

Arco Wagenvoort, Evides, thans AqWa ecologisch advies  
 Corina de Hoogh, Kiwa Water Research  
 Frank Jonker, Evides  
 Ton van Leerdam, Kiwa Water Research

# Watervlooiën detecteren lozing van onbekende verontreiniging

**In het voorjaar van 2004 staakte Evides enkele malen de inname van Maaswater uit de spaarbekkens in de Biesbosch vanwege een alarm van de *Daphnia*-biomonitor. Met behulp van een massaspectrometer kon Kiwa Water Research de identiteit van de verontreiniging achterhalen: 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum, een stof die onder meer aan hydraulische vloeistoffen wordt toegevoegd om de overbrenging te verbeteren. De verontreinigingen stopten na enkele dagen. Door het innemen van Maaswater te staken, vormde de verontreiniging destijds geen bedreiging voor de drinkwaterproductie in het zuidwesten van Nederland. De bron van deze verontreiniging is tot op heden onbekend gebleven. Dit artikel vat de gebeurtenissen en het onderzoek samen. In het wetenschappelijke tijdschrift *Environmental Science and Technology* is een uitgebreide beschrijving van deze casus gepubliceerd<sup>1)</sup>.**

Reeds enkele jaren gebruikt Evides biologische bewakingssystemen om de kwaliteit van het ingenomen water via de computer te monitoren. Deze systemen staan opgesteld in het meetstation Keizersveer, dat Evides en RIZA gezamenlijk exploiteren<sup>2)</sup>. De biologische bewaking met algen en watervlooiën is er op gericht om via de computer bekende en onbekende bestrijdingsmiddelen en verontreinigingen te detecteren, wat door middel van chemische technieken niet mogelijk is. De biologische bewakingssystemen registreren veranderingen in gedrag of fysiologie of het optreden van sterfte als gevolg van een (zeer) slechte waterkwaliteit. Meteen na het optreden van een alarm van een biologisch bewakingssysteem wordt de inname van Maaswater automatisch gestaakt.

Van begin maart tot begin mei 2004 werd driemaal een alarm geconstateerd bij de *Daphnia*-biomonitor, waarna de inname van Maaswater direct gestopt werd. Details van deze drie alarmen staan in tabel 1. Alle alarmen werden gekenmerkt door een stijging van de gemiddelde zwemsnelheid van de watervlooiën en sterfte van de dieren. Bij elk alarm duurde het enkele dagen voordat de watervlooiën weer normaal gedrag vertoonden.

Bij het eerste alarm (19 maart 2004) stierf in korte tijd de helft van de watervlooiën. Omdat daardoor het aantal overgebleven dieren in de monitor te klein werd om statis-

tisch onderbouwde resultaten op te leveren, kon niet significant worden aangetoond dat ook de gemiddelde zwemsnelheid van de dieren was toegenomen. Handmatige evaluatie van de meetgegevens wees echter uit dat dit wel het geval was. Tijdens een routinematige controle op 20

april 2004 werd de combinatie van een verhoogde zwemsnelheid en sterfte van de watervlooiën aangemerkt als een alarm. Omdat de sterfte minder dan de helft van de diertjes betrof, genereerde het systeem geen automatisch alarm. Vanaf 22 april was het gedrag van de watervlooiën weer normaal,

*De Daphnia-toximeter (Moldaenke, Kiel).*



zodat Evides de inname van water kon hervatten. Het derde alarm, op 29 april, was wederom het gevolg van een toegenomen zwemsnelheid en sterfte van de *Daphnia's*. Deze keer moest de inname zes dagen worden gestaakt.

### Identificatie

Gezien de overeenkomsten tussen de drie geconstateerde alarmen ontstond al snel het vermoeden dat het hier wel eens om dezelfde verontreiniging zou kunnen gaan. Tijdens de alarmperiodes waren monsters verzameld. Deze werden geanalyseerd tezamen met onverdachte Maaswatermonsters van vóór en ná de alarmen, om de resultaten met elkaar te kunnen vergelijken. Hierdoor werd het mogelijk afwijkingen van de normale achtergrondverontreiniging in de Maas te onderscheiden.

Vergelijking van de verdachte en onverdachte monsters met gangbare LC-UV-detectietechnieken leverde geen aanwijzingen op voor een duidelijke oorzaak van de *Daphnia*-alarmen. Pas met de inzet van een massaspectrometer kon Kiwa Water Research de identiteit van de verontreiniging achterhalen. In elk alarmmonster werd 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum (afbeelding 1) aangetroffen.

Omdat dit een alifatische verbinding is, laat deze geen UV-absorptie zien. Dit maakt de verontreiniging onzichtbaar voor de routinematige LC-UV-screening, die frequent op diverse plaatsen langs de Rijn en Maas plaatsvindt.

Nadat de verontreiniging was geïdentificeerd, bleek dat de gevonden concentraties in de alarmmonsters maximaal 5 µg/l bedroegen. In aanmerking genomen dat de afvoer van de Maas in deze periode ongeveer 1000 kubieke meter per seconde bedroeg en dat de verzamelmonsters over een periode van 24 uur werden genomen, betekent dit dat een vracht van circa 450 kilogram van deze verontreiniging in de Maas terechtgekomen is.

### Verificatie

Om de relatie tussen het biologische alarm en deze verbinding te bevestigen, werd nader onderzoek uitgevoerd. Direct na het optreden van de alarmen werden statische *Daphnia*-testen ingezet met de dagverzamelmonsters van het Maaswater. Bij deze testen werd geen sterfte van *Daphnia magna* waargenomen.

Nadat de identiteit van de verontreiniging bekend was geworden, werden een kort-

durende en een langduurende toxiciteitstest uitgevoerd. Bij deze experimenten werd 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum geaddedeerd aan gefilterd (100 micrometer) Maaswater, dat daarna werd aangeboden aan de watervlooiën in de biomonitor. In het kortduurende experiment liet *D. magna* een verhoogde zwemsnelheid zien ten opzichte van de normale referentiewaarden bij concentraties rond 30 microgram 3 cyclohexyl-1,1-dimethylureum per liter (afbeelding 2). Het effect werd na anderhalf tot twee uur zichtbaar en bleef waarneembaar tot enige tijd na het beëindigen van de blootstelling. Deze vertragung is te verklaren uit het feit dat de toxische stof enige tijd nodig heeft om het lichaam van de watervlooiën binnen te dringen en de toxische respons te induceren. Tijdens deze kortduurende test bleven de watervlooiën echter wel in leven, terwijl ze tijdens de geconstateerde alarmen dood gingen. Dit verschil had wellicht te maken met de duur van de blootstelling.

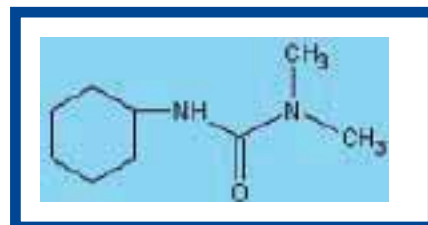
Deze veronderstelling werd in een langduriger experiment bevestigd. Bij een concentratie van bijna 30 microgram per liter werd zowel de verhoogde zwemsnelheid als sterfte waargenomen (afbeelding 3).

Beide experimenten laten zien dat 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum een verhoogde zwemsnelheid kan veroorzaken. Uit de langdurige test blijkt tevens dat deze stof ook sterfte onder de watervlooiën kan veroorzaken. De concentraties waarbij de respons werd gevonden, zijn echter in de experimenten drie tot tien maal zo hoog als de gevonden maximumconcentraties in de alarmmonsters. Het is mogelijk dat de piekconcentratie in de Maas hoger is geweest dan de gevonden concentraties in de verzamelmonsters. Ook is het mogelijk dat hogere concentraties optraden op momenten dat niet werd bemonsterd. Tijdens de eerste alarmperiode werd 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum gevonden in combinatie met verhoogde concentraties hexamethoxymethylmelamine (HMMM) en pentamethoxymethylmelamine (PMMM). In de tweede alarmperiode werd dezelfde stof aangetroffen in combinatie met verhoogde isoproturongehalten. Dit suggereert dat het 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum tenminste gedeeltelijk verantwoordelijk is geweest voor de *Daphnia*-alarmen, maar de respons van de watervlooiën kan zijn versterkt door deze extra verontreinigingen. Het was echter niet mogelijk om verificatietesten met mengsels van deze stoffen uit te voeren.

### Oorzaak

3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum werd geotrooieerd in de jaren tachtig door een Duitse

Afb. 1: Structuurformule 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum.



Alarmen van de *Daphnia*-toximeter te Keizersveer (Maas) in het voorjaar van 2004.

PERIODE	GEMIDDELDE ZWEMSNEELHEID VAN <i>DAPHNIA MAGNA</i>	STERFTE (%)*	DATA VAN INNAME VAN MAASWATER IN BIESBOSCH-BEKKENS	MONSTERS GEANALYSEERD MET HPLC-DAD-Q-TOF-MS
11-15 maart	normaal	geen	-	-
15-18 maart	normaal	geen	-	17-3
18-22 maart	niet genoeg watervlooiën voor statistische evaluatie	50	19 maart: automatisch gestaakt	19-3
22 maart	niet genoeg watervlooiën voor statistische evaluatie	50	-	22-3
22-23 maart	verhoogd	40	-	-
23-25 maart	verhoogd	10	-	25-3
25-29 maart	verhoogd	20	-	-
29 maart-1 april	normaal	10	29 maart: inname hervat	-
9-13 april	normaal	geen	-	-
13-15 april	niet genoeg watervlooiën voor statistische evaluatie	40	-	-
15-19 april	verhoogd	40	-	18-4, 19-4
19-20 april	verhoogd	40	20 april: inname gestaakt op basis van expert judgement	20-4
20-21 april	eerst verhoogd, later niet genoeg watervlooiën voor statistische evaluatie	50	-	-
21-23 april	normaal	10	22 april: inname hervat	-
24-26 april	licht verhoogd	geen	-	26-4
27-29 april	normaal	geen	-	-
29 april-3 mei	niet genoeg watervlooiën voor statistische evaluatie	60	29 april: automatisch gestaakt	-
3-4 mei	verhoogd	40	-	-
4-6 mei	normaal	geen	4 mei: inname hervat	-
15 juni	normaal	geen	-	15-6

producent van herbicides, als één van twee componenten in een herbicidecombinatie. In de gehele Europese Unie is echter geen registratie voor toepassing van dit herbicide gevonden. Ook is geen enkele productieplaats voor deze stof bekend. In 1995 werd een ander patent met deze stofnaam uitgegeven aan een Japanse firma die een grote diversiteit aan producten produceert. Het betrof hier een additief aan hydraulische vloeistoffen en smeermiddelen om de overbrenging te verbeteren. Gezien het feit dat tijdens het eerste alarm 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum werd gevonden in combinatie met HMMM en PMMM - stoffen die worden gebruikt in thermotolerante coatings

- is het aannemelijk dat de verontreiniging het gevolg is van een incidentele industriële lozing. Bij het onderzoek van een LC-UV-alarmmonster van de Maas bij Keizersveer van 5 oktober 2005 werd 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum opnieuw aangetoond, maar nu in combinatie met chemisch verwante stoffen zoals isocyano-cyclohexaan en isothiocyano-cyclohexaan. Isocyano-verbindingen zijn waarschijnlijk van industriële herkomst, zodat het vermoeden van een lozing wordt bevestigd. Omdat het om relatief kortdurende pieken ging, is het verder waarschijnlijk dat de lozing niet ver vóór het meetstation Keizersveer

heeft plaatsgevonden. De exacte bron van de verontreiniging is echter nog altijd onbekend.

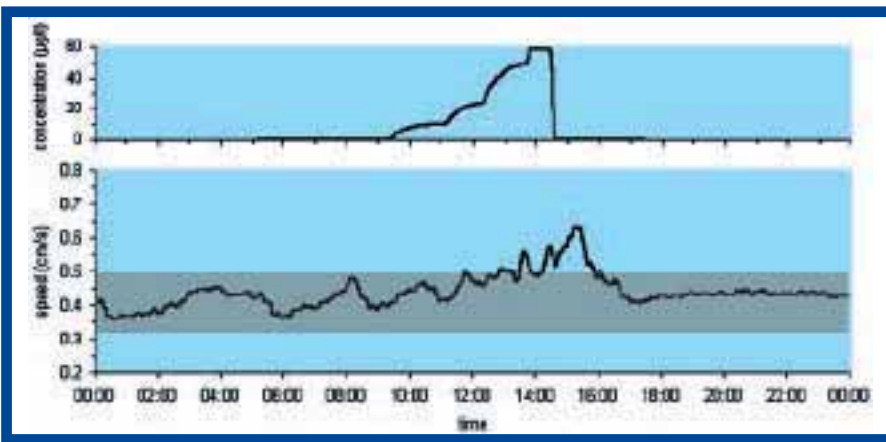
### Conclusie

Biologische bewakingssystemen hebben hun waarde bij de detectie van (on)bekende verontreinigingen bewezen. Ook in deze casus kwam de rol van deze systemen duidelijk naar voren. Waar de *Daphnia*-biomonitor aan de hand van de waargenomen effecten slechts een indicatie geeft van een (onbekende) aanwezige verontreiniging, kan na identificatie worden geprobeerd de oorzaak ervan te achterhalen. Andersom zijn routinematige analytische monitoringstechnieken (zoals het veelgebruikte LC-UV) niet altijd in staat om verontreinigingen direct te detecteren, zodat effectgerichte biomonitoringstechnieken hierop een goede aanvulling vormen. Deze *Daphnia*-alarmen en de daaropvolgende identificatie met geavanceerde analytische methoden laten zien dat de combinatie van effectgerichte biomonitoring en stofgerichte analytische technieken een goed inzicht geeft in de snel veranderende kwaliteit van het oppervlaktewater. Evides waarborgt hiermee een goede continue bewaking van de bron

### Literatuur

- 1) De Hoogh C., A. Wagenvoort, J. Jonker, J. van Leerdam en A. Hogenboom (2006). HPLC-DAD and Q-TOF MS Techniques Identify Cause of *Daphnia* Biomonitor Alarms in the River Meuse. Environmental Science & Technology nr. 8, pag. 2678-2685.
- 2) Wagenvoort A., K. Pikaar-Schoonen, C. de Hoogh en H. Ketelaars (2003). Algen en watervlooiën bewaken de drinkwaterkwaliteit van Zuidwest-Nederland. H<sub>2</sub>O nr. 22, pag. 21-24.

Afb. 2: De zwemsnelheid van *Daphnia magna* in de *Daphnia*-toximeter (onderste figuur) tijdens de kortdurende verificatietest met 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum. Boven de concentratie van 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum als geaddieerd aan het Maaswater. Het normale referentiegedrag van *Daphnia magna* is aangegeven met een grijze balk.



Afb. 3: De zwemsnelheid (onderste figuur) (ten opzichte van referentiewaarden) en sterfte van *Daphnia magna* (middelste figuur) als respons op een langdurige additie van 3-cyclohexyl-1,1-dimethylureum aan Maaswater (bovenste figuur concentratieverloop).

