

THE CIXOTI SE

stowa

ECOLOGISCHE SLEUTELFACTOR TOXICITEIT

➤ Deel 4

SIMONI procedures voor effectgerichte monitoring





COLOFON

Amersfoort, september 2016

Uitgave Stichting toegepast Onderzoek Waterbeheer, Postbus 2180, 3800 CD Amersfoort

Auteurs Ron van der Oost (Waternet) & Mai Thao Nguyen (Waterproef).

Begeleidingsgroep Renée Talens (STOWA), Bas van der Wal (STOWA), Anke Durand-Huiting (Waterschap Vechtstromen), Roelof Veeningen (Wetterskip Fryslân), Miriam Collombon (Wetterskip Fryslân), Frans de Bles (Waterschap Vallei en Veluwe), Anja Derksen (ADeco advies), Willie van den Berg (Waterproef), Laura Moria (Waternet), Jos Goossen (Waterschap Scheldestromen), Ernst Raaphorst (Hoogheemraadschap van Delfland).

Referaat De ecologische sleutelfactoren vormen een denkkader voor het uitvoeren van een ecologische watersysteemanalyse. Ze geven inzicht in het ecologisch functioneren van het watersysteem en in belangrijke stuurknoppen voor ecologisch herstel. Om inzicht te krijgen of toxiciteit een knelpunt vormt voor het ecologisch functioneren van het watersysteem en in de desbetreffende effecten op het waterleven is de sleutelfactor toxiciteit ontworpen en is het concept uitgewerkt in een vijftal rapporten. Voorliggend rapport is deel 4 uit deze serie en beschrijft algemene procedures (SIMONI) voor het monitoren van de toxiciteit van stoffen. De monitoring wordt uitgevoerd met passieve bemonstering en effectgerichte analyses (bioassays).

Trefwoorden Ecologische sleutelfactor, watersysteemanalyse, toxiciteit, effectgerichte analyses, monitoring, passieve bemonstering, systeemanalyse.

Eindredactie Marloes van der Kamp (STOWA)

Vormgeving Shapeshifter, Utrecht

STOWA 2016-15 D

WATERNET 15.125832 B

ISBN 978.90.5773.727.5

Copyright De informatie uit dit rapport mag worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor publicaties in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

Disclaimer Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijd kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.



INHOUDSOPGAVE

Colofon	3
Inhoudsopgave	4
Samenvatting	6

1 INLEIDING 7

2 OPDRACHTVERLENING & OPDRACHTVERWERKING	9
2.1 Opdrachtverlening	9
2.2 Opdrachtverwerking	11
2.2.1 Materialen	11
2.2.2 Planning veldwerk	11
2.2. Planning labwerk	11

3 VELDWERK	12
3.1 Benodigde materialen	12
3.2 Inzetten passive samplers	12
3.3 Tellen watervlooiën (na precies 1 week)	15
3.4 Controleren passive samplers (na ca. 3 weken)	15
3.5 Uithalen passive samplers	15

4 EXTRACTIES & MONSTERVERDELING	17
4.1 Extractie siliconenrubbers (SR)	17
4.1.1 Voorbereiding materialen	17
4.1.2 Soxtec extractie	17
4.1.3 TurboVap indamping	18
4.2 Extractie POCIS	18
4.3 Conditionering en extractie Speedisk	19
4.3.1 Prepareren Speedisk voor gebruik als passive sampler	19
4.3.2 Conditioneren Speedisk	19
4.3.3 Extractie Speedisk	19
4.4 Verdeling van de eindextracten	19



5	MONSTERVOORBEWERKING CHEMISCHE ANALYSES	20
5.1	Analyses in apolaire siliconenrubber (SR) extracten	20
5.1.1	<i>Monstervoorbewerking PCB/OCB/PAK en PCB-PRC analyses</i>	20
5.1.2	<i>Monstervoorbewerking NP pesticide analyse</i>	20
5.2	Analyses polaire POCIS extracten	21
5.2.1	<i>Monstervoorbewerking polaire pesticiden analyses</i>	21
5.2.2	<i>Monstervoorbewerking medicijnen analyses</i>	21
6	MONSTERVOORBEWERKING BIOASSAY ANALYSES	22
6.1	Analyses apolaire SR extracten	22
6.1.1	<i>Monstervoorbewerking algemene acute toxiciteit bioassays</i>	22
6.1.2	<i>Monstervoorbewerking CALUX analyses</i>	22
6.2	Analyses polaire POCIS/Speedisk extracten	22
6.2.1	<i>Monstervoorbewerking Water-SCAN analyse antibiotica activiteit</i>	22
6.2.2	<i>Monstervoorbewerking CALUX analyses</i>	22
7	RAPPORTAGE LABORATORIUM	23
7.1	Veldgegevens	23
7.2	Extractie van de passieve samplers	23
7.3	Algemene toxiciteit	24
7.4	Specifieke toxiciteit apolaire siliconenrubber extracten	24
7.5	Bioassay analyses POCIS/Speedisk	25
7.6	Antibiotica activiteiten	26
8	DATAVERWERKING MET HET 1.2 MODEL	26
8.1	Eerste laag: locaties, bemonstering en extractie	26
8.2	Tweede laag: analyse bioassay-resultaten	27
8.3	Derde laag: evaluatie totaalbeeld	28
9	LITERATUUR	30
10	BIJLAGEN	31
	Bijlage 1: Indicatieve detectiegrenzen PS analyses bij 100% of 10% van het totaal extract	31
	Bijlage 2: Dutch Standard Water	32
	Stowa in het kort	33



SAMENVATTING

De door STOWA ontwikkelde systematiek van de ecologische sleutelfactoren (ESF's) biedt een kapstok voor het uitvoeren van goede watersysteemanalyses met als doel het begrijpen van het watersysteem en hierdoor inzicht krijgen in belangrijke stuurknoppen voor herstel van het ecosysteem.

Voor stilstaande wateren zijn er negen sleutelfactoren ontwikkeld, waarbij:

- ESF 1 (productiviteit van het water), 2 (lichtklimaat) & 3 (productiviteit van de waterbodem) gaan over voorwaarden voor het voorkomen van ondergedoken waterplanten;
- ESF 4 (habitatgeschiktheid), 5 (verspreiding) & 6 (verwijdering) gaan over voorwaarden voor specifieke soortgroepen;
- ESF 7 (organische belasting) & 8 (toxiciteit) gaan over specifieke omstandigheden. Deze sleutelfactoren spelen alleen in specifieke situaties een rol;
- ESF 9 (context) gaat over de afweging tussen functies van watersystemen.

Voor stromende wateren zijn ook sleutelfactoren in ontwikkeling. De sleutelfactor toxiciteit is geldig voor zowel stilstaande, als stromende wateren.

In een serie van vijf rapporten is de sleutelfactor toxiciteit uitgewerkt. De serie bestaat uit een hoofdrapport (deel 1) en vier bijrapporten (deel 2, 3, 4 en 5).

Voorliggend rapport is deel 4 en beschrijft algemene procedures (SIMONI) voor het monitoren van de toxiciteit van stoffen. Deze procedures maken onderdeel uit van het toxicologie spoor beschreven in het hoofdrapport. De monitoring wordt uitgevoerd met passieve bemonstering en effectgerichte analyses (bioassays).

Door het opstellen van heldere procedures zullen de taken en verantwoordelijkheden van de verschillende onderdelen van het onderzoek (veldwerk, extracties, analyses, rapportage) voor iedereen duidelijk zijn. Met deze procedures moeten de grote lijnen van het onderzoek en de verschillende dwarsverbanden inzichtelijk gemaakt worden. De procedures focussen op de bemonstering, de monstervoorbehandeling (extractie en omdamping), en de dataverwerking. Voor bepaalde handelingen moeten daarnaast meer gedetailleerde Standaard Procedure Voorschriften (SPV's) worden geschreven. In deze versie van de SIMONI procedures wordt verwezen naar een aantal bestaande Waterproef SPV's. Deze SPV's zullen voor een groot deel ook aanwezig zijn op de overige waterlaboratoria die de SIMONI strategie gaan toepassen. Als de laboratoria bepaalde bioassay analyses zelf uit willen moeten daarvoor SPV's worden vastgelegd volgens het gebruikelijke format van de laboratoria. De in dit rapport beschreven procedures zijn een algemene handleiding om de SIMONI strategie in de praktijk uit te voeren.

De SIMONI procedures bestaan uit de volgende onderdelen:

- Veldwerk: procedures passieve sampling en veld bioassay;
- Extracties en monsterverdeling: extraheren siliconenrubbers, POCIS en Speedisk;
- Monstervoorbewerking chemische analyses: PCB/OCB/PAK, NP pesticiden, polaire pesticiden, medicijnen;
- Monstervoorbewerking bioassays: algemene toxiciteit, antibiotica activiteit en CALUX assays;
- Rapportages van de laboratoria naar de waterbeheerders;
- Verwerking resultaten met het SIMONI 1.2 model.

Voor laatste twee onderdelen zijn Excel bestanden van de standaard rapportages en het SIMONI 1.2 Excel rekenmodel bijgevoegd. Deze Excel bestanden zijn te vinden op de [STOWA site](#).



1 INLEIDING

Het behouden en verkrijgen van schoon water is één van de taken waar waterbeheerders voor staan. Hiervoor stellen ze waterkwaliteitsdoelen op voor zowel de ecologie als de chemie. Voor het bereiken van deze doelen is het nodig maatregelen te nemen. Het is belangrijk dat de doelen die gekozen worden haalbaar zijn en dat de maatregelen goed gekozen worden, zodat ze effectief bijdragen aan het bereiken van de gekozen doelen. Hiervoor is een analyse nodig van het watersysteem.

STOWA heeft de methodiek van de ecologische sleutelfactoren (ESF'en) ontwikkeld voor zowel stilstaande als stromende wateren. De ecologische ESF'en bieden een kapstok voor het uitvoeren van watersysteemanalyses.

Voor stilstaande wateren zijn er negen sleutelfactoren ontwikkeld, waarbij:

- ESF 1 (productiviteit van het water), 2 (lichtklimaat) & 3 (productiviteit van de waterbodem) gaan over voorwaarden voor het voorkomen van ondergedoken waterplanten;
- ESF 4 (habitatgeschiktheid), 5 (verspreiding) & 6 (verwijdering) gaan over voorwaarden voor specifieke soortgroepen;
- ESF 7 (organische belasting) & 8 (toxiciteit) gaan over specifieke omstandigheden. Deze sleutelfactoren spelen alleen in specifieke situaties een rol;
- ESF 9 (context) gaat over de afweging tussen functies van watersystemen.

De sleutelfactor toxiciteit is toepasbaar voor zowel stilstaande, als stromende wateren.

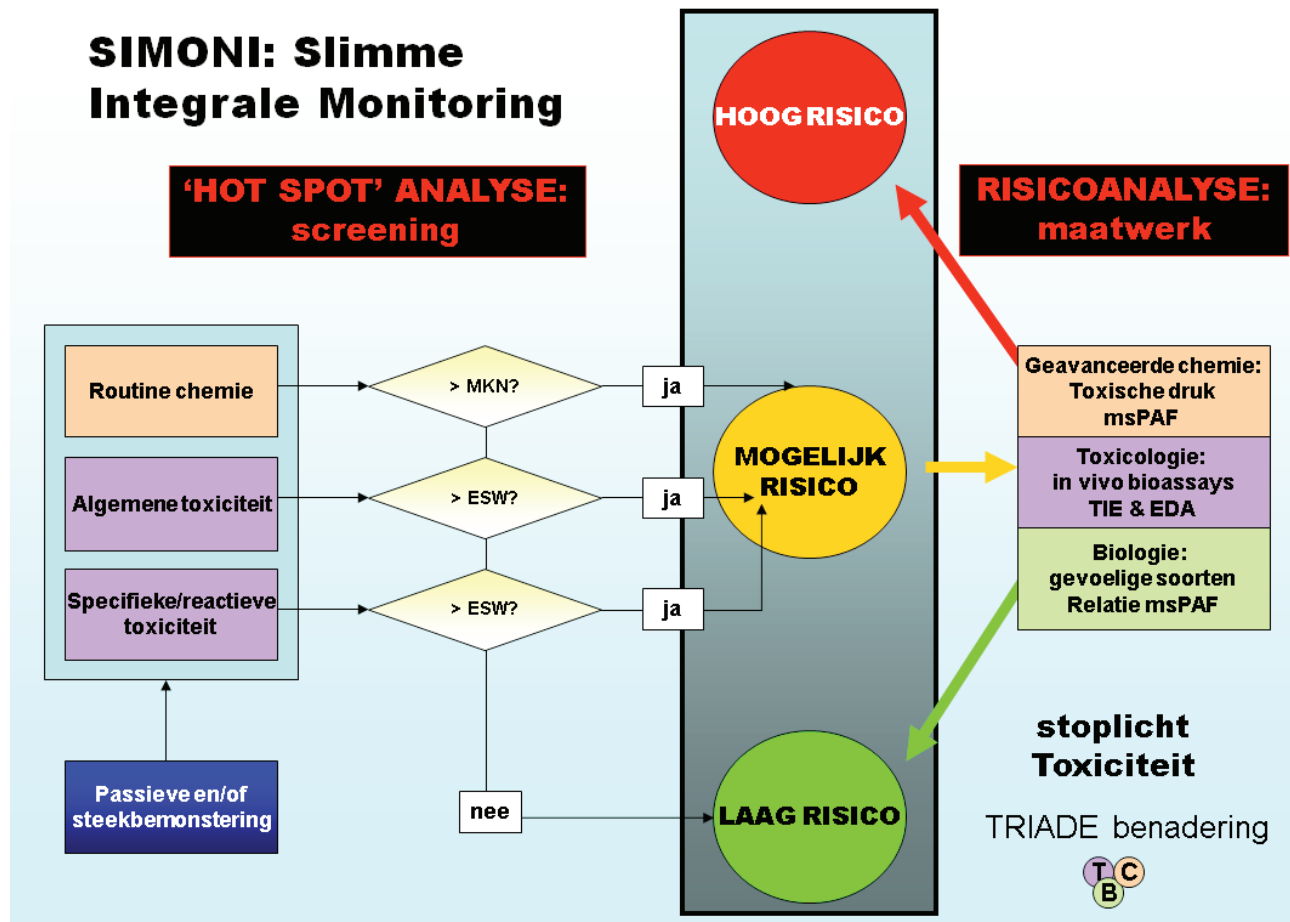
In een serie van vijf rapporten is de sleutelfactor toxiciteit uitgewerkt. De serie bestaat uit een deel 1 hoofdrapport 'Ecologische sleutelfactor toxiciteit: methode voor het in beeld brengen van de effecten van giftige stoffen in het oppervlaktewater.' en vier bijrapporten (deel 2,3,4 en 5).

Voorliggend rapport is rapport 4 uit deze serie en beschrijft algemene procedures (SIMONI) voor het monitoren van de toxiciteit van stoffen. Deze procedures maken onderdeel uit van het toxicologie spoor beschreven in het hoofdrapport. De monitoring wordt uitgevoerd met passieve bemonstering en effectgerichte analyses (bioassays).

Bioassays of bioanalyses zijn biologische proeven met levende dieren en planten (*in vivo*) of weefsels en cellen (*in vitro*), waarmee de biologische activiteit en toxiciteit van milieumonsters kan worden bepaald. Met een goed gekozen batterij bioassays kunnen de mogelijke risico's van het gehele mengsel van in het water aanwezige stoffen (ook afbraakproducten en onbekende stoffen) worden bepaald. Hierdoor krijgt men een meer volledig beeld van de risico's dan met alleen chemische analyses van een beperkte groep stoffen. Er zijn bioassays die de algemene toxiciteit van alle stoffen bepalen, maar er zijn ook bioassays die alleen het effect van een bepaalde groep stoffen meten (zoals hormoonverstoring, DNA beschadiging, dioxine-achtige effecten, etc.). Het kan zijn dat er een sterk effect wordt gevonden dat niet met de resultaten van chemische analyses kan worden verklaard. In dat geval zal een aanvullend onderzoek nodig zijn om de belangrijkste toxische stoffen te identificeren. Het toxicologische spoor van de Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit bestaat uit een combinatie van passieve bemonstering met effectgerichte testen (bioassays). In Figuur 1 zijn schematisch de procedures voor SIMONI strategie (het effectgerichte spoor van ESF toxiciteit) weergegeven.

FIGUUR 1

Schematische weergave van een monitoring volgens de SIMONI strategie.





2 OPDRACHTVERLENING & OPDRACHTVERWERKING

2.1 OPDRACHTVERLENING

Het is belangrijk dat opdrachtgevers volledige gegevens aanleveren over de monsterlocaties en de wensen voor bemonstering en analyses. Om dit in beeld te brengen is een digitaal opdrachtformulier ontworpen (Tabel 1). Een standaard SIMONI onderzoek wordt uitgevoerd met één set siliconenrubbers en 4 POCIS (of Speedisk) samplers, die 6 weken worden blootgesteld. Bij het inzetten van de samplers worden veldmetingen (T, pH, EGV, O₂, doorzicht, diepte) uitgevoerd en wordt een *in situ* test met watervlooien ingezet. Op de extracten van de passieve samplers worden een batterij bioassays en chemische analyses uitgevoerd. Een deel van de PS extracten wordt bewaard voor een eventueel vervolgonderzoek (bijv. uitgebreide chemie). Aanbevolen wordt om bij elke serie passieve samplers ook een blanco mee te nemen! Dit moet in ieder geval gebeuren bij een nieuwe batch passieve samplers (kan worden gecombineerd voor verschillende projecten en opdrachtgevers). Als wordt afgeweken van het standaard SIMONI onderzoek kan dit op het formulier worden aangegeven.

TABEL 1

Standaard opdrachtformulier fase 1 SIMONI onderzoek.

SIMONI 2016 Fase 1							
analyses Waterproef (geen BTW)	Testcodes V	2016 tarief	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	aantal kosten
locatiecode			ZLP001				
X coördinaat			152006				
Y coördinaat			346052				
Passive sampling (1 SR+PRC & 4 POCIS)		950	1				1 € 950,00
Veldmetingen (T, pH, doorzicht, O ₂ , EGV)		0	1				1 € 0,00
PCB-PRC		95					0 € 0,00
PAK		60,30					0 € 0,00
OCB/PCB		107,19	1				1 € 107,19
GC-MS/MS (nieuwe methode)		450,00					
LC-TOF-POS (nieuwe methode)		525,00					
LC-TOF-NEG (nieuwe methode)		425,00					
wateranalyses							
metalen in water (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As, Hg)		165,00					0 € 0,00
nutrienten (Opgelost-P, NO ₂ -N, NO ₃ -N, NH ₄ -N)		125,00					0 € 0,00
DOC		21,96					0 € 0,00
zwevend stof		36,02					0 € 0,00
Totaal							€ 1.057,19
bioassay analyses Waterproef (geen BTW)							aantal kosten
Microtox A		185,00					0 € 0,00
Algencox A		220,00					0 € 0,00
Daphniatox A		394,00					0 € 0,00
Totaal 3 bioassays (Microtox, Algen & Daphnia)		771,00	1				1 € 771,00
Antibiotica SCAN P		125,00	1				1 € 125,00
In situ Daphnia (1x)		180,00	1				1 € 180,00
Totaal							€ 1.076,00
bioassay analyses IVM (incl. BTW)							aantal kosten
Zebrafish embryo bioassay		1000					0 € 0,00
Totaal							€ 0,00
analyses HWL (incl. BTW)							aantal kosten
genesmiddelen		506,7					0 € 0,00
breedspectrum chemie		1089,16					0 € 0,00
Totaal							€ 0,00
analyses BDS (incl. BTW)							aantal kosten
polair omdampen		0	1				1 € 0,00
apolair omdamp/silica		101,8	1				1 € 101,80
DR calux A		101,8	1				1 € 101,80
PAH calux A		101,8	1				1 € 101,80
ER calux P		101,8	1				1 € 101,80
anti-AR calux P		101,8	1				1 € 101,80
GR calux P		101,8	1				1 € 101,80
P53 calux A (met en zonder S9)		101,8	2				2 € 203,60
PPARγ calux A		101,8	1				1 € 101,80
PXR Calux		101,8	1				1 € 101,80
Nrf2 calux A		101,8	1				1 € 101,80
Cytotox calux A		101,8	1				1 € 101,80
Totaal							€ 1.221,60



Er is een standaard SIMONI verdeling van de extracten (totaal is 10 ml) voor de verschillende analyses van de fase 1 TOX-screening (Tabel 2). Bij de standaard verdeling blijft er 5 ml van het extract over voor een eventueel vervolgonderzoek. De hoeveelheid extract die voor een analyse wordt gebruikt is mede bepalend voor de detectiegrenzen. Afhankelijk van de wensen van de opdrachtgever kan de extractverdeling worden aangepast of het aantal PS worden vergroot om de detectiegrenzen te verlagen. Ter illustratie zijn in bijlage I ruwe indicaties gegeven voor de detectiegrenzen van verschillende analyses als 100% (10 ml) of 10% (1 ml) van het totaal PS extract voor deze analyses zou worden gebruikt.

TABEL 2

Standaard verdeling van de passive sampling extracten voor fase 1 SIMONI onderzoek.

Extractverdeling SIMONI fase 1		
Passive sampling	Blanco & PS extracten	
	SR +PRC	POCIS
oplosmiddel	MeOH:ACN extract (ml)	acetone extract (ml)
chemie Waterproef		
PAK		
OCB/PCB (incl PRCs)	1	
NP pesticiden		
Polaira pesticiden		
Totaal	1	0
bioassays Waterproef		
Microtox		
Algentox	2	
Daphniatox		
Antibiotica		3
Totaal	2	3
analyses IVM		
zebravis embryo test		
Totaal	0	0
analyses HWL		
geneesmiddelen		
breedspectrum chemie		
Totaal	0	0
analyses BDS		
non-polar	2	
polar		2
Totaal	2	2
Total extract (ml)	10	10
Total nodig (ml)	5	5
Restant (ml)	5	5



2.1.1 Opdrachtverwerking

Het is belangrijk dat een coördinator binnen het laboratorium (PS coördinator) overzicht houdt over de voortgang van het SIMONI project en zorgt dat de interne en externe communicatie goed verloopt. Dit heeft te maken met de haalbaarheid van de wensen van de opdrachtgever, tijdige updates van (interne en externe) tarieven in het opdrachtformulier, zorgen voor benodigde materialen, planning van het veldwerk en de analyses (intern en extern). Als deze zaken duidelijk zijn kan worden bepaald wanneer de volledige rapportage van het onderzoek kan worden opgeleverd.

2.1.2 Materialen

Als de benodigde samplers niet op voorraad zijn moeten deze worden besteld. De contactgegevens voor het bestellen van de samplers zijn:

- Siliconen rubbers (ca. 100 per stuk = 6 SR bladen + PRC spike) bij Daniel Giesen van Deltares (Daniel.Giesen@deltares.nl);
- POCIS (ca. 35 per stuk) bij Per-Anders Bergqvist van Exposmeter AB (info@exposmeter.se; Tel: +46706440084; adres: Trehorningen 34, SE-92266 Tavelso, Sweden, www.exposmeter.se);
- Sorbisense (ca. 25 per stuk): hubert@sorbisense.com van Sorbisense A/S; Agro Business Park, Niels Pedersens Allé 2, P.O. Box 10, DK-8830 Tjele, Denmark; Tel. + 45 8999 2505 | Fax. +45 8999 2599; www.sorbisense.com; info@sorbisense.com of Bert Baan (Baan om de Aarde);
- Speedisk (ca. 20 per stuk) bij Boom BV (boombv@boomlab.nl; Tel: 0522268700; www.boomlab.nl) en Avantor Performance Materials B.V. (www.avantormaterials.com), Deventer; Tel. 0570-687500;
- Watervlooiën (batch van 10 dagen oud, ca. 200): Ecofide Weesp; Tel: 0294 450282; email: info@ecofide.nl.

2.1.3 Planning veldwerk

De coördinator van het veldwerk zal inplannen wanneer de veldwerkers de samplers uitzetten, controleren en ophalen. Als de opdrachtgever bij het uitzetten van de samplers aanwezig wil zijn om de optimale posities voor de samplers te bepalen moet hierbij rekening worden gehouden bij de planning. De standaard blootstellingstijd van de passieve samplers is zes weken. In overleg kan deze tijd worden aangepast. Langere blootstelling heeft bij de siliconenrubbers weinig zin omdat voor de meeste stoffen al een evenwicht is bereikt en bij de POCIS kan dat storingen veroorzaken door verhoogde matrix effecten bij de analyses. NB. houdt bij de planning van het veldwerk rekening met minimaal twee weken vooraf bestellen van de watervlooiën en het conditioneren van de Speedisks!

2.1.4 Planning labwerk

De coördinator zorgt dat alle interne analyses worden ingepland en maakt afspraken met de externe laboratoria over de planning van de externe analyses en het tijdstip en de wijze van aanlevering van de extracten.



3 VELDWERK

Het veldwerk voor de passive sampling experimenten moet in overleg met de opdrachtgever worden ingepland en uitgevoerd (zie 2.2). De procedures worden hieronder beschreven.

3.1 BENODIGDE MATERIALEN

- SR voor chemie: 6 siliconenrubbers met PRC spike per locatie (in glazen potje);
- Polaire samplers: 4* POCIS of Speedisk** samplers per locatie (in gesloten verpakking);
- Houders (met toebehoren) voor siliconenrubbers en POCIS/Speedisk;
- Pot met watervlooien van 10 dagen oud (kweek van Ecofide); 20 per locatie;
- Twee glazen potjes (ca. 250 ml, zie foto figuur 2) met afdekking van 300 µm zoöplanktongaas per locatie;
- Kooien voor bevestiging PS houders en potjes met watervlooien;
- Touw om kooien vast te maken;
- Tie-wraps voor sluiten kooien en bevestigen houders;
- Geplastificeerde info-kaarten voor in de kooien (zie voorbeeld figuur 3);
- GPS meter;
- Apparatuur voor T, pH en O₂ en geleidbaarheid en doorzicht/diepte metingen;
- Niet scherpe pincet;
- Rubber handschoenen;
- Tissues voor schoonmaken samplers na blootstelling;
- Plastic fles met demi-water;
- Handdoeken;
- Metalen plaat voor schoonmaken samplers na blootstelling;
- Waadbroek voor moeilijk bereikbare plekken;
- Viltstift voor markeren verzamelde monsters;
- Digitale camera;
- Bij uithalen samplers: spons voor reinigen siliconrubbers en POCIS/Speedisk;

* aantal in overleg met opdrachtgever (is belangrijk voor detectiegrenzen).

** Speedisks moeten voor de blootstelling geconditioneerd worden op het lab (zie 4.3).

3.2 INZETTEN PASSIVE SAMPLERS

1. Zoek een geschikte ('*hufteproof*') plek voor het uithangen van de kooi;
2. Maak een foto van de locatie;
3. Noteer de coördinaten;
4. Voer veldmetingen T, pH en O₂, geleidbaarheid, doorzicht en diepte uit en noteer resultaten op monsterformulier (of digitaal);
5. Trek rubber handschoenen aan en was deze in het water van de locatie;
6. Zorg dat alle materialen klaar staan voordat de potten met samplers worden geopend;
7. Bevestig vast een stuk touw aan de kooi;
8. Schud de **6 siliconenrubbers (SR +PRC)** uit de pot op de metalen plaat, haal ze met een (*niet* scherp!) pincet uit elkaar en schuif ze op de houder (figuur 4); vastmaken met pennen en tie-wraps. NB. bewaar de glazen potjes om de SR bij het uithalen in op te bergen;
9. Haal **4 POCIS** uit de verpakking en/of **4 geconditioneerde Speedisks** (zie 4.3.1) uit de bak met demiwater, monteer ze op de houder en schroef deze vast (POCIS, figuur 5); NB. bewaar de verpakking van de POCIS om ze bij het uithalen in op te bergen;
10. Bevestig de beide houders met tie-wraps in de kooi, doe er een info-kaartje bij en sluit af met tie-wraps (figuur 6);



11. Vul 2 glazen potten met water van de locatie. Doe hier per pot 10 watervlooien uit de Ecofide kweek in. Bevestig de potten met watervlooien met tie-wraps in de kooi;
12. Hang de kooi in het water, zodat het geheel zich onder water (niet op de bodem) bevindt;
13. Bevestig het touw aan een (niet goed zichtbaar) punt aan de wal.

FIGUUR 2

Pot met 10 watervlooien voor in situ daphnia bioassay.



FIGUUR 3

Voorbeeld van info-kaart in PS kooien.



FIGUUR 4

Houder met 6 siliconen rubbers.



FIGUUR 5

Houder met 3 POCIS.



**FIGUUR 6**

Bevestiging van de passieve samplers en potjes met watervlooien in de kooien.



3.2.1 Tellen watervlooien (na precies 1 week)

1. Haal de kooi uit het water en controleer of alles in orde is;
2. Verwijder de twee potten met watervlooien uit de kooien;
3. Sluit de kooi af en hang hem terug in het water;
4. Leeg de eerste pot watervlooien in een witte plastic bak en tel de levende oude (grote) watervlooien;
5. Maak een schatting van het aantal jonge (kleine) watervlooien: <10 = weinig; 10-30 is gemiddeld; >30 = veel;
6. Doe hetzelfde als 4 en 5 voor de tweede pot watervlooien;
7. Noteer alle gegevens.

3.2.2 Controleren passieve samplers (na ca. 3 weken)

8. Kijk of de kooi nog aanwezig is op de locatie;
9. Haal de kooi uit het water en controleer of alles in orde is;
10. Maak een foto als er dingen niet in orde zijn en probeer het probleem te verhelpen;
11. Neem na afloop van de tocht contact op met de PS coördinator over verloren of beschadigde samplers; deze overlegt over eventuele vervanging met de opdrachtgever.

3.2.3 Uithalen passieve samplers

1. Haal de kooi uit het water en maak evt. een foto, zodat de slib/biofilm op de samplers zichtbaar is (kan van invloed zijn op de uitwisselingssnelheid);
2. Trek rubber handschoenen aan en was deze met water uit de locatie;
3. Knip de tie-wraps open en haal de houders voorzichtig uit de kooi, zonder de samplers te beschadigen;
4. Haal de siliconenrubbers voorzichtig van de houders en leg ze op de metalen plaat;
5. Maak de samplers schoon (slib en biofouling zoveel mogelijk verwijderen) met tissues/spons, liefst met gebruik van water uit de locatie;
6. Leg de 6 samplers op elkaar en doe ze in een gecodeerde glazen pot of plastic zak (code S-...);



7. Haal de POCIS/Speedisk samplers voorzichtig uit de houders en leg ze op de metalen plaat;
8. Maak de samplers schoon (slib en biofouling) met tissues/spons met water uit de locatie; dit moet bij POCIS heel voorzichtig gebeuren om beschadiging van de membranen te voorkomen;
9. Doe de POCIS/Speedisk samplers terug in de originele verpakking en codeer deze (code P...);
10. De uitgetrokken passieve samplers (silicone rubber, POCIS en Speedisk) worden op het lab opgeslagen in de -20°C vriezer.



4 EXTRACTIES & MONSTERVERDELING

4.1 EXTRACTIE SILICONENRUBBERS (SR)

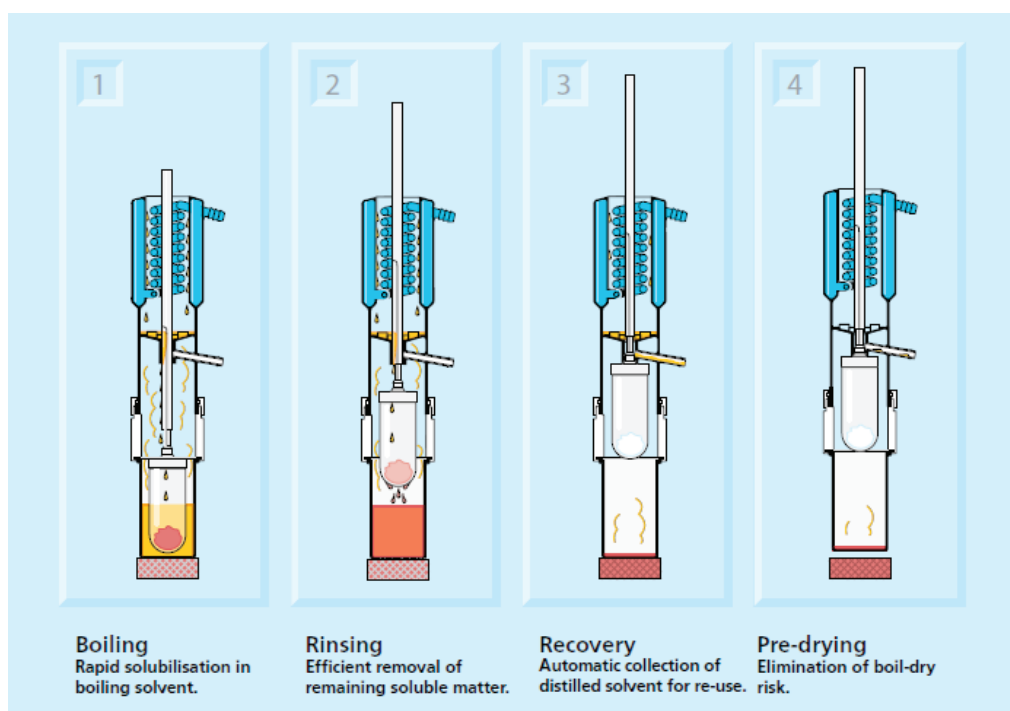
4.1.1 Voorbereiding materialen

1. Bereid extractiemix oplosmiddel MeOH:acetonitril 1:2 (V/V).
Totaal volume bij 6 cups per serie = spoel vol. + Extractie vol. = 50 ml / cup * 6 + (80 ml / cup + 40 ml spoelen / cup) * 6 = 1020 ml / serie;
2. Voorbereiden Soxtec apparaat: schakel watervoorziening aan, leeg het verzamelvat;
3. Commercieel verkrijgbare Soxtec extractiehulzen (ook de 'schone' typen) kunnen blanco effecten veroorzaken in sommige bioassays. Ze moeten daarom voor gebruik worden gespoeld met een kort Soxtec programma;
4. Instellen Soxtec procedure voor het spoelen van hulzen: voeg 50 ml oplosmiddel mengsel toe in aluminium beker, voeg 4-5 kooksteentjes toe; selecteer Soxtec programma 2: 30 min koken bij 150°C, 30 min spoelen, 5 min recovery, 1 min drogen.

4.1.2 Soxtec extractie

FIGUUR 7

Principe van de Soxtec® extractie: koken, spoelen, recovery en drogen.



1. Monstervoorbereiding (gebruik altijd handschoenen om de SR bladen en extractiehulzen beet te pakken!): haal siliconenrubbers uit de vriezer, en leg ze op een tissue. Eventueel achtergebleven vuilresten verwijderen met een spons met milliQ water, SR bladen voorzichtig met vochtige tissue schoonmaken en water verwijderen met droge tissue; bladen 15 minuten aan lucht laten drogen. Knip de 6 siliconenrubber bladen (1 locatie) in stukjes en doe ze in één Soxtec extractiehuls;



2. Het principe van de Soxtec® extractie is schematisch weergegeven in figuur 7. Start de extracties met de procedure blanco's van de SR met "performance reference compounds" (PRC's);
3. Controleer het Soxtec apparaat: watervoorziening staat aan, verzamelvat is leeg;
4. Extractieprocedure: voeg 80 ml extractiemix (4.1.1) toe aan aluminium cup, voeg 5-6 kooksteentjes toe; selecteer Soxtec programma 1: 120 min koken bij 180°C, 30 min spoelen, 5 min recovery, 1 min drogen;
5. Tijdens de extractie kunnen de samples voor de volgende serie monsters worden klaargemaakt (zie punt 1);
6. Na de extractie het apparaat af laten koelen tot ca 100 °C. Daarna de aluminium cups uitnemen en op vaste volgorde in het verzamelrek plaatsen. Plaats de cups voor de volgende serie in het apparaat en start de extractie volgens punt 4;
7. Breng de extracten met een glazen pipet in de gelabelde 100 ml flessen. Spoel de aluminium cups na met 2x 10 ml extractiemix en bewaar de verzamelde extracten in de vriezer tot verdere verwerking;
8. Weeg de siliconenrubbers (totaal van 6 bladen) na de extractie en noteer het totaalgewicht.

4.1.3 TurboVap indamping

1. Breng het ruwe extract over in een TurboVap buis en spoel de flessen na met 2x 10 ml extractiemix (4.1.1);
2. Controleer het waterniveau van de TurboVap. Het niveau moet ongeveer even hoog zijn als het vloeistofniveau in de buizen. Indien nodig (bij ontsnappende dampen) moeten de buizen worden afgedekt met aluminium folie;
3. Schakel het TurboVap apparaat aan, zet de temperatuur op 45°C en de eindtijd op 60 minuten; wacht tot de ingestelde temperatuur van het waterbad is bereikt; zet de stikstof aan op 20-25 psi; druk op de startknop en corrigeer de stikstoftoevoer naar 15-20 psi (de optimale druk voor indampen van 200ml); Damp het extract van ca. 200 ml in naar ca. 5 ml (bovenkant van de tip van de buis);
4. Breng het ingedampte extract met een glazen pipet over in een conische buis, spoel de buis na met 2x 5 ml extractiemix (4.1.1); extract verder indampen op 30°C waterbad onder zachte stikstofstroom;
5. Breng het eindvolume van de extracten op precies 10 ml.

4.2 EXTRACTIE POCIS

1. Samplers uit de vriezer halen en op kamertemperatuur laten komen (ca. 15-20 min);
2. Schroef POCIS ringen uit elkaar met steeksleutels en/of baco en open de ringen;
3. Breng het sorptiemiddel (OASIS HLB poeder) zo kwantitatief mogelijk in een schoon bekersglas; spoel de membranen na met ultrapure water;
4. Weeg lege SPE kolommen met 2 PE 'frits' (ca. 3.4 gram) en noteer de gewichten. Plaats de 1e PE frit onder in de kolom;
5. Plaats de lege SPE kolommen op de polypropyleen houders van de vacuümbak en breng de POCIS sorptiematerialen kwantitatief in deze kolommen;
6. Zet de vacuümpomp aan en laat het water uit de kolommen lopen tot ze droog zijn;
7. Als het water door de kolom gelopen is wordt het sorbent in de kolom afgedekt met de 2e PE frit, zodat het sorbent door 2 PE frits is ingesloten tijdens de centrifugatie;
8. Centrifugeer de kolom 15 minuten bij 2000 rpm om het water verder te verwijderen. Droog de kolommen daarna nog 1 uur onder een stikstofstroom;
9. Weeg de gedroogde kolommen om het gewicht van het sorptiemateriaal te berekenen;
10. Plaats schone gecodeerde conische 10 ml buizen in een rek;
11. Elueer de SPE kolommen 3x met 3 ml aceton; elke keer de aceton in het kolommateriaal laten lopen en 5 minuten in evenwicht laten komen voor een optimale elutie;
12. Breng het eindvolume van de extracten op precies 10 ml.

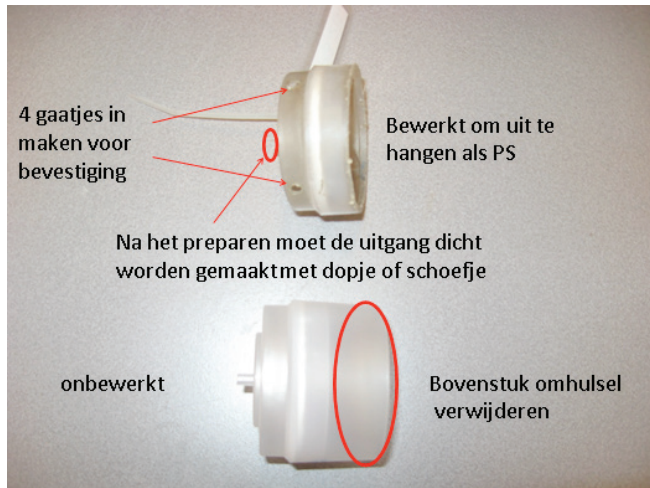
4.3 CONDITIONERING EN EXTRACTIE SPEEDISK

4.3.1 Prepareren Speedisk voor gebruik als passieve sampler

In figuur 8 is aangegeven hoe de Speedisk moet worden bewerkt tot passieve sampler.

FIGUUR 8

Bewerkingen om de Speedisk geschikt te maken als passieve sampler.



4.3.2 Conditioneren Speedisk

1. Zet de speedisks op het extractie station;
2. Breng 15 ml dichloormethaan op de disk en laat deze 1 minuut inwerken;
3. Elueer daarna druppelsgewijs het oplosmiddelen door de disk;
4. Herhaal deze procedure met 10 ml aceton, daarna 10 ml MeOH en daarna 20 ml milli-Q water; Bij de laatste stap met MilliQ moet er steeds een laagje water op de speedisk blijven staan, hij mag dus niet droogvallen;
5. Bewaar de samplers onder water in een glazen pot met RWS inlay voor dat deze uitgehangen worden in het veld. Bewaar de samplers gekoeld bij 1-5°C en op een donkerplek.

4.3.3 Extractie Speedisk

1. Na bemonstering wordt de Speedisk gereinigd met demiwater en gedroogd met een tissue. De Speedisk wordt daarna nog 2 uur in de 30°C oven gedroogd. Het sorbent wordt 15 minuten gedroogd met lucht door vacuüm afzuiging;
2. De extractie wordt vervolgens uitgevoerd met kleine porties solvent die alle eerst minstens een minuut in het sorbent kunnen trekken voordat ze druppelsgewijs worden geëlueerd;
3. De volgorde van de sorbent eluties is als volgt:
 - 4 x 5 ml aceton
 - 1x5 ml en 2x3 ml dichloormethaan (DCM);

Voor de chemische analyses kunnen deze extracten apart worden geanalyseerd, maar voor de bioassay analyses worden ze gecombineerd.

4.4 VERDELING VAN DE EINDEEXTRACTEN

Verdeel het extract in porties voor de verschillende analyses (zie tabel 2). De volumina van de porties zijn door de PS coördinator bepaald, in overleg met de opdrachtgever. Documenteer en label alle deextracten goed.



5 MONSTERVERVOORBEREIDING CHEMISCHE ANALYSES

5.1 ANALYSES IN APOLAIRE SILICONENRUBBER (SR) EXTRACTEN

5.1.1 Monstervervoorbereiding PCB/OCB/PAK en PCB-PRC analyses

1. Bevestig een glazen bol op een 10 ml buis, en voeg hieraan 1 ml ruw SR extract, 40 ml petroleum ether (PE) en een kooksteentje toe. Schud 30 seconden met de hand. De indamp en clean-up procedures zijn vergelijkbaar met die van het Waterproef SPV A4700 voor PCB/OCB/PAK, met enkele specifieke aanpassingen;
2. Damp in met een Kuderna-Danish concentratie bij 80°C tot ca. 5 ml (duur ca. 15 minuten). Spoel en verwijder de glazen bol en damp verder in op een 30°C waterbad onder stikstof tot ca. 2 ml;
3. Gebruik een standaard alumina (Al₂O₃) kolom voor de clean-up. Breng 2 ml van het extract van punt 2 op de alumina kolom en spoel de buis na met 3x 2 ml PE. Voeg 6 ml PE toe voor de elutie en vang de gezuiverde extracten op in schone gelabelde 15 ml buizen;
4. Damp het gezuiverde extract in op een 30°C waterbad tot precies 1 ml. Zet 2 schone crimp vials met klaar, vial 1 met insert, vial 2 zonder insert:
 - vial 1: voeg 450 µl van het zuivere extract en 50 µl interne standaard (IS) toe met een glazen injectiespuit. Meng de oplossingen goed met een vortex mixer;
 - vial 2: breng het resterende zuivere extract (ca. 550 µl) met een pasteur pipet in de vial, die als reserve wordt gebruikt. Na de toevoeging wordt een cap op de vial bevestigd;
5. De vials worden bewaard in de 4°C koelkast;
6. Analyseer de extracten op PCB's (inclusief de PRC PCB's), OCB's en PAK's volgens de Waterproef SPV A4700 (PCB/OCB/PAK).

5.1.2 Monstervervoorbereiding NP pesticide analyse

1. De extractie wordt uitgevoerd volgens de Waterproef SPV A4550 (NP pesticiden). Deze procedure is hieronder kort samengevat;
2. Voor het conditioneren van de SPE kolom wordt 6 ml dichloormethaan (DCM) toegevoegd. Laat het DCM uit de kolom elueren. Kolom daarna ca. 15 seconden drogen met lucht onder vacuüm. Hierna wordt de kolom 5 minuten geconditioneerd met 5 ml methanol (MeOH). Als het MeOH doorloopt mag de kolom niet drooglopen, dus het vloeistofniveau moet altijd iets boven het sorbent blijven! Vervolgens wordt de kolom 10 minuten geconditioneerd met 5 ml verse methanol (MeOH). Na het conditioneren de MeOH door laten lopen (kolom niet droog!). De doorgelopen vloeistoffen worden afgevoerd met de halogeenhoudende organische stoffen. De kolom wordt daarna twee maal gespoeld met 5 ml kraanwater. Bij de 2e spoeling moet het waterniveau na doorspoelen ca. 3 cm boven het sorbent blijven; de kolom wordt zo 15 minuten geconditioneerd;
3. Spoel de kolom voor met 5 ml DCM, zuig de vloeistof af onder licht vacuüm tot er geen DCM meer in de kolom is, maar de kolom mag niet geheel droog worden;
4. Zet de kolom op de houder en zet er een schone, gecodeerde 10 ml buis onder om het extract te verzamelen. Breng 1 ml van het ruwe SR +PRC extract op de geconditioneerde SPE kolom. NB. tijdens de elutie mag de vacuümdruk niet hoger zijn dan 50 kPa! Voeg 3 ml DCM toe, en laat het doorlopen tot net boven het sorbent. Laat de kolom 10 minuten rusten. Voeg opnieuw 3 ml DCM toe en laat het doorlopen tot net boven het sorbent. Laat de kolom weer 10 minuten rusten. Voeg voor de derde keer 3 ml DCM toe en laat het doorlopen tot net boven het sorbent. Laat de kolom weer 10 minuten rusten. Laat vervolgens alle DCM onder vacuüm uit de kolom lopen;
6. Damp het extract op een waterbad van 30°C in tot ca. 0,8 ml. Voeg hieraan 150 µl interne standaard (IS) toe. Vul het extract aan tot 1 ml met DCM en vervolgens met hexaan/olijfolie tot 2 ml en homogeniseer het extract op de vortex. Filtreer het extract met een 13 mm HPLC injectiespuit waarop een 0,45 µl PTFE filter is bevestigd en verdeel het over 2 vials met inserts;
5. De vials worden tot de analyse bewaard bij 4°C;
6. Analyseer de extracten op NP pesticiden volgens de Waterproef SPV A4550 (NP pesticiden).



5.2 ANALYSES POLAIRE POCIS EXTRACTEN

5.2.1 Monstervoorbewerking polaire pesticiden analyses

Negatieve modus:

1. Damp 1 ml van het ruwe POCIS extract bij 30°C voorzichtig droog onder stikstofstroom;
2. Voeg 400 µl methanol en 600 µl HPLC water toe en meng met een vortex mixer;
3. Filtreer het mengsel over een 0,45 µm PTFE filter en breng het over in een 1 ml vial;
4. Analyseer de extracten op polaire pesticiden volgens de Waterproef **SPV A4680** (negatieve polaire pesticiden).

Positieve modus:

1. Damp 1 ml van het ruwe POCIS extract bij 30°C voorzichtig droog onder stikstofstroom;
2. Voeg 1000 µl methanol toe en meng met een vortex mixer;
3. Filtreer het mengsel over een 0,45 µm PTFE filter en verdeel het over twee 2 ml vials met inserts;
4. Analyseer de extracten op polaire pesticiden volgens de Waterproef **SPV A670** (positieve polaire pesticiden).

5.2.2 Monstervoorbewerking medicijnen analyses

1. Damp 1 ml van het ruwe POCIS-Speedisk extract bij 30°C voorzichtig droog onder stikstof;
2. Los het esidu op in 100 µl methanol (ultra-LC/MS grade, Biosolve) plus 1 ml MilliQ water;
3. Analyseer de extracten op medicijnresten met ultra-HPLC (Waters Acquity), gecombineerd met een Quattro Xevo triple-quadrupole massa selectieve detector (Waters Micromass) met electrospray ionizatie.



6 MONSTERVEROORBERGING BIOASSAY ANALYSES

6.1 ANALYSES APOLAIRE SR EXTRACTEN

6.1.1 Monsterveroorbewerking algemene acute toxiciteit bioassays

1. Breng 2 ml van het ruwe SR extract over in een 10 ml conische vial;
2. Damp het extract bij 30°C voorzichtig droog onder een zachte stikstofstroom;
3. Voeg 5 ml Dutch Standard Water (DSW*) toe aan het residu en meng met een vortex mixer;
4. Breng het extract over in een schone gecodeerde 100 ml bruine fles;
5. Herhaal stappen 3 en 4 twee maal met 2x 5 ml DSW;
6. Vul het DSW mengsel aan tot een eindvolume van 60 ml;
7. Analyseer het DSW mengsel met Microtox, Algentox en Daphniatox volgens gevalideerde voorschriften (respectievelijk Waterproef SPV A5100, SPV A5110 en SPV A5120);
Het recept voor DSW is gegeven in bijlage 2.

6.1.2 Monsterveroorbewerking CALUX analyses

De extracten voor de CALUX analyses worden niet zelf voorbehandeld, maar worden in het oorspronkelijke oplosmiddel (MeOH:acetonitril 1:2) naar BDS gestuurd. BDS rekent geen kosten voor het omdampen naar DMSO. Voor een voorbehandeling van de apolaire extracten met een zure silica-kolom worden wel kosten in rekening gebracht. De zure silica clean-up wordt gebruikt om de afbreekbare organische stoffen zoals PAK's te verwijderen, zodat deze de effecten van de persistente stoffen (PCB's, dioxines) bij de DR CALUX niet verstoren.

6.2 ANALYSES POLAIRE POCIS/SPEEDISK EXTRACTEN

6.2.1 Monsterveroorbewerking Water-SCAN analyse antibiotica activiteit

1. Breng 3 ml van het ruwe POCIS/Speedisk extract over in een 10 ml conische vial;
2. Damp het extract bij 30°C voorzichtig droog onder een zachte stikstofstroom;
3. Voeg 1.5 ml demiwater en 1.5 ml methanol toe en meng met een vortex mixer;
4. Breng het extract over in een 4 ml vial;
5. Analyseer de extracten op antibiotica activiteit volgens de SPV A4760 (RIKILT Water-SCAN).

6.2.2 Monsterveroorbewerking CALUX analyses

De extracten voor de CALUX analyses worden niet zelf voorbehandeld, maar worden in het oorspronkelijke oplosmiddel (aceton) naar BDS gestuurd. BDS rekent geen kosten voor het omdampen naar DMSO.



7 RAPPORTAGE LABORATORIUM

De gehalten van stoffen en effecten (bioassays) in de passive sampler extracten kunnen goed worden geanalyseerd. De omrekening van de gehalten in de PS extracten naar waterconcentraties zijn echter (met uitzondering van stofgehalten in siliconenrubbers) onmogelijk exact te bepalen. Omdat niet bekend is welke stoffen het effect in een bioassay veroorzaken kan geen exacte omrekening van toxische equivalenten of toxic units naar waterconcentraties worden gemaakt. Door een gemiddelde uitwisselingssnelheid en verdelingscoëfficiënt te hanteren kan een indicatie worden gegeven van de waterconcentraties. Hierbij moet worden aangetekend dat deze resultaten semi- kwantitatief zijn en dus alleen een indicatie kan worden gegeven over het voorkomen van de effecten in het water met een uitspraak over hoge of lage toxiciteit. De resultaten in de PS extracten worden door het SIMONI model omgerekend naar globale waterconcentraties. Er zijn zes standaard rapportage formulieren ontworpen, die zodanig zijn ingericht dat de data rechtstreeks in het SIMONI model kunnen worden gekopieerd. Deze rapportage formulieren worden als bijlage bij deze procedures geleverd. Als wordt gezorgd dat de volgorde van de locaties in alle rapportformulieren hetzelfde is kunnen de gegevens uit de Excel files rechtstreeks worden gekopieerd naar het SIMONI 1.2 model. In elk invulblad is een veld voor opmerkingen opgenomen, waarin eventuele afwijkingen van de standaard procedures worden vermeld.

7.1 VELDGEGEVENS

De gegevens die van het veldwerk moeten worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 3.

TABEL 3

Rapportage van veldgegevens.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
Locatie code		code
Coördinaten	X	X coördinaat
	Y	Y coördinaat
passive sampling data	inzetten PS	datum
	uithalen PS	datum
Watervlooiën	ingezet	aantal
	levend uit	aantal
	sterfte [%]	<wordt berekend>
	jongen	aantal schatting
Veldmetingen	pH	
	O ₂	mg/L
		%
	EGV	µS
	Temp	°C
	doorzicht	cm
	diepte	cm
Opmerkingen		

7.2 EXTRACTIE VAN DE PASSIVE SAMPLERS

De gegevens die over de extracties van de passive samplers moeten worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 4. Heet aantal POCIS/Speedisk samplers wordt ingevoerd en van de siliconenrubbers word de uitwisselingscoëfficiënt berekend door de gehalten van de teruggevonden performance reference compounds (PRCs) in te voeren in een Excel model van Foppe Smedes (Deltares).

**TABEL 4**

Rapportage van extractiegegevens.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
LOC code		code
POCIS/Speedisk	aantal	#
	V extract	ml
Siliconen rubbers	Rs	L/dag
	V extract	ml
Opmerkingen		

7.3 ALGEMENE TOXICITEIT

De algemene toxiciteit, bepaald in extracten van siliconenrubbers, wordt gerapporteerd als TU per ml DSW extract. De gegevens die worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 5. Hierbij wordt ook aangegeven welk deel van het extract gebruikt is en in hoeveel ml DSW dat is opgenomen.

TABEL 5

Rapportage van gegevens algemene toxiciteit.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
LOC code		code
Volume gebruikt SR extract		ml
Volume DSW		ml
Microtox	in DSW	TU/ml DSW
Algentox	in DSW	TU/ml DSW
Daphniatox	in DSW	TU/ml DSW
Opmerkingen		

7.4 SPECIFIEKE TOXICITEIT APOLAIRE SILICONENRUBBER EXTRACTEN

De resultaten van de bioassay metingen in extracten van siliconenrubbers worden per ml extract (MeOH:ACN) gerapporteerd. De gegevens die worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 6. Hierbij wordt ook aangegeven welk deel van het extract door BDS gebruikt is en in hoeveel µl DMSO dat is opgenomen.

TABEL 6

Rapportage van gegevens specifieke toxiciteit apolaire stoffen.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
Locatie code		code
Volume SR extract naar BDS	voor CALUX	ml
Volume DMSO	BDS	µl
Cytotox CALUX	SR extract	laagste verdunning met effect
DR CALUX	SR extract	pg TEQ/ml
PAH CALUX	SR extract	ng BEQ/ml
PPAR γ CALUX	SR extract	ng REQ/ml
PXR CALUX	SR extract	µg NEQ/ml
Nrf2 CALUX	SR extract	µg CEQ/ml
p53 CALUX	SR extract	laagste verdunning met effect
p53+S9 CALUX	SR extract	laagste verdunning met effect
Opmerkingen		



7.5 BIOASSAY ANALYSES POCIS/SPEEDISK

De resultaten van de bioassay metingen in extracten van POCIS/Speedisk worden per ml extract (aceton) gerapporteerd. De gegevens die worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 7. Hierbij wordt ook aangegeven welk deel van het extract door BDS gebruikt is en in hoeveel µl DMSO dat is opgenomen.

TABEL 7

Rapportage van gegevens specifieke toxiciteit polaire stoffen.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
LOC code		code
Volume POCIS/Speedisk extract naar BDS	voor CALUX	ml
Volume DMSO	BDS	µl
Cytotox CALUX	P/S extract	laagste verdunning met effect
ER CALUX	P/S extract	ng EEQ/ml
anti-AR CALUX	P/S extract	µg FEQ/ml
GR CALUX	P/S extract	ng DEQ/ml
Opmerkingen		

7.6 ANTIBIOTICA ACTIVITEITEN

De resultaten van de antibiotica activiteitsmetingen in extracten van POCIS/Speedisk worden per ml extract (aceton) gerapporteerd. De gegevens die worden gerapporteerd zijn weergegeven in tabel 7.

TABEL 8

Rapportage van gegevens antibiotica activiteit.

Parameter	specifiek	eenheid
Labcode		code
Locatie naam		naam
LOC code		code
Tetracyclines	P/S extract	ng OEQ/ml
Quinolonen	P/S extract	ng FEQ/ml
Macroliden + B-Lactamen	P/S extract	ng PEQ/ml
Sulfonamiden	P/S extract	ng SEQ/ml
Amoniglycosiden	P/S extract	ng NEQ/ml
Opmerkingen		

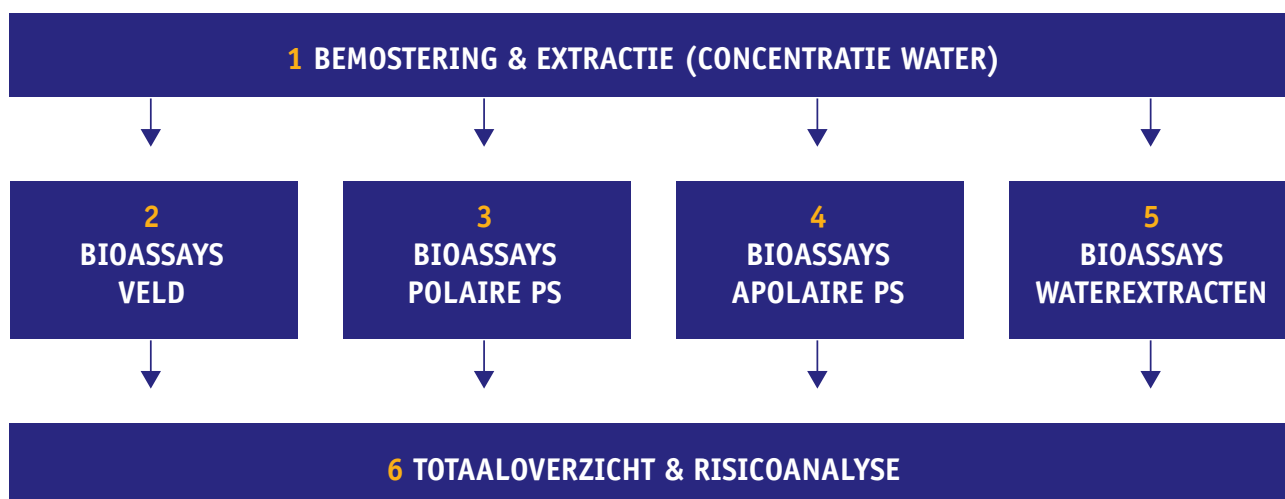


8 DATAVERWERKING MET HET 1.2 MODEL

Als de gegevens door het laboratorium worden aangeleverd in de formaten zoals in sectie 7 is aangegeven kunnen ze rechtstreeks worden gekopieerd naar de gele velden in het SIMONI 1.2 model, dat een aantal berekeningen uitvoert om een risicoanalyse te berekenen. In de eerste plaats wordt een schatting gemaakt van de waterconcentraties van de effecten op basis van de bioassay resultaten in de passieve sampler extracten. Deze resultaten worden vergeleken met de effect-sigitaalwaarden (ESW), die een indicatie zijn van mogelijke effecten op de ecologie. Ten slotte wordt op basis de resultaten van alle uitgevoerde bioassays een overall milieurisico berekend. De theorie achter deze berekeningen is beschreven in het STOWA-rapport van de Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit en het achtergrond document van dat rapport (STOWA, 2015; Van der Oost & Sileno, 2015). Het SIMONI model bestaat uit drie lagen (Figuur 7). De Excel file met het model wordt als bijlage bij deze procedures geleverd.

FIGUUR 9

Schematische voorstelling van het SIMONI model voor effectgerichte risicoanalyse.



8.1 EERSTE LAAG: LOCATIES, BEMONSTERING EN EXTRACTIE

In de eerste laag van het rekenmodel (figuur 10, nr. 1: blad <bemonstering> in het SIMONI model) worden alle gegevens ingevoerd over de bemonstering (locaties, GIS coördinaten, data inzetten en uithalen, hoeveelheden, duur passieve sampling, aantal passieve samplers, passieve sampler uitwisselingssnelheden) en de extracties (eindvolume). Met deze gegevens worden vervolgens de concentratiefactoren van de monsters geschat. De geel gekleurde velden zijn voor het invoeren van data uit de rapportages van secties 7.1 tot 7.6. In de blauw gekleurde velden worden eerder ingevoerde of vergelijkbare data herhaald maar kunnen ook afwijkende data worden ingevoerd (aangegeven bij de opmerkingen in de dataformulieren). De groene velden zijn de resultaten van de berekeningen die door het model worden uitgevoerd.

FIGUUR 10

Uitsnede uit het SIMONI 1.2 model – invoer van gegevens over locaties, passive sampling en extracties & berekening concentratiefactoren.

1. Bemonstering & extracties

Locaties	Code	Coördinaten		datum		
velden niet verplaatsen!		X	Y	inzetten PS + watermonster	uithalen PS	
				datum	datum	
1	1	x	y			
2	2	x	y			
3	3	x	y			
4	4	x	y			
5	5	x	y			
6	6	x	y			
7	7	x	y			
8	8	x	y			
9	9	x	y			
10	10	x	y			

invoeren

herhaling of invoeren

modelberekening

Water steekmonster	V water L	V extract ml	concentratiefactor
1			#DEEL/0!
2	0	0	#DEEL/0!
3	0	0	#DEEL/0!
4	0	0	#DEEL/0!
5	0	0	#DEEL/0!
6	0	0	#DEEL/0!
7	0	0	#DEEL/0!
8	0	0	#DEEL/0!
9	0	0	#DEEL/0!
10	0	0	#DEEL/0!

POCIS	#POCIS aantal	blootstelling dagen	V water L	V extract ml	concentratiefactor
1		#WAARDE!	#WAARDE!		#WAARDE!
2	0	0	0	0	#DEEL/0!
3	0	0	0	0	#DEEL/0!
4	0	0	0	0	#DEEL/0!
5	0	0	0	0	#DEEL/0!
6	0	0	0	0	#DEEL/0!
7	0	0	0	0	#DEEL/0!
8	0	0	0	0	#DEEL/0!
9	0	0	0	0	#DEEL/0!
10	0	0	0	0	#DEEL/0!

Siliconen rubber	Rs L/dag	blootstelling dagen	V water L	V extract ml	concentratiefactor
1		#WAARDE!	#WAARDE!		#WAARDE!
2	0	0	0	0	#DEEL/0!
3	0	0	0	0	#DEEL/0!
4	0	0	0	0	#DEEL/0!
5	0	0	0	0	#DEEL/0!
6	0	0	0	0	#DEEL/0!
7	0	0	0	0	#DEEL/0!
8	0	0	0	0	#DEEL/0!
9	0	0	0	0	#DEEL/0!
10	0	0	0	0	#DEEL/0!

8.2 TWEEDE LAAG: ANALYSE BIOASSAY-RESULTATEN

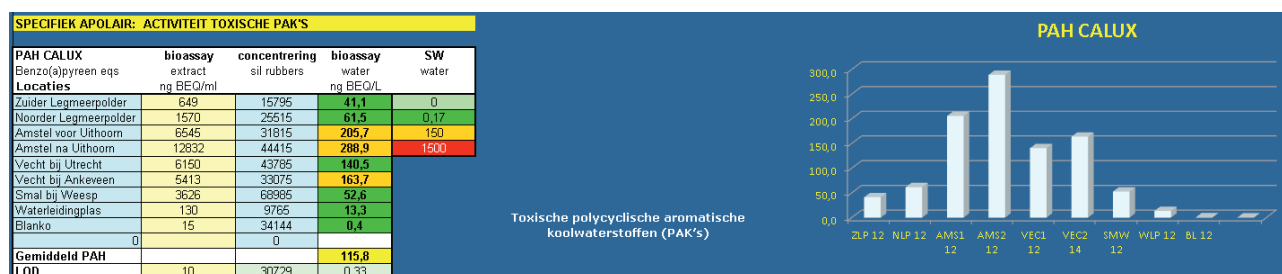
In de tweede laag van het model worden de bioassay resultaten ingevoerd. Deze laag is in vier onderdelen opgesplitst gericht op bioassays, die in het veld worden uitgevoerd (Figuur 11, nr. 2: blad <veld> in het SIMONI model) en bioassays die in het laboratorium worden uitgevoerd (nrs. 3: blad <POCIS>, 4: blad <Silrubbers> en 5: blad <Water> in het SIMONI model). Deze laatste groep is dus opgedeeld in bioassays met extracten van polaire passieve samplers (3) en apolaire passieve samplers (4), maar kan ook worden gebruikt als de voorkeur wordt gegeven aan extracten van steekmonsters (5). Het model berekent de ecologische risico's per eindpunt door het resultaat van de bioassay analyse in het extract, met de in het blad <bemonstering> ingevoerde gegevens, om te rekenen naar de geschatte watervolumes en dat te toetsen aan de effect-sigitaalwaarde (ESW) die onderscheid maakt tussen een laag en een potentieel ecologisch risico. Bij een overschrijding van de ESW wordt het resultaat in de tabel oranje gekleurd (figuur 11). Is deze overschrijding meer dan een factor 10 dan zal het veld rood kleuren. Deze rode kleur voor een individueel bioassay resultaat moet niet worden verward met de beoordeling rood (hoog risico) voor de betreffende locatie in het ESF toxiciteit stoplicht, want die kan alleen na chemische bevestiging voorkomen.

Het model zet de berekende resultaten uit in een staafdiagram. In figuur 11 is een illustratie van de tweede laag van het model, waar de invoer van de resultaten van de PAH-CALUX analyse zijn weergegeven (lichtgele vlakken). Op deze manier worden alle bioassay resultaten vergeleken met de ESW. Bij een overschrijding van de signaalwaarde voor algemene toxiciteit kan niets worden gezegd over de mogelijke oorzaken omdat alle stoffen een respons kunnen veroorzaken in deze bioassays. Bij bioassays voor specifieke toxiciteit is echter voor iedere bioassay bekend welke stofgroepen de effecten kunnen veroorzaken (zie rapport deel 5). De stofgroepen die een mogelijke oorzaak van het effect zijn worden in het model weergegeven tussen tabel en grafiek.



FIGUUR 11

Uitsnede uit het SIMONI 1.2 model - berekening van risico's van reactieve PAK-verbindingen met de PAH-CALUX. BEQ = Benzo[a]pyreen equivalenten, LOD = Detectielimiet.



8.3 DERDE LAAG: EVALUATIE TOTAALBEELD

Als er slechts bij één of twee bioassays een lichte overschrijding van de signaalwaarde wordt waargenomen, hoeft dat niet meteen een verhoogd ecologisch risico te betekenen. Als zo'n lichte overschrijding echter bij een groot aantal bioassays wordt aangetroffen, worden de indicaties steeds sterker. Daarom is er in de derde laag van het model (Figuur 7, nr. 6: blad <Totaal PS> in het SIMONI model) een eenvoudige formule toegepast, waarmee het gezamenlijke effect van alle uitgevoerde bioassays wordt gekwantificeerd. Hiermee kan een indicatie van het gezamenlijke ecologische risico van alle aanwezige organische microverontreinigingen worden gegeven. In het model hebben alle bioassays een gewichtsfactor gekregen (2 voor algemene toxiciteit en 1 voor specifieke effecten). SIMONI 1.2 deelt de bioassay resultaten door de bijbehorende ESW en vermenigvuldigt ze met deze weegfactor. Deze resultaten worden vervolgens voor alle uitgevoerde bioassays opgeteld en gedeeld door het totale bioassay gewicht:

$$\text{SIMONI score} = \frac{\sum \frac{\text{Effect bioassys}}{\text{ESW}} * \text{gewicht}}{0,5 * \text{Totaal gewicht bioassys}}$$

Als voorwaarde voor een betrouwbaar resultaat wordt gesteld dat het totaal gewicht van de toegepaste bioassays minimaal 10 moet zijn (gewicht totale batterij is 20). Als de totaal SIMONI score hoger is dan 1, wordt een mogelijk risico voor de ecologie verwacht als gevolg van de aanwezigheid van te hoge concentraties aan microverontreinigingen. Bij deze score is er van uitgegaan dat er een verhoogd risico voor het ecosysteem is als het resultaat van alle bioassays gemiddeld hoger is dan 50% van de voorgestelde signaalwaarden (de factor 0,5 in de SIMONI score). Dit percentage is arbitrair gekozen en zal op basis van voortschrijdend inzicht en validatiestudies op meerdere locaties (UvA promotieonderzoek) in de toekomst worden bijgesteld.

Ter illustratie is in figuur 12 is een voorbeeld van een SIMONI score van 8 locaties in het AGV beheergebied gegeven (Van der Oost, 2014). Uit de SIMONI 1.2 analyse blijkt dat op basis van de totale bioassay responsen de hoogste risico's te verwachten zijn op de twee glastuinbouw locaties ZLP en NLP. Mogelijk wordt dit effect veroorzaakt door verhoogde concentraties bestrijdingsmiddelen op deze locaties.

FIGUUR 12

Uitsnede uit het SIMONI 1.2 model - totaalscore voor de mogelijke ecologische risico's van organische microverontreinigingen op basis van alle bioassay effecten. SIMONI scores > 1 duiden op een mogelijk milieurisico door microverontreinigingen, en zijn oranje gekleurd.





LITERATUUR

Ron van der Oost, 2014. Slim monitoren; Watersysteem onderzoek 2012-2013. Waternet rapport 14.116485.

STOWA, 2016a. Leo Posthuma, Dick de Zwart, Leonard Osté, Ron van der Oost en Jaap Postma. Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit: deel 1: Methode voor het in beeld brengen van de effecten van giftige stoffen in oppervlaktewater. STOWA rapportnr: 2016-15A. STOWA - Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.

STOWA, 2016b. Ron van der Oost & Giulia Sileno. Ecological key factor toxicity: part 5 Effect-Based Trigger Values for Environmental Water Quality. STOWA rapportnr 2016-15E, STOWA - Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.



BIJLAGEN

BIJLAGE 1:

INDICATIEVE DETECTIEGRENZEN PS ANALYSES BIJ 100% OF 10% VAN HET TOTAAL EXTRACT

% van PS extract	SR 100%	SR 10%	POCIS 100%	POCIS 10%
analyses Waterproef	ng/L	ng/L	ng/g POCIS	ng/g POCIS
PAK	0.003	0.03	-	-
OCB/PCB (incl PRCs)	0.001	0.01	-	-
Pol pesticiden	-	-	0.5	5
NP pesticiden	0.001	0.01	-	-
metalen	-	-	-	-
nutrienten	-	-	-	-
	ng EQ/g SR	ng EQ/g SR	ng EQ/g POCIS	ng EQ/g POCIS
Antibiotica SCAN	10	-	50	500
REA assay	0.01	-	1.5	15
analyses IMARES	TU/g SR	TU/g SR	TU/g POCIS	TU/g POCIS
Microtox	0.1	1	0.5	5
Algtox	0.1	1	0.5	5
Daphniatox	0.1	1	0.5	5
analyses HWL	ng/L	ng/L	ng/g POCIS	ng/g POCIS
geneesmiddelen	-	-	5	50
breedspectrum chemie	0.003	0.03	-	-
analyses BDS*	ng EQ/g SR	ng EQ/g SR	ng EQ/g POCIS	ng EQ/g POCIS
bioassays polair	-	-	0.5	5
bioassays apolar	0.05	0.5	-	-
analyses OMEGAM	ng/L	ng/L		
KRW prio-stoffen (grove indicatie)	0.001	0.01	-	-
NB. Gegevens van Speedisk waren nog niet bekend bij het schrijven van deze procedures				
*: detectiegrenzen verschillen per CALUX assay (5 tot 200 pg EQ/ml extract); hier is gerekend met 100 pg/ml				



BIJLAGE 2: DUTCH STANDARD WATER

Voor drie bioassay die de algemene toxiciteit meten (Microtox, Algentox en Daphniatox) moet het ingedampte extract van de passieve samplers worden overgebracht in Dutch Standard Water (DSW). Het Nederlands standard zoetwater is een oplossing van verschillende zouten in Milli-Q water.

1. De eerste stap van de bereiding is het maken van die stockoplossingen van calciumchloride, magnesiumsulfaat en natrium/kaliumbicarbonaat in milliQ water. De concentraties van de zouten in deze stock-oplossingen zijn als volgt:

	Stof:	Concentratie:
Stock-oplossing 1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 gr/L
Stock-oplossing 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	90 gr/L
Stock-oplossing 3	NaHCO_3	50 gr/L
	KHCO_3	10 gr/L

Omdat Daphnia gevoelig is voor verhoogde zoutconcentraties moet niet meer worden ingewogen dan de bovenstaande hoeveelheden.

2. In een 1L maatkolf wordt 2 ml van elke stockoplossing gebracht, waarna het geheel met milliQ water wordt aangevuld tot 1 liter.
3. Voor gebruik wordt deze oplossing 2 uur belucht.
4. Na de beluchting moet de pH van de oplossing 8.2 zijn. De hardheid is 210 mg CaCO_3/L .



STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie.

Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de 'kennisvragen van morgen' - de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft - om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragers en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede van alle waterschappen.

DE GRONDBEGINSELEN VAN STOWA ZIJN VERWOORD IN ONZE MISSIE:

Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor én met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.

stowa