de duplo's van alle monsters kon gedurende de gehele test worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

#### Recovery aan het einde van de bioaccumulatietest

Op basis van de natgewichten van oligochaeten aan het begin en het einde van de bioaccumulatie-experimenten werd het percentage

“recovery” berekend. De resultaten hiervan, zoals weergegeven in bijlage 14, zijn samengevat in tabel 3.6.

Uit de resultaten blijkt, dat de gemiddelde recovery in de monsters O5Z en O32Z (50-65%) redelijk was. De recovery in W4N (35%) is relatief laag. De recovery in W2N verschilde sterk tussen de duplo's, 17 en 67 % respectievelijk. De reden voor deze variatie kon niet achterhaald worden.

**Tabel 3.6.** Overzicht van het percentage recovery op basis van natgewichten na afloop van de bioaccumulatie-experimenten met oligochaeten. De standaarddeviaties zijn tussen haakjes weergegeven.

Ecolims nr.	Omschrijving	Gemiddelde recovery (%) (± standaard deviatie)
309659	W2N	42 (± 35,5)
309660	W4N	35 (± 6,0)
309661	O5Z	65 (± 8,7)
309662	O32Z	52 (± 4,6)

### Resultaten chemische analyses

De ruwe resultaten van de chemische analyses zijn te vinden in bijlage 15. In bijlage 16 worden de resultaten uitgewerkt. Met de stofgehalten aanwezig in de oligochaeten vóór het inzetten van de test (blanco, na 4 weken Drontermeer) en aan het einde van de test is de toe- of afname van de stofgehalten ten opzichte van de blanco berekend. Voor een aantal van de geanalyseerde stoffen was het gehalte in de oligochaeten aan het begin van de testen (uitgangsmateriaal) hoger dan aan het einde van de test (koper,  $\gamma$ -HCH en een aantal PAK's). Dit betekent dat de oligochaeten (een deel) van de stoffen zijn kwijt geraakt en/of dat de stoffen zijn verdund in de organismen. Dit kan bijvoorbeeld doordat de opgenomen hoeveelheid per organisme gelijk is gebleven, maar het drooggewicht (in geval van metalen) of het vetgehalte (in geval van de overige stoffen) is toegenomen. Dit proces wordt ook wel groeiverdunning genoemd. Voor deze stoffen is het zeer lastig om uitspraken te doen over de biologische beschikbaarheid en/of eventuele doorvergiftigingsrisico's.

Voor een groot aantal stoffen was het gehalte in het uitgangsmateriaal duidelijk lager dan aan het einde van de test. Hier is dus per definitie sprake van bioaccumulatie. Het bleek dat de gehalten aan metalen, PCB's, hexachloorbenzeen, DDD en DDE waren verhoogd in oligochaeten die gedurende 4 weken aan sediment van de locaties W2N, W4N, O5Z en O32Z waren blootgesteld. De gehalten van de overige pesticiden en PAK verbindingen verschilden niet duidelijk van de blanco dieren (die aan Drontermeer sediment waren blootgesteld).

In bijlage 16 wordt een overzicht gegeven van de beoordeling van de biologische beschikbaarheid van de verschillende stoffen in de geteste sedimentmonsters. In de bijlage 16 wordt tevens per monster aangegeven voor welk van de stoffen een duidelijke toename in gehalte

( $\geq 30\%$ ) ten opzichte van de uitgangssituatie is waargenomen. Alleen met deze stoffen is verder gerekend.

In tabel 3.7 zijn de resultaten ten aanzien van de biologische beschikbaarheid samengevat. Voor een aantal accumulerende stoffen was de gemeten biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF) lager dan de voorspelde BSAF op basis van de evenwicht-partitie theorie. Voor deze stoffen is de biologische beschikbaarheid niet verhoogd en mogelijk zelfs verlaagd. Dit betrof vooral hexachloorbenzeen in de monsters O5Z en O32Z. Voor de sedimenten W2N, O5Z en O32Z werd een (licht) verhoogde beschikbaarheid van de meeste PCB's vastgesteld. De biologische beschikbaarheid van een aantal metalen was voor alle sedimenten (sterk) verhoogd. Dit geldt met name voor cadmium, kwik, lood en chroom voor de locatie W2N en W4N. Er dient echter rekening mee gehouden te worden dat de verwachte concentraties van lood en chroom zijn gebaseerd op een theoretische BSAF waarde<sup>7</sup> van 0.03. De onderbouwing van dit getal zou echter verbeterd kunnen worden. Daarnaast dient in het geval van W4N gerealiseerd te worden, dat dit een zeer zandig sediment betrof met een laag organisch stof gehalte (< detectiegrens). Oligochaeten zijn afhankelijk van het aanwezige organisch materiaal als voedsel en zullen daardoor specifiek op die fractie foerageren. Het percentage organisch materiaal in hun voedsel zal daarom veel hoger liggen in vergelijking tot het 'ruwe' sediment. De grotere zandkorrels worden namelijk niet opgenomen. In dergelijke gevallen worden de dieren in feite intern aan hogere concentraties blootgesteld, dan op basis van de totale sediment samenstelling wordt verwacht, hetgeen kan resulteren in een "op het oog" hoge beschikbaarheid.

Het metaal zink neemt in de beschikbaarheidsanalyse een speciale plaats in daar dit een zogenaamd essentieel metaal is, dat organismen nodig hebben voor hun fysiologisch functioneren. De meeste organismen kunnen hun interne zink concentratie dan ook reguleren (tot op zekere hoogte). De gehalten in oligochaeten variëren over het algemeen tussen de  $\pm 200 - 400$ , terwijl de theoretisch verwachte concentratie een heel ander beeld laat zien (AquaSense, 2000). Het feit, dat in tabel 3.7 wordt gesproken over een verhoogde beschikbaarheid van zink in de monsters W4N en O32Z heeft dan ook hoogst waarschijnlijk deels te maken met het actief opnemen van zink door oligochaeten om aan de metabolische behoeften te voldoen.

---

<sup>7</sup> BSAF staat voor Biota Sediment Accumulatie Factor en is dus de verhouding tussen de concentratie van een stof in het organisme en die in het sediment. De theoretische waarde maakt gebruik van de Equilibrium Partitie theorie.

**Tabel 3.7.** Biologische beschikbaarheid van stoffen voor oligochaeten uitgedrukt als de experimenteel afgeleide BSAF gedeeld door de theoretisch verwachte BSAF (E/V in bijlage 16). De BSAF is de concentratie in de wormen in mg/kg (metalen o.b.v. droge stof en organische stoffen o.b.v. vet) gedeeld door het gehalte in het sediment (metalen o.b.v. droge stof en organische stoffen o.b.v. organisch koolstof). Stoffen waarvoor de toename ten opzichte van de blanco in de testen < 30% was, zijn niet in de tabel opgenomen.

Monsterpunt	W2N	W4N	O5Z	O32Z
Ecolimsnr.	309659	309660	309661	309662
Cadmium	18,0		3,4	5,4
Kwik	14,6	48,8	4,8	2,7
Lood	54,6	96,8	15,2	24,5
Zink		5,1		1,6
Chroom	14,3		3,4	2,2
Hexachloorbenzeen	1,6		0,5	0,5
DDE			2,1	1,9
DDD			1,0	0,9
PCB 52	1,1		1,0	1,0
PCB 101	1,9		1,7	1,4
PCB 118	1,8		1,3	0,8
PCB 138	1,7		1,7	1,5
PCB-153	1,8		1,9	1,6
PCB-180	1,7		1,6	1,5

De biologische beschikbaarheid van PAK's kon niet worden gekwantificeerd, omdat de concentraties in de wormen na blootstelling aan de sedimenten lager dan de detectielimiet waren.

De Maximum Toelaatbaar Risico (MTR)-criteria en de toetsing aan deze criteria is eveneens weergegeven in bijlage 16. Voor de notoire accumulerende stoffen waarvoor MTR's zijn afgeleid (cadmium, kwik en organochloorverbindingen) werd een ernstig doorvergiftigingsrisico (overschrijding met meer dan een factor 10) vastgesteld voor cadmium (W2N, W4N en O32Z) en PCB-153 (O32Z). Voor O5Z werden verhoogde risico's vastgesteld.

**Tabel 3.8.** De gemeten concentratie in de wormen in mg/kg vers (G) gedeeld door het Maximum toelaatbaar risico (MTR) van stoffen voor oligochaeten (G/MTR in bijlage 16). Stoffen waarvoor de toename ten opzichte van de blanco in de testen < 30% was, zijn niet in de tabel opgenomen. Tevens zijn alleen die stoffen opgenomen waarvoor een overschrijding van de MTR werd vastgesteld.

Monsterpunt	W2N	W4N	O5Z	O32Z
Ecolimsnr.	309659	309660	309661	309662
Cadmium	16,7	44,3	5,1	13,6
Kwik	1,2	1,1	1,0	0,8
Methyl-kwik*	4,9	4,8	4,4	3,5
PCB-153**	9,4	4,8	9,4	13,8

\*: er vanuit gaande dat alle kwik als methyl-kwik aanwezig is (worst-case benadering)

\*\* : PCB-153 als gidsstof voor PCB's met een dioxine-achtige werking

### Effect van de zogenaamde 'voorkweek'

Voor het ecotoxicologische onderzoek in Gameraen is dit het eerste jaar geweest, dat voor de bioaccumulatietest met oligochaeten van een zogenaamde 'voorkweek' gebruik werd gemaakt. Door de dieren gedurende 4 weken in Drontermeer sediment te houden, wordt getracht de concentraties van eventueel in het uitgangsmateriaal aanwezige verontreinigingen te verlagen. Om het rendement van een dergelijke voorkweek te kunnen beoordelen zijn de chemische analyses van enkele aan Drontermeer blootgestelde monsters (niet alleen huidig project, maar ook andere) vergeleken met de analyses in oligochaeten die op de standaard TRIADE-manier zijn voorbereid (spoelen in water).

Hierbij is allereerst bekeken of een kleine wijziging in de spoel- en opwerkmethode een effect heeft op de resultaten van de chemische analyses. Doordat de dieren, die uit het Drontermeer worden gehaald nog in experimenten gebruikt moeten worden, worden ze iets voorzichtiger schoongespoeld. Het zou hierdoor mogelijk zijn, dat enkele sediment restanten achterblijven en daarmee de resultaten van de chemische analyses verstorend. Middels enkele aanvullende analyses is echter komen vast te staan, dat dit geen rol van betekenis speelt. Daarnaast is bekeken in hoeverre de concentraties van de oligochaeten uit de voorkweek nu echt lager liggen dan de dieren die niet eerst aan Drontermeer sediment zijn blootgesteld. Voor koper lijkt dit duidelijk het geval te zijn. De concentraties van andere metalen lijken echter meer van individuele variaties af te hangen en er lijkt geen consistent verschil tussen beide behandelingswijzen te bestaan. Doordat dergelijke variaties geregeld meer dan 30% bedragen (de grens waarboven van bioaccumulatie wordt gesproken), zou overwogen moeten worden om de chemische analyses aan de oligochaeten in duplo uit te voeren. Ook de PAK concentraties worden duidelijk verlaagd door de voorkweek, terwijl de PCB concentraties weinig verschillen laten zien. Wel valt op, dat de PAK concentraties in oligochaeten, die op de standaard manier zijn voorbehandeld, sterk kunnen verschillen tussen partijen (van 40 tot 320 mg/kg vet voor de  $\Sigma 16$  PAK's).

## 3.4. Beoordeling van de resultaten

Tot nu toe werden de resultaten van het onderzoek gerapporteerd conform de TRIADE-benadering (Maas *et al.*, 1993). Hierbij worden fysisch-chemische parameters en biologische effectparameters (bioassays en veldinventarisatie) gecombineerd om de risico's van de waterbodemonverontreiniging voor het milieu te beoordelen. Hiervoor zijn in de TRIADE-richtlijn criteria geformuleerd waarmee op basis van iedere afzonderlijke parameter een sedimentmonster kan worden ingedeeld in één van de drie volgende klassen. Recent is echter ook een concept voor een nieuwe "Richtlijn Nader Onderzoek" gereed gekomen (van Elswijk, 2000). De in deze richtlijn voorgestelde beoordeling verschilt enigszins van de tot nu toe gehanteerde werkwijze. Deze verschillen zijn niet zozeer in de beoordelingscriteria van de testresultaten gelegen (zie Maas *et al.*, 1993), maar meer in de manier waarop deze gepresenteerd worden. Eén van de punten is bijvoorbeeld dat een duidelijk onderscheid wordt aangebracht tussen de beoordeling van directe en indirecte effecten. Ook de verklaarbaarheid van de effecten heeft een meer herkenbare plaats gekregen. Ook voor het huidige rapport is deze nieuwe werkwijze reeds aangehouden.

### 3.4.1. Directe effecten (spoor A)

Het eindoordeel van de bioassay-resultaten is per monster gelijkgesteld aan het toetsingsresultaat van de (voor dat monster) gevoeligste parameter. De verklaarbaarheid van de in bioassays waargenomen effecten is bepaald door per stof te kijken in hoeverre de concentratie in het sediment het in de literatuur gerapporteerde no-observed-effect-niveau (NOEC) voor de betreffende bioassay overschrijdt. Per stof zijn NOEC-overschrijdingsfactoren berekend door het gestandaardiseerde gehalte van elke contaminant te delen door de NOEC van die contaminant. Dit levert per stof en per testorganisme het aantal "toxic units" (TU's). Is het aantal TU's hoger dan 1, dan kan deze stof alleen al verantwoordelijk worden beschouwd voor eventueel waargenomen toxiciteit in de betreffende bioassay. Om rekening te kunnen houden met combinatietoxiciteit, zijn de TU's van de stofgroepen zware metalen, PCB's, PAK's en organochloorbestrijdingsmiddelen gesommeerd. Voor de interpretatie van de bioassayuitkomsten is gesteld dat wanneer de som-TU van een bepaalde stofgroep de waarde 1 overschrijdt, dit een indicatie is dat de gevonden effecten zijn veroorzaakt door verontreinigingen in het sediment (m.a.w., er is voldoende verklaarbaarheid).

Uit de resultaten van de beoordeling weergegeven in tabel 3.9 blijkt, dat voor geen van de onderzochte sedimentmonsters ecologische risico's als gevolg van directe effecten werden aangetoond.

### 3.4.2. Indirecte effecten (spoor B)

De risico's die optreden als gevolg van bioaccumulatie in voedselketens (risico's voor effecten op toppredatoren) zijn beoordeeld op basis van gemeten gehalten in bioaccumulatie testen. Gemeten bioaccumulatie-niveaus in oligochaeten zijn vergeleken met MTR's zoals beschreven in Den Besten (1997). Overschrijding van de MTR met een factor van meer dan 10 is aangeduid met "ernstig risico". Ook in het geval van de risico's via bioaccumulatie wordt in principe gekeken naar de "verklaarbaarheid": in hoeverre wordt onder de geldende locatie-specifieke omstandigheden de waterbodemkwaliteit verantwoordelijk geacht voor de opname van contaminanten in de voedselketen. Dit is echter vooral van belang indien gebruik gemaakt wordt van organismen die in het veld zijn verzameld. Bij het uitvoeren van bioaccumulatie-testen wordt gewerkt met schoon bovenstaand water en is eventuele bioaccumulatie noodzakelijkerwijs het gevolg van de in het sediment aanwezige verontreinigingen.

Uit de resultaten van de beoordeling weergegeven in tabel 3.9 blijkt, dat voor drie sedimentmonsters ernstige ecologische risico's als gevolg van indirecte effecten werden geconcludeerd (W2N, W4N en O32Z), terwijl bij de beoordeling van O5Z verhoogde risico's werden gevonden.

Daarnaast wordt door Den Besten (1997) als aanvullende eis voor het vaststellen van een actueel risico gesteld, dat het gehalte in de toplaag van het sediment in klasse III of IV valt. Voor de huidige situatie zou dit betekenen, dat de indirecte risico's zoals vastgesteld in W2N en W4N uiteindelijk het oordeel "geen actueel risico op doorvergiftiging" krijgen.



**Tabel 3.9.** Resultaten van de uitgevoerde beoordeling c.f. van Elswijk (2000).

Locatie	Directe effecten				Risico's voor doorvergiftiging		
	Effecten op benthos	Effecten in bioassays	Verklaarbaarheid	Actueel risico ?	Risico voor toppredatoren <sup>1)</sup>	Verklaarbaarheid <sup>2)</sup>	Actueel risico ?
W2N	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja
W4N	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja
O5Z	?	-	n.r.	nee	verhoogd	n.r.	nee
O32Z	?	-	n.r.	nee	ernstig	n.r.	ja

?: macrofauna analyses worden door het RIZA uitgevoerd

n.r.: niet relevant voor de huidige monsters wegens ontbreken van effecten of het uitvoeren van een bioaccumulatie test in het laboratorium (i.t.t. meting in het veld)

<sup>1)</sup> ernstig risico wanneer bioaccumulatie niveau's de MTR-waarde meer dan 10x overschrijden; verhoogd risico indien deze MTR-waarde minder dan 10\* wordt overschreden

<sup>2)</sup> verklaarbaarheid van risico voor doorvergiftiging is van belang indien gewerkt wordt met metingen uit het veld, aangezien daar een oorzakelijk verband met de in het sediment aanwezige verontreinigingen aannemelijk moet worden gemaakt. In dit geval gaat het om laboratorium experimenten, waar de eventueel opgetreden bioaccumulatie noodzakelijkerwijs uit het sediment afkomstig is. Zie ook Den Besten, 1997.



## 4. Literatuur

- AquaSense (2000). Monitoring sanering Ketelmeer-oost T0 situatie: aanvullende metingen voor de toplaag aangevuld met metingen in diepere lagen - In opdracht van : Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA). Rapportnummer: 2000.1483.
- Den Besten, P. (1996). Biologische beschikbaarheid van contaminanten in verouderd sediment. Resultaten bioaccumulatie-bioassays met Oligochaeten in sediment uit Dordtsche Biesbosch en Geulhaven. Werkdocumentnr. 95.176X, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Den Besten, P. (1997). Biotisch effectonderzoek Hollandsch Diep en Dordtsche Biesbosch. Nader onderzoek waterbodempkwaliteit. Rapportnr 97.098, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Grootelaar E.E.M. & R. Mulder (1991). Handleiding voor het kweken van de muggelarve *Chironomus riparius*. S.O.P. AOCE/06 uitgave nr 3., Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- ISO 6341 (1989). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*).
- Lahr, J. (1988). De bioaccumulatie van chloorbenzenen in larven van *Chironomus plumosus* (Diptera: *Chironomidae*) in een kunstmatig sediment/water systeem. Stageverslag, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Maas, J.L., C. van de Guchte & F.C.M. Kerkum (1993). Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE-benadering. Methodebeschrijvingen voor enkele bioassays, bioaccumulatiemetingen en veldstudies. Notanr. 93.027, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Ministerie van Verkeer en Waterstaat (1994). Evaluatienota Water. Tweede Kamer, vergaderjaar 1993-1994, 21 250, nrs. 27-28.
- Norusis, M.J. (1992). SPSS<sup>®</sup> for Windows<sup>™</sup>. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc., Chicago.
- NVN 6516 (1993). Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Photobacterium phosphoreum*. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- OECD (1993). Draft OECD test guideline 202 part II, *Daphnia magna* reproduction test to be used in the final ring test. Organization for Economic Co-operation and Development, Parijs.

- RIZA (1997). Waterbodem Beoordeling Ondersteunend Systeem, Waterbodem BOOS, versie 0,5. Gebruikers handleiding. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Tidepool (1995). ToxCalc programme, version 5.0.12N. Tidepool Scientific Software.

## 5. Bijlagen