



Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

RIZA Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling

# Normstelling voor bioassays

Uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodem

RIZA rapport 2003.005

RIKZ rapport nr: 2003.007

ISBN 9036954851

Auteurs: J.L. Maas (RIZA)

E.J. van de Plassche (Royal Haskoning)

A. Straetmans (Royal Haskoning)

A.D. Vethaak (RIKZ)

A.C. Belfroid (Royal Haskoning)

RIZA

Lelystad, Februari 2003



**ROYAL HASKONING**

---

---

# Voorwoord

---

Het document "Normstelling voor bioassays" is een rapport dat als basis dient voor het achtergronddocument "Omgaan met bioassays" zoals aangekondigd in de Regeringsbeslissing vierde Nota Waterhuishouding (NW4, 1998). Het document is in opdracht van M. Cerutti (DG Water) opgesteld door J.L. Maas (RIZA), A.D. Vethaak (RIKZ), E.J. van de Plassche, A. Straetmans en A.C. Belfroid (Royal Haskoning). De totstandkoming van dit product is begeleid door een kerngroep bestaande uit medewerkers van RIZA (V. Bakker, M.A. Beek, P.J. den Besten, M. Ferdinandy, A. Gerritsen, A.J. Hendriks, P. G-J. de Maagd, E. Sneller, M. Tonkes) en RIKZ (J. Bakker, R. Bosman, W. Dulfer, J. Pijnenburg, C.A. Schipper en O.C. Schwertz). Als klankbord heeft gefungeerd een begeleidingsgroep bestaande uit vertegenwoordigers van de STOWA (M. Talsma), Regionale Directie Zuid-Holland (H. van der Meulen), Ministerie VROM (M. van der Weiden), RIKZ (J. Pijnenburg) en RIZA (A.J. Hendriks).

Het document "Normstelling voor bioassays" zet een beoordelingskader voor biologische effectmetingen neer voor de kwaliteitsbeoordeling van zoet en zout water en zoete en zoute waterbodem. Het is een technisch-wetenschappelijk rapport waarin de keuze voor bepaalde maatlatten voor bioassays wordt toegelicht en verantwoord. De keuzes en het tot stand komen van de maatlatten is gebaseerd op geaccordeerde besluiten van een drietal workshops (1998, 1999 en 2002), waarin met name onderzoekers uit het werkveld, een aantal beleidsmakers en mensen uit de praktijk van het waterkwaliteitsbeheer bijdragen hebben geleverd. Betrokken instanties waren: CIW-werkgroep 4, RIZA, RIKZ, Royal Haskoning, Ministerie V&W, Ministerie VROM, RIVM, Alterra, RIVO, STOWA, RWS Directie Zuid-Holland, Waterschap Rivierenland, Adviesbureaus TNO, Bioclear, Notox, AquaSense, Witteveen & Bos, VITO; VNO/NCW-BRMO, CTB, WRK, Waterpakt, IVM en WU.

De ontwikkeling van een maatlat voor bioassays zal een grote bijdrage leveren aan de in brede kring gewenste inpassing van biologische effectbeoordeling naast chemische stofbeoordeling in het waterkwaliteitsbeheer. De maatlatten kunnen tevens als richtlijn dienen voor productnormen voor bioassays, welke binnen andere kaders afgeleid dienen te worden. Het beleids-traject wordt gestart door dit document aan te bieden aan de stuurgroep Integrale Normstelling Stoffen (INS). De werkgroep CIW-4 (Water en milieu) en de stuurgroep Waterbodem worden middels dit document geïnformeerd.

Hierbij bedank ik degenen die een bijdrage hebben geleverd aan de totstandkoming van dit document. Speciaal wil ik C. van de Guchte bedanken voor zijn voorbereidende werk om normstelling voor bioassays gestalte te kunnen geven.

Met vriendelijke groet,

Hannie Maas

---

Samenvatting 7

### **1 Inleiding 11**

1.1 Achtergrond 11

1.2 Doel en doelgroep 12

1.3 Relevante kaders en ontwikkelingen 13

1.4 Leeswijzer 15

### **2 Bioassays in het milieubeleid 17**

2.1 Milieubezwaarlijkheid 17

2.2 Twee-sporen milieukwaliteitsbeleid 17

2.2.1 Emissiespoor: brongerichte kwaliteitsbeoordeling 18

2.2.2 Immissiespoor: algemene milieukwaliteitsnormen 18

2.3 Van stofgerichte naar effectgerichte beoordeling 18

2.3.1 Effectgerichte beoordeling in het emissiespoor 19

2.3.2 Effectgerichte beoordeling in het immissiespoor 19

2.4 Normstelling voor bioassays 19

### **3 Bioassays 21**

3.1 Bioassays: inleiding en definities 21

3.1.1 *In vivo* bioassays 22

3.1.2 *In vitro* bioassays 22

3.1.3 Mogelijkheden en beperkingen van bioassays 23

3.2 Voorwaarden voor toepassing van bioassays 24

3.3 Huidige toepassing van bioassays in verschillende kaders en milieuc compartimenten 26

3.3.1 Oppervlaktewater 27

3.3.2 Sediment 28

3.3.3 Effluent 29

3.3.4 Verontreinigde waterbodems en baggerspecie 29

3.4 Ontwikkelingen in de nabije toekomst 29

### **4 Beoordelingskader: maatlat en criteria 33**

4.1 Maatlatten voor bioassays 33

4.1.1 Inleiding 33

4.1.2 Voorstel voor maatlat en criteria voor gebruik van *in vivo* bioassays in het kader van de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodem 34

4.1.3 Voorstel voor maatlat en criteria voor gebruik van *in vitro* bioassays in het kader van de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodem 38

4.1.3.1 Inleiding 38

4.1.3.2 Benaderingen van de maatlat 38

4.1.3.3 Conclusie 41

4.2 Huidige stand van zaken rondom een maatlat voor bioassays voor landbodem, waterbodem in situ (saneringstraject), baggerspecie en effluent 41

4.2.1 Landbodem 41

4.2.2 Nader Onderzoek waterbodems 42

4.2.3 Baggerspecie 42

4.2.4 Totaal-effluentbeoordeling 44

---

## 5 Toepassing in de praktijk 47

5.1 Toetsing van de maatlat in de praktijk van het waterbeheer in Nederland 47

5.1.1 Toetsing van de maatlat bij toepassing van *in vivo* bioassays in oppervlaktewater 47

5.1.2 Toetsing van de maatlat bij toepassing van *in vivo* bioassays in sediment 48

5.2 Afstemming met de toepassing van bioassays in internationale kaders 50

Afkortingen 53

Referenties 55

---

## Bijlagen

Een overzicht van *in vivo* en *in vitro* bioassays die toegepast worden in verschillende milieucompartimenten:

Tabel 1A: *In vivo* bioassays in oppervlaktewater (zoet, zout) 60

Tabel 1B: *In vivo* bioassays in zoet en zout sediment 61

Tabel 1C: Bestaande *in vitro* bioassays en toepassingsgebieden 63

Tabel 1D: *In vivo* en *in vitro* bioassays voor de Totaal-effluentbeoordeling (TEB) 64

Tabel 1E: *In vivo* bioassays in de TRIADE-benadering (sediment, zoet) 65

Tabel 1F: *In vivo* en *in vitro* bioassays voor de beoordeling zoute baggerspecie (CTT) 65

---

# Samenvatting

---

In de Vierde Nota Waterhuishouding (NW4, 1998) wordt het regeringsvoornemen voor een ruimere inzet van biologische effectmetingen (bioassays) in het waterkwaliteitsbeheer, als aanvulling op de klassieke chemische stofbeoordeling, aangekondigd. In de nota zijn voor het eerst criteria opgenomen waaraan de in bioassays gemeten effecten kunnen worden getoetst. In aanvulling op de Vierde Nota en de motie Augusteijn-Esser heeft de regering een voorstel geformuleerd voor een nieuwe waterkwaliteitsparameter voor ecotoxicologische effectbeoordeling. Gesteld wordt dat uiterlijk in 2006 deze nieuwe effectparameter opgenomen dient te zijn in de normering van de waterkwaliteit.

In de Vierde Nota wordt tevens het verschijnen van een achtergronddocument aangekondigd, waarin 'het omgaan met bioassays' aan de orde komt. Beoogd wordt de ontwikkeling van een maatlat voor bioassays, waarmee de resultaten uit de verschillende testen te schalen zijn en een overschrijding van de gewenste milieukwaliteit inzichtelijk wordt.

Het voorliggende document geeft invulling aan deze maatlat voor bioassays. De ontwikkelde maatlat heeft betrekking op bioassays die ingezet worden in de kwaliteitsbeoordeling van zoet en zout water en zoete en zoute waterbodem (sediment). Daarnaast wordt zijdelings aandacht geschonken aan ontwikkelingen in normstelling, nationaal en internationaal, voor soortgelijke testen voor andere milieucompartimenten (landbodem, effluënten en zoete en zoute baggerspecie). Ook worden de resultaten getoond van een eerste exercitie, waarbij de nieuw ontwikkelde maatlat wordt toegepast op twee bestaande datasets.

Dit document richt zich op de beleidsmakers: het betreft een technisch-wetenschappelijk rapport waarin de keuze voor bepaalde maatlaten voor bioassays wordt toegelicht en verantwoord. Het doel van dit document is geen beleidsnota en geen handleiding voor de waterkwaliteitsbeheerder. Beide trajecten (inbedding in het beleid en toepassing in de praktijk) dienen op basis van dit document nog in gang te worden gezet.

Alvorens effectgerichte beoordeling effectief kan worden ingezet als beleidsinstrument moet op wetenschappelijke gronden een beleidsmatige maatlat worden ontwikkeld. Met een maatlat worden de resultaten van bioassays op een bepaalde schaal geplaatst.

De uitgewerkte maatlaten op grond van *in vivo* bioassays voor oppervlaktewater en sediment en op grond van *in vitro* bioassays zijn tot stand gekomen op basis van geaccordeerde besluiten van een drietal workshops, waarvoor met name onderzoekers uit het werkveld, maar ook een aantal beleidsmakers en mensen uit de praktijk van het waterkwaliteitsbeheer bijdragen hebben geleverd.

De voorgestelde maatlat voor oppervlaktewater en waterbodem sluit aan bij de afleiding van en de terminologie voor de normstelling voor individuele stoffen. Daarmee passen normen voor bioassays naadloos in het vigerende beleid.

Voor de maatlatten voor *in vivo* bioassays zijn de volgende afwegingen gemaakt:

- In plaats van de term 'risiconiveau' die in de 'klassieke' stofbeoordeling wordt gebruikt wordt in deze maatlatten gesproken van 'effectniveau': Verwaarloosbaar Effect (VE), Maximaal Toelaatbaar Effect (MTE) en Ernstig Effect (EE) i.p.v. VR-MTR-ER.
- Afhankelijk van de beschikbaarheid aan chronische gegevens wordt, evenals bij de normstelling voor stoffen, een 'refined effect assessment' of een 'preliminary effect assessment' toegepast. In de 'refined effect assessment' wordt gebruik gemaakt van species-gevoeligheidsverdelingen (SSD's). In de 'preliminary effect assessment' wordt gebruik gemaakt van zogenaamde 'assessment factors'.
- In tegenstelling tot de omrekeningsfactor van 100 van MTR naar VR voor individuele stoffen, wordt met een factor 10 tussen MTE en VE volstaan, aangezien in monsters uit het veld het effect van combinatie-toxiciteit reeds meegewogen wordt.
- In sediment zijn, in tegenstelling tot het (zoete) oppervlaktewater, vrijwel alleen chronische testen inzetbaar.
- Voor oppervlaktewater en sediment kan gewerkt worden met verdunningen van het onbehandelde monster (het zogenaamde 'as is' monster). Een oppervlaktewater kan ook geconcentreerd worden. Hierdoor is het voor oppervlaktewater mogelijk om resultaten van *in vivo* bioassays in te schalen op een maatlat EE-MTE-VE. Aan concentreren van sediment kleven nog veel praktische bezwaren. Hierdoor is het niet mogelijk een VE voor sediment af te leiden.

Deze afwegingen hebben tot de volgende maatlatten voor *in vivo* bioassays met oppervlaktewater en sediment geleid:

#### Maatlat voor *in vivo* bioassays voor oppervlaktewater

**Methode 1: maatlat met 'preliminary effect assessment' (Cf: factor waarmee het monster geconcentreerd wordt ten opzichte van het onbehandelde monster, het 'as is' monster; dit kan gezien worden als de 'assessment factor' toe te passen bij 3 acute of chronische testen uit verschillende taxonomische groepen)**

##### *Acute testen*

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| VE (Verwaarloosbaar Effect):       | in 3 acute testen effect = 0,<br>Cf = 100   |
| MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect): | in 3 acute testen effect = 0,<br>Cf = 10  |
| EE (Ernstig Effect):               | in 1 acute test effect $\geq$ EC <sub>50</sub> ,<br>Cf = 10 óf<br>in 2 acute testen EC <sub>20</sub> < effect<br>< EC <sub>50</sub> , Cf = 10 |

##### *Chronische testen*

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| VE (Verwaarloosbaar Effect):       | in 3 chronische testen effect = 0,<br>Cf = 10   |
| MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect): | in 3 chronische testen effect = 0,<br>Cf = 1  |
| EE (Ernstig Effect):               | in 1 chronische test effect $\geq$ EC <sub>50</sub> ,<br>Cf = 1 óf<br>in 2 chronische testen NOEC<br>< effect < EC <sub>50</sub> , Cf = 1 |



### Methode 2: maatlat met 'refined effect assessment' (PAF-benadering)

De methode werkt als volgt:

- Er dienen minimaal 4 chronische waarden van verschillende taxonomische groepen beschikbaar te zijn.
- Acute en chronische bioassays kunnen gebruikt worden.
- Resultaten van acute testen worden uitgedrukt als de factor waarmee het oorspronkelijke monster geconcentreerd moet worden voor het bereiken van 50% effect in de bioassay. Deze resultaten worden vervolgens omgerekend naar een chronische waarde door toepassing van een acuut-chronische ratio (ACR) van 10. Op dit moment is dit een algemeen geaccepteerde generieke factor (De Zwart, 2002).
- Met de chronische waarden wordt een gevoeligheidsverdeling geschat volgens een log-logistische verdeling zoals beschreven in Traas (2000).
- Bepaald wordt in welke mate de  $PAF_5$  (voor het MTE) en  $PAF_{50}$  (voor het EE) overschreden worden bij het ongeconcentreerde, onverdunde ofwel het 'as is' monster.
- Voor het VE wordt de Cf, behorend bij het MTE ( $PAF_5$ ), afgelezen en gedeeld door 10. *Dit geeft de concentratiefactor aan waarbij het VE optreedt.* Vervolgens wordt dit resultaat vergeleken met de resultaten van het onbehandelde monster om te bepalen of dit aan het MTE of het VE voldoet.

### Maatlat voor *in vivo* bioassays voor sediment

De maatlat ziet er als volgt uit:

- Er wordt alleen een MTE- en een EE-niveau afgeleid en geen VE-niveau. Voor het VE heeft dit te maken met de praktische bezwaren die kleven aan het concentreren van sediment.
- Voor het vaststellen van het MTE dienen minimaal 3 chronische testen beschikbaar te zijn, waarvan tenminste twee 'whole-sediment' testen zijn.
- Het MTE is net als bij oppervlaktewater gelijk aan: in 3 chronische testen effect = 0. Als in tenminste 1 van 3 chronische testen een negatief effect wordt gemeten, dan is er sprake van overschrijding van het MTE.
- Het EE-niveau wordt bereikt wanneer in 1 chronische test ('as is' monster) een effect gemeten wordt  $\geq EC_{50}$ , of in 2 chronische testen een effect gemeten wordt, dat zich bevindt tussen NOEC en  $EC_{50}$ .

Voor een maatlat voor *in vitro* bioassays worden de volgende benaderingen kansrijk geacht:

- Op basis van bestaande metingen met *in vitro* bioassays Nederlands oppervlaktewater of sediment verdelen in 'schone' en verontreinigde locaties. De VE ligt dan op de grens die gemiddeld of maximaal in de als 'schoon' veronderstelde locaties wordt gevonden.
- *In vitro* bioassays beschouwen als blootstellingsassay; een respons wordt veroorzaakt door een stof (of stofgroep) die de assay triggert. Op basis van de MTR- en VR-waarden voor deze stof kan een (TEQ)-MTE berekend via een link naar stoffen.

---

Een combinatie van deze benaderingen lijkt het meest realistisch, waarbij de eerste benadering als toetsing voor de afgeleide TEQ-MTE en TEQ-VE kan dienen. Op korte termijn is dit echter nog niet mogelijk omdat bruikbare MTR- en VR-waarden ontbreken.

In dit document is de noodzaak tot en de afleiding van wetenschappelijke maatlatten voor oppervlaktewater en sediment weergegeven. Daarmee zijn de maatlatten nog niet klaar voor gebruik. Inbedding in beleid en het ontwerpen van een leidraad voor de praktijkuitvoering moet nog in gang worden gezet. Ook de aansluiting van de effectgerichte beoordeling bij internationale ontwikkelingen, zoals de EU Kaderrichtlijn Water, die consequenties zal hebben voor de Nederlandse wetgeving op dit gebied, moet geconcretiseerd worden.

---

# 1 Inleiding

---

*In dit hoofdstuk wordt in § 1.1 vanuit een milieuchemische en een beleidsmatige achtergrond de behoefte geschetst aan een maatlat voor bioassays voor de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodem. Doel en doelgroep komen aan de orde in § 1.2, waarbij tevens wordt aangegeven in welk (beleidsmatig) traject de uitkomsten van dit rapport zullen worden ingebracht. Tot slot wordt in § 1.3 in het kort reeds een introductie gegeven van ontwikkelingen in nationale en internationale kaders, die relevant zijn voor de beoogde ontwikkeling van een maatlat voor bioassays.*

## 1.1 Achtergrond

Momenteel is in Nederland de kwaliteitsbeoordeling van de verschillende milieucompartimenten, zoals water, bodem en lucht, overwegend gericht op een stofgerichte aanpak. Dat wil zeggen dat de mate van verontreiniging die wordt veroorzaakt door een stof of stofgroep, vooral aan de hand van chemische analyses wordt beoordeeld. Hierbij worden slechts honderd à tweehonderd chemische stoffen gemeten, terwijl een veelvoud voorkomt in het milieu. Behalve dat het aantal stoffen dat geanalyseerd kan worden beperkt is, is het ook niet mogelijk om met een stofgerichte aanpak biologische effecten te meten. Wel kunnen de gevonden gehalten vergeleken worden met toxiciteitsgegevens voor organismen uit andere bronnen, maar een dergelijk onderzoek geeft weinig informatie over de actuele of potentiële biologische effecten van het milieumonster. Een directe biologische effectmeting is wel mogelijk met behulp van bioassays. Met behulp van bioassays kan een indruk verkregen worden van de over-all toxiciteit van een milieumonster voor de daarin aanwezige organismen, waartoe effecten van niet-gemeten, maar wel biologisch beschikbare stoffen, onbekende stoffen, omzettingsproducten en combinatietoxiciteit behoren. Daarnaast komen ook steeds meer bioassays beschikbaar, die specifieke biologische effecten kunnen detecteren.

Veel bioassays zijn inmiddels gestandaardiseerd. Ze vinden hun toepassing op verschillende terreinen van het zoete en zoute water(bodem)kwaliteitsbeheer, het landbodembeheer, bij de beoordeling van de kwaliteit van zoete en zoute baggerspecie en bij de beoordeling van effluenten.

Behalve in de praktijk van de kwaliteitsbeoordeling van een milieucompartiment, is er de laatste jaren ook vanuit het beleid meer belangstelling voor de inzet van bioassays bij de bepaling van actuele risico's van verontreinigende stoffen. De Vierde Nota Waterhuishouding (NW4, 1998) heeft het gebruik van bioassays duidelijker op de agenda geplaatst. Volgens de nota schiet de traditionele chemische beoordeling van de waterkwaliteit tekort. Er zitten teveel microverontreinigingen in het water die met de chemische beoordeling niet aan het licht komen. In de nota wordt het voornemen van de regering aangekondigd om een effectgerichte beoordeling van de waterkwaliteit op basis van ecotoxicologische parameters (bioassays), naast de bestaande stofgerichte normen in het waterkwaliteitsbeheer te implementeren. In de nota zijn voor het eerst criteria opgenomen waaraan de in bioassays gemeten effecten kunnen worden getoetst. In Normen voor het Waterbeheer, een

---

achtergronddocument bij de NW4 (CIW, 2000) wordt gesteld dat het voor een goed inzicht in de actuele ecologische risico's ter plaatse van de verontreiniging zinvol is om bioassays en/of gericht veldonderzoek uit te voeren.

Naar aanleiding van de NW4 werd door de Tweede Kamer een motie Augusteijn-Esser aangenomen waarin de regering verzocht werd om zogenaamde 'Tussendoelen' te formuleren bij het bereiken van de gewenste waterkwaliteit in het jaar 2020 (TK 1998-1999). Als antwoord hierop (TK 2000-2001) formuleerde de regering geen tussendoelen, maar deed wel een voorstel voor "*een aanvullende normering voor de vele in het water aanwezige stoffen waarvoor nog geen normen bestaan en waarvoor nog geen routinematige monitoring plaatsvindt*". In het voorstel wordt gesproken over een nieuwe waterkwaliteitsparameter voor ecotoxicologische effectbeoordeling "*mede met gebruik van zogenaamde bioassays*". Deze totaalparameter weerspiegelt het effect van alle stoffen en dient opgenomen te worden als aanvulling op de huidige stofgerichte normering. Daarvoor zullen volgens het voorstel ook een maximaal toelaatbaar risico (MTR) en een streefwaarde (VR: verwaarloosbaar risico) voor deze bioassays worden benoemd. De streefwaarde wordt gesteld op "*geen aantoonbaar effect*" en geldt als inspanningsverplichting voor het jaar 2020. Uiterlijk in 2006 moet deze ecotoxicologische effectbeoordeling opgenomen zijn in de normering voor de waterkwaliteit. Dit regeringsvoornemen heeft de discussie omtrent implementatie van bioassays in de waterkwaliteitsbeoordeling een flinke impuls gegeven.

In de NW4 werd verder aangekondigd dat er een tweede achtergronddocument zal verschijnen: 'Omgaan met bioassays'. Onder een andere titel en volgend op recente ontwikkelingen op dit gebied is het hier voorliggende document de invulling daarvan. Het is erop gericht de biologische effectmetingen ruimer ingang te laten vinden in de waterkwaliteitsbeoordeling na 2006, onder andere door het aanreiken van een maatlat waarlangs de effecten uit de bioassays gelegd kunnen worden. De Commissie Integraal Waterbeheer (CIW) was betrokken bij de totstandkoming van dit document.

## 1.2 Doel en doelgroep

### Doel

Doel van dit document is een antwoord te geven op de algemene vraag hóe de kwaliteit van zoet en zout water en zoete en zoute waterbodems (sediment) na 2006 beoordeeld gaat worden, waarbij een ruimere inzet van bioassays wordt gevraagd. Daarvoor is nodig dat de volgende twee aspecten aandacht krijgen:

- Het toepassingsgebied: in welke situaties en onder welke voorwaarden zijn welke bioassays zinvol in te zetten?
- Het beoordelingskader: hoe moeten de resultaten uit de bioassays beoordeeld worden? Welke maatlat geldt voor deze biologische effecten? Welke inspanningsverplichting heeft de waterkwaliteitsbeherende instantie in 2006?

Met betrekking tot het toepassingsgebied van bioassays zijn recent diverse rapporten gepubliceerd, die voor verschillende milieucompartimenten een overzicht geven van beschikbare testen, toepassingsgebieden en protocollen voor uitvoering (onder andere voor kwaliteitsbewaking van het oppervlaktewater: STOWA, 1997a; De Jong *et al.*, 2000; RIWA, 2001; De Zwart & Sterkenburg, 2002; voor verontreinigde waterbodems: STOWA, 1997b; Maas *et al.*, 1993; Van Elswijk & Hin, 2002; voor baggerspecie: Stronkhorst

---

*et al.*, 2001; voor effluentbeoordelingen: FWVO, 2000).

De focus in dit achtergronddocument is daarom met name het tweede aspect: het neerzetten van een beoordelingskader voor biologische effectmetingen voor de kwaliteitsbeoordeling van zoet en zout water en zoete en zoute waterbodem (sediment). Daarnaast wordt zijdelings aandacht geschonken aan ontwikkelingen in normstelling voor soortgelijke testen voor andere milieucompartimenten (landbodem, effluënten en zoete en zoute baggerspecie), zodat de onderlinge relaties duidelijk worden.

### **Doelgroep**

Het document richt zich op de beleidsmakers: het betreft een technisch-wetenschappelijk rapport waarin de keuze voor bepaalde maatlaten voor bioassays wordt toegelicht en verantwoord. Het is geschreven vanuit de verwachting dat ontwikkeling van een maatlat voor bioassays een stimulerende en concrete, richtinggevende bijdrage zal betekenen aan de in brede kring gewenste inpassing van biologische effectbeoordeling (naast de chemische stofbeoordeling) in het waterkwaliteitsbeheer. Het is tot stand gekomen op basis van geaccordeerde besluiten van een drietal workshops, waarvoor met name onderzoekers uit het werkveld, maar ook een aantal beleidsmakers en mensen uit de praktijk van het waterkwaliteitsbeheer bijdragen hebben geleverd (Hendriks *et al.*, 1998; Tuinstra, 1999; Van de Plassche & Straetmans, 2002).

Dit document is geen beleidsnota en geen handleiding voor de waterkwaliteitsbeheerder. Beide trajecten (inbedding in het beleid en toepassing in de praktijk) dienen op basis van dit document nog in gang te worden gezet. Het beleidstraject wordt gestart door het document aan te bieden aan de Stuurgroep Integrale Normstelling Stoffen (INS), CIW-werkgroep 4 (Water en Milieu), en de Stuurgroep Waterbodems (STUWABO). Deze aanbiedingen zullen begeleid worden door een oplegnotitie, waarin aandacht wordt gevraagd voor het in kaart brengen van het maatschappelijke traject en financiële consequenties. Het document moet uiteindelijk leiden tot een achtergronddocument van NW4 en zal worden uitgebracht onder auspiciën van CIW. Pas wanneer het beoordelingskader in het beleid is vastgelegd weet de waterkwaliteitsbeheerder welke inspanningsverplichting er van hem in de toekomst verlangd wordt. Toepassing in de praktijk van dit nieuwe instrumentarium zal door middel van een nog op te stellen Handleiding verder gefaciliteerd dienen te worden.

### **1.3 Relevante kaders en ontwikkelingen**

De ontwikkeling van een maatlat voor bioassays bij toepassing in het kwaliteitsbeheer van oppervlaktewater en sediment kan in een breder perspectief geplaatst worden: ook in andere kaders, zoals de beoordeling van de milieubezwaarlijkheid van lozingen (effluënten) of van de verspreiding van (zoute) baggerspecie op zee, wordt de laatste jaren aandacht geschonken aan inpassing in deze beoordeling van de effecten op biota. Ontwikkeling van een toetsingskader om die effecten te kunnen beoordelen, is daarvoor onontbeerlijk. Daarbij is het van belang het toetsingskader voor verschillende milieucompartimenten en productgebieden zoveel als mogelijk op elkaar af te stemmen, zodat verontreinigingen niet naar het volgende compartiment kunnen worden 'doorgeschoven'. Hieronder wordt een aantal van die ontwikkelingen, nationaal en internationaal, alvast in het kort geschetst. In de volgende hoofdstukken wordt met name aan de nationale ontwikkelingen nog op diverse plaatsen aandacht geschonken. De internationale kaders komen in meer detail aan de orde in § 4.2.

---

### **Chemisch-Biologisch beoordelingsInstrumentarium (CBI)**

In opdracht van DG Water ontwikkelen RIZA en RIKZ in het kader van het WONS-programma 'Toxische stoffen' een 'geïntegreerd chemisch-biologisch beoordelingsinstrumentarium voor zoete en zoute watersystemen'. Hiertoe wordt een nieuwe generatie waterkwaliteitsparameters (waaronder bioassays) in het waterkwaliteitsbeheer geïmplementeerd.

Ook voor de beoordeling van zoete en zoute waterbodems en baggerspecie wordt een soortgelijk integraal instrumentarium momenteel ontwikkeld.

Voorbeelden hiervan zijn de TRIADE-benadering voor het beoordelen van de ernst en urgentie van verontreinigde waterbodems (Van Elswijk & Hin, 2002) en de recent door RIKZ voorgestelde nieuwe beoordelingssystematiek voor het toetsen van de milieubezwaarlijkheid van verspreiding van zoute baggerspecie in zee en kustwateren: de chemie-toxiciteit-toets (CTT; Stronkhorst *et al.*, 2001; zie kader).

#### **Zoute baggerspecie getest met een testbatterij**

Voor de kwaliteitsbeoordeling van zoute baggerspecie voor verspreiding op zee zijn, in het kader van de chemie-toxiciteit-toets, biologische effecttechnieken beschikbaar, bestaande uit een testbatterij van drie testen. Dit zijn kortdurende assays. Eén test naar de overleving van een in de zeebodem levende slijkgarnaal, één test met bacteriën (Microtox Solid Phase) en één met een gerecombineerde cellijn (DR-CALUX). De eerste twee geven voor baggerspecie een indicatie van algemene toxiciteit. De cellijn-assay reageert op specifieke nadelige biologische effecten van dioxines en dioxine-achtige stoffen als PCB's, die al in zeer lage concentraties giftig zijn voor hogere organismen. Resultaten uit de testbatterij laten zien dat toxicologische effecten niet kunnen worden verklaard met de klassieke chemische analyses, hetgeen de aanvullende waarde van biologische effectmetingen demonstreert.

(AKWA/RIKZ)

### **Totaal-effluentbeoordeling (TEB)**

Biologische beoordeling van effluenten (en van andere bronnen van waterverontreiniging) wordt ontwikkeld binnen het programma Totaal-effluentbeoordeling (TEB), waarvoor de coördinatie bij het RIZA ligt. Het onderzoek is gestart in 1994 en in 2005 moet het gehele instrument gereed zijn voor implementatie. De beoordeling vindt plaats op de zogenaamde PBT-parameters: Persistentie, Bioaccumulatie en Toxiciteit (acute en chronische toxiciteit en genotoxiciteit). Er worden biologische testen ontwikkeld voor zoute en zoete effluenten, alsmede technieken om de oorzaken van de effecten te achterhalen, zodat maatregelen aan de bron genomen kunnen worden (FWVO, 2000).

### **Internationale kaders**

Internationaal zijn er momenteel in diverse kaders ontwikkelingen om bioassays (al dan niet) te incorporeren in reguliere monitoring en kwaliteitsbeoordelingen. Door de diverse internationale verdragen waaraan Nederland zich verbonden heeft, zullen deze ontwikkelingen consequenties hebben voor de Nederlandse wetgeving: de beslissingen die in internationale conventies worden gemaakt dienen in nationale wetgeving gestalte te krijgen. Zo zullen de afspraken die gemaakt zijn in het kader van verspreiding van zoute baggerspecie LC (London Convention), OSPAR (Oslo and Paris Convention) en PIANC (Permanent International Association of Navigation

---

Congresses) geïmplementeerd dienen te worden in de Wet Verontreiniging Zeewater. Ook de ontwikkelingen in het kader van de EU Kaderrichtlijn Water, een richtlijn waarin de EU-landen zich verplichten tot het (ecologisch) verantwoord omgaan met waterkwaliteit en waterkwantiteit, zullen op termijn consequenties hebben voor de Nederlandse wetgeving op dit gebied. In § 4.2 zal aan de orde komen in hoeverre bioassays op dit moment in de genoemde verdragen een rol spelen.

#### 1.4 Leeswijzer

In *hoofdstuk 2* wordt een schets gegeven van het *Nederlandse milieubeleid* en de rol die biologische effectmetingen daarin spelen, met als doel de wetenschappelijke samenhang tussen de beleidsmatige keuzes, zoals die verderop in dit document worden uitgewerkt, te onderbouwen.

In *hoofdstuk 3* worden de *bioassays* geïntroduceerd: wat zijn bioassays en welke definities worden in dit rapport gehanteerd? De randvoorwaarden, die op inhoudelijke gronden gesteld kunnen worden aan toepassing van bioassays, komen aan bod en er wordt een overzicht gegeven van de wijze (milieucompartiment, kader en doel) waarop op dit moment in Nederland bioassays reeds worden ingezet. Aan het slot van dit hoofdstuk komt de toekomst in beeld: zijn bioassays inmiddels al zover ontwikkeld om ingepast te worden in een biologisch beoordelingsinstrument? Wat dient er daarvoor nog te gebeuren en welke aanvullende voorwaarden gelden dan?

In *hoofdstuk 4* worden de *maatlatten* gepresenteerd voor *in vivo* en *in vitro* bioassays bij inzet in de beoordeling van de kwaliteit van oppervlaktewater en waterbodem (zoet en zout). De maatlatten kwamen tot stand als resultaat van de laatst gehouden workshop. In het tweede deel van dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van nationale ontwikkelingen rondom normstelling in andere milieucompartimenten: landbodem, waterbodem (sanerings-traject), baggerspecie en effluent.

In *hoofdstuk 5* staat de *toepassing* van het biologisch beoordelingskader centraal. Toepassing van dit instrumentarium in de Nederlandse praktijk wordt voor oppervlaktewater en waterbodem getoetst met behulp van twee bestaande datasets. Dit hoofdstuk wordt besloten met een beschrijving van internationale kaders, die in de toekomst mogelijk hun stempel zullen gaan drukken op nationale ontwikkelingen voor wat betreft de implementatie van een biologisch beoordelingsinstrumentarium.

---



---

## 2 Bioassays in het milieubeleid

---

*In dit document wordt een normstellingskader uitgewerkt voor de effectgerichte beoordeling van de Nederlandse watersystemen. Het gebruik van effectmetingen is niet nieuw. Ook in het bestaande stofgerichte milieubeleid wordt gebruik gemaakt van effectmetingen voor het afleiden van milieukwaliteitsdoelstellingen. Nieuw is wel dat er kwaliteitsdoelstellingen worden ontwikkeld gebaseerd op effectmetingen. In dit hoofdstuk wordt de rol van effectmetingen in het brede Nederlandse milieukwaliteitsbeleid geschetst. Na de inleiding in § 2.1 op milieubezwaarlijkheid worden in § 2.2 de twee sporen van het Nederlandse milieukwaliteitsbeleid toegelicht. In § 2.3 wordt ingegaan op de noodzaak tot implementatie van een effectgerichte beoordeling. Tenslotte wordt in § 2.4 het doel, de te ontwikkelen maatlat voor bioassays in het immissiespoor benadrukt.*

### 2.1 Milieubezwaarlijkheid

Vanaf het moment dat er aandacht kwam voor de milieubezwaarlijkheid van stoffen en mengsels is de ecotoxicologische beoordeling hiervan opgesplitst geweest in drie peilers, te weten Toxiciteit (giftigheid voor organismen), Bioaccumulatie (ophoping in organismen) en Persistentie (biologische afbreekbaarheid). T is hierbij een directe maat voor milieuschadelijkheid; zichtbare effecten op planten en dieren die kunnen leiden tot ongewenste veranderingen in populaties of ecosystemen. B en P zijn indirecte maten. Immers, slechte biologische afbraak of ophoping in organismen zeggen strikt genomen niets over de schadelijkheid voor organismen maar wel over de kans dat op termijn en buiten ons directe blikveld toch schade door giftigheid optreedt. Voorbeelden hiervan, zoals het insecticide DDT en polychloorbiphenylen (PCB's), zijn aanleiding geweest voor de hedendaagse aanpak van verontreinigingen, het zogenaamde twee-sporen milieukwaliteitsbeleid, waarin zowel een preventieve aanpak als een curatieve aanpak zijn uitgewerkt.

### 2.2 Twee-sporen milieukwaliteitsbeleid

Het twee-sporenbeleid vormt de rode draad in het waterkwaliteitsbeleid. De preventieve aanpak is daarbij uitgewerkt in het emissiespoor, oftewel de aanpak van bronnen (effluent, baggerspecie), terwijl de curatieve aanpak vertaald is naar het immissiespoor, oftewel de kwaliteitsbewaking van het watersysteem (oppervlaktewater, grondwater, waterbodem). Gezamenlijk moeten deze sporen leiden tot bescherming en verbetering van de kwaliteit van watersystemen.

In het emissiespoor wordt de 'toelaatbaarheid' van lozingen naar het watersysteem beoordeeld aan de hand van *kwaliteitsnormen voor lozingen en diffuse bronnen*. Deze kwaliteitsnormen zijn gebaseerd op wat technisch redelijk en haalbaar is in verhouding tot de milieubezwaarlijkheid van de lozing. In het immissie-spoor wordt de kwaliteit van het watersysteem getoetst aan de algemene *milieukwaliteitsnormen* voor individuele stoffen. Zo wordt zichtbaar gemaakt of de brongerichte aanpak toereikend is. Ook

---

kunnen met behulp van deze normen prioriteiten worden gesteld voor het nemen van maatregelen bij de bron.

Naast het twee-sporen beleid bestaat het *productenbeleid* dat eveneens beoogt het milieu te beschermen door eisen te stellen aan *producten*. Zo worden aan het product 'baggerspecie' bestemmingsafhankelijke eisen gesteld. Bestemmingen als 'verspreiding in zee of in zoet water' en 'op de kant zetten' hebben immers directe relaties met de oppervlaktewaterkwaliteit, terwijl bij andere bestemmingen (op land of in depot) vooral effecten naar andere compartimenten een rol spelen. Het productenbeleid valt buiten de context van dit document.

### **2.2.1 Emissiespoor: brongerichte kwaliteitsbeoordeling**

In het emissiespoor wordt de milieubezwaarlijkheid van een lozing bepaald op basis van de eigenschappen van individuele stoffen. Dit betekent het analyseren van stoffen, het bepalen van PBT-waarden van deze stoffen en het toetsen aan normen. Tenslotte moeten maatregelen genomen worden als de gehalten van de stoffen de norm overschrijden. Deze aanpak heeft geleid tot een sterke reductie van gehalten aan stoffen in oppervlaktewater. Om dit proces nog beter te doen verlopen zijn recentelijk de Algemene beoordelingsmethodiek voor stoffen en preparaten (ABM; CIW 2001) en de Immissietoets (CIW, 2001) ingevoerd.

Bij ABM worden stoffen al voor toepassing beoordeeld op mogelijke risico's voor het milieu. De Immissietoets wordt gebruikt om de milieuschadelijkheid van de restlozing op het ontvangende oppervlaktewater te beoordelen. Dit kan in de praktijk leiden tot de noodzaak om verdergaande maatregelen te nemen.

### **2.2.2 Immissiespoor: algemene milieukwaliteitsnormen**

In het immissiespoor wordt de kwaliteit van het watersysteem beoordeeld op basis van de concentraties van individuele stoffen. Gemeten concentraties worden getoetst aan normen. Deze normen zijn gebaseerd op de gemeten toxiciteit van individuele stoffen in gestandaardiseerde laboratoriumtoetsen. Als maat voor de toxiciteit wordt gekeken naar sterfte, of effecten op groei of reproductie (populatie-niveau-effecten) na blootstelling aan een stof via water of via gecontamineerd voedsel. Voor toepassing in beleid zijn de milieukwaliteitsnormen vastgelegd op drie risiconiveau's: het ER (Ernstig Risiconiveau), het MTR (Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau) en het VR (Verwaarloosbaar Risiconiveau). In hoofdstuk 4 wordt de wetenschappelijke afleiding van deze risiconiveau's nader toegelicht.

De doelstelling van het algemene milieukwaliteitsbeleid is dat voor stoffen, waarvoor normen zijn afgeleid, op korte termijn het MTR niet (meer) overschreden wordt. Op lange termijn is het bereiken van het VR het doel.

## **2.3 Van stofgerichte naar effectgerichte beoordeling**

In de *stofgerichte* beoordeling zijn voor zo'n honderd stoffen milieukwaliteitsnormen afgeleid en momenteel wordt de aanwezigheid van een 40-tal van oudsher bekende probleemstoffen gemonitord. Echter, steeds méér stoffen lijken een probleem te gaan vormen voor de water- en waterbodempkwaliteit. Het totale aantal stoffen dat in het watersysteem geloosd wordt is ontzettend groot (schattingen gaan uit van meer dan 100.000 stoffen) en vaak gaat het dan ook nog om onbekende stoffen. Het is niet realistisch om voor al deze stoffen normen af te leiden en te handhaven. Bovendien zijn deze stoffen vaak ook nog eens moeilijk chemisch te meten. De effectieve bescherming van het watersysteem komt daarmee in het gedrang. Om

---

onze watersystemen toch te beschermen tegen de gevolgen van de aanwezigheid van milieubezwaarlijke stoffen, is een alternatieve aanpak voorgesteld, de effectgerichte aanpak. Feitelijk is de *effectgerichte* aanpak niet anders dan de stofgerichte aanpak. Het enige verschil is dat milieumonsters in de effectgerichte aanpak *direct* op schadelijkheid worden beoordeeld en niet *indirect* door de vertaling van gehalten van individuele stoffen naar schadelijkheid op basis van individuele stofgegevens.

In zowel het emissie- als het immissiespoor wordt er momenteel hard gewerkt aan de implementatie van de effectgerichte beoordeling. Een voorbeeld voor het emissiespoor is de Totaal-effluentbeoordeling (TEB). In het immissiespoor is de effectgerichte beoordeling onderdeel van het Chemisch Biologisch beoordelingsinstrumentarium (CBI).

### **2.3.1 Effectgerichte beoordeling in het emissiespoor**

Analoog aan de stofgerichte aanpak wordt er vanuit het oogpunt van preventie aandacht besteed aan zowel Persistentie, Bioaccumulatie als Toxiciteit. De milieuschadelijkheid van een lozing wordt uitgedrukt als een concentratie, bijvoorbeeld de concentratie of verdunning van een effluent waarbij een bepaald effect optreedt. Bij de uiteindelijke beoordeling wordt deze concentratie getoetst aan een norm, eveneens een concentratie. De gemeten milieuschadelijkheid geeft hier inzicht in het intrinsieke gevaar ('hazard'), ofwel de *mogelijke* beïnvloeding van de kwaliteit van het ontvangende watersysteem. Bronnen kunnen aan de hand van deze informatie preventief worden aangepakt.

### **2.3.2 Effectgerichte beoordeling in het immissiespoor**

In tegenstelling tot het preventieve beleid van het emissiespoor, valt het immissiespoor binnen het curatieve beleid en vindt er een beoordeling van de 'actuele' kwaliteit van het watersysteem plaats. Bij de uitwerking van de effectgerichte beoordeling worden naast chemische metingen bioassays uitgevoerd met monsters uit het te beoordelen watersysteem (oppervlaktewater of waterbodem). Op deze manier ontstaat direct een realistisch beeld van de actuele situatie. De doelstelling van de bioassay is hier dan ook het vaststellen van de kans dat er op het moment van meting al ongewenste effecten optreden, het *risico* ('risk'). De bioassay in het immissiespoor wordt aangewend om vast te stellen of aan een vooraf gedefinieerde kwaliteitsdoelstelling, de norm, wordt voldaan. In de praktijk betekent dit dat aangetoond zal moeten worden dat een bepaalde bescherming tegen ongewenste effecten kan worden gegarandeerd. Door middel van reguliere monitoringsprogramma's, zoals het biologisch monitoringsmeetnet van RWS (Gilde *et al.*, 1999) voor wilde populaties, planten en dieren, worden eventuele verborgen lange termijn effecten van persistente en bioaccumulerende toxische stoffen gesignaleerd.

## **2.4 Normstelling voor bioassays**

Alvorens bioassays effectief kunnen worden ingezet als beleidsinstrument moet op wetenschappelijke gronden een beleidsmatige maatlat worden ontwikkeld. Deze maatlat wordt in hoofdstuk 4 van dit document verder uitgewerkt. Voor de normen die in dit hoofdstuk worden afgeleid wordt dezelfde systematiek gebruikt als voor het afleiden van normen voor stoffen. Daarmee passen normen voor bioassays naadloos in het vigerende beleid. De voorgestelde maatlat is primair bedoeld voor *toxiciteit* in het *immissiespoor* en is daarmee direct toepasbaar voor de kwaliteitsbeoordeling van het watersysteem. Op termijn wordt er voor het emissiespoor een koppeling

---

tot stand gebracht op basis van de immissie toets. Voor bioaccumulatie en persistentie binnen het emissiespoor kunnen in de toekomst aparte maatlaten worden afgeleid.

---

## 3 Bioassays

---

*In dit hoofdstuk worden de bioassays geïntroduceerd. Na een definitie van in vivo en in vitro bioassays worden deze assays verder toegelicht in respectievelijk § 3.1.1 en § 3.1.2. In § 3.1.3 wordt een overzicht gegeven van de mogelijkheden en beperkingen van bioassays en van de belangrijkste karakteristieken in vergelijking met chemische analyses. In § 3.2 wordt aandacht besteed aan de kwaliteit waaraan bioassays moeten voldoen. In § 3.3 wordt een overzicht gegeven van de huidige toepassing van bioassays in verschillende kaders en verschillende milieucompartimenten. Het hoofdstuk wordt afgesloten (§ 3.4) met een blik op de toekomst: wat dient er nog te gebeuren alvorens de genoemde bioassays ingepast kunnen worden in een biologisch meetinstrumentarium ten behoeve van de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodem en welke aanvullende voorwaarden voor toepassing dienen dan gesteld te worden?*

### 3.1 Bioassays: inleiding en definities

In dit document wordt de volgende definitie van bioassays aangehouden:

*Een bioassay is een techniek waarmee biologische effecten van giftige verontreinigende stoffen zichtbaar gemaakt kunnen worden. In een bioassay worden uit laboratoriumkweek of uit het veld verkregen organismen of delen van organismen (weefsels of cellen) op gestandaardiseerde wijze in het laboratorium of in een veldsituatie blootgesteld aan milieumonsters.*

Bioassays kunnen onderscheiden worden *in vivo* bioassays en *in vitro* bioassays. Van deze termen zijn verschillende definities in omloop. In dit rapport wordt ervoor gekozen aan te sluiten bij de definities gehanteerd in de recente rapportage van RIKZ en RIZA (Swertz *et al.*, 1999). Naast het onderscheid tussen *in vivo* en *in vitro* bioassays, bestaat ook het onderscheid tussen enerzijds breed spectrum bioassays en anderzijds de op een *specifiek werkingsmechanisme* (bijvoorbeeld genotoxiciteit, hormoon toxiciteit) gebaseerde assay.

- *In vivo bioassays zijn proeven waarin levende complete organismen (inclusief bacteriën) worden blootgesteld aan water, sediment, effluent of baggerspecie, of extracten daarvan. Deze testen kunnen worden uitgevoerd in het laboratorium of in de veldsituatie (in situ). De proeven kunnen kortdurend zijn (van enkele uren tot dagen) waarmee acute effecten kunnen worden vastgesteld, of langdurend (dagen tot maanden) waarmee chronische effecten kunnen worden bepaald. De in vivo bioassay is over het algemeen een breed spectrum bioassay.*
- *In vitro bioassays zijn laboratoriumproeven waarin gebruik gemaakt wordt van geprepareerde cellen of subcellulaire fracties die geïsoleerd zijn uit organismen of van gemodificeerde bacteriën. De assays zijn meestal werkingsspecifiek ('mechanism-based'). Deze testen zijn kortdurend (van enkele minuten tot dagen), snel uitvoerbaar en kleinschalig.*

---

Het onderscheid tussen *in vivo* en *in vitro* testen, breedspectrum of werkingsspecifiek, is niet altijd eenduidig. Zo wordt dezelfde test met ééncelligen (bacteriën, algen), die op reageerbuisschaal wordt uitgevoerd, zowel onder de ene (*in vivo*) als onder de andere (*in vitro*) categorie geschaard. In deze rapportage zal, om praktische redenen, het onderscheid tussen *in vivo* en *in vitro* samenvallen met het onderscheid tussen een *breedspectrum assay* en een *assay, die op een specifiek werkingsmechanisme is gebaseerd*. Zo valt de breedspectrum bacterietest Microtox onder de *in vivo* testen en de genotoxische bacterietest Mutatox onder de *in vitro* testen.

In de hiernavolgende paragrafen worden de begrippen '*in vivo* bioassay' en '*in vitro* bioassay' nog wat verder toegelicht.

### 3.1.1 *In vivo* bioassays

*In vivo* bioassays zijn zó ontwikkeld, dat een veelal breedspectrum beoordeling plaatsvindt op onder meer acute of chronische toxiciteit van het milieumonster. Effecten die geregistreerd worden, de zogenaamde *eindpunten*, worden vergeleken met eindpunten uit controletesten. Eindpunten zijn bijvoorbeeld sterfte, verminderde groei en verminderde mobiliteit.

*Acute* testen zijn bedoeld voor een eerste screening, kortdurend en met 'grove' effecten (sterfte of verminderde activiteit). Acute testen staan voor een 'realistische worst-case' situatie: een kortdurende blootstelling aan relatief hoge concentraties van verontreinigende stoffen.

*Chronische* testen beogen meer de werkelijke situatie te benaderen: een langduriger blootstelling (dit is: een substantieel deel van de levensduur van het testorganisme) aan lagere concentraties. Eindpunten zijn dan bijvoorbeeld (een vermindering van) reproductie en groei van het testorganisme. Chronische testen zijn over het algemeen gevoeliger, maar ook duurder en uitvoering ervan is complexer dan bij de acute testen.

Afhankelijk van de mate van verontreiniging van een compartiment wordt een keuze gemaakt voor toepassing van een acute of een chronische test. Zo kunnen in oppervlaktewater rondom glastuinbouw, in regionale wateren, acute effecten worden waargenomen; andere compartimenten (waterbodems) laten meer chronische effecten zien. Worden noch chronische, noch acute effecten gemeten en wil men toch trends in toxiciteit vaststellen of kunnen aangeven waar het toxiciteitsniveau zich bevindt, dan is het mogelijk om acute testen toe te passen op concentraten van het oppervlaktewater. Hierbij moet rekening gehouden worden met het feit dat met de verschillende concentratietechnieken niet alle stoffen in vergelijkbare mate te concentreren zijn. Dit geldt in het bijzonder voor metalen. Desondanks worden in de huidige kwaliteitsbeoordeling van het oppervlaktewater veelal acute toetsen op concentraten uitgevoerd (Hendriks *et al.*, 1998).

Voor een algemene kwaliteitsbeoordeling wordt vaak een *batterij van testen* ingezet met meer soorten uit verschillende taxonomische groepen. Wanneer meer bekend is over de te verwachten aanwezige stoffen (stofgroepen) is een optimale inzet van bioassays mogelijk door het gevoeligste testorganisme te kiezen. Zo zijn algen en kroos in het algemeen gevoelig voor de aanwezigheid van herbiciden, terwijl watervlooien gevoelig zijn voor insecticiden.

### 3.1.2 *In vitro* bioassays

*In vitro* bioassays zijn testen die responderen bij een interactie van stoffen met een of meer specifieke biologische aangrijpingspunten of receptoren, behorend bij een specifiek mechanisme van toxiciteit. Met deze assays kan

snell en zeer gevoelig (in de orde van soms picogrammen per gram) de gesommeerde toxiciteit van een groep van verbindingen met gelijk werkingsmechanisme worden bepaald. Biologische systemen in deze assays bestaan uit subcellulaire fracties, bacteriën, primaire cellen of cellijnen waarin een specifieke receptor is ingebouwd (vaak gebaseerd op humane of zoogdiercellijnen) en/of een specifiek eindpunt wordt gemeten.

De keuze voor een bepaalde *in vitro* bioassay wordt ingegeven door de vraag welk werkingsmechanisme afgedekt dient te worden. In tabel 3.1 is ter illustratie een aantal verschillende werkingsmechanismen aangegeven, alsmede of voor het betreffende werkingsmechanisme inmiddels *in vitro* bioassays beschikbaar zijn of in ontwikkeling zijn. In bijlage 1, tabel 1C, wordt een overzicht gegeven van deze *in vitro* bioassays.

**Tabel 3.1**  
Werkingsmechanismen van toxiciteit  
(naar Legierse, 2001)

| Mechanisme   | <i>In vitro</i> test beschikbaar of in ontwikkeling? | Mechanisme            | <i>In vitro</i> test beschikbaar of in ontwikkeling? |
|--|--|-----------------------|--|
| Genotoxiciteit   | Ja   | Neurotoxiciteit       | Ja   |
| Immunotoxiciteit   | Ja   | Narcose*              | Nee  |
| Oestrogene hormoonverstooring                                | Ja   | Cytotoxiciteit        | Ja   |
| Dioxine-achtige toxiciteit                                   | Ja   | Remming fotosynthese  | Nee  |
| Ontkoppeling oxidatieve fosforylering / inhibitie respiratie | Ja   | Reproductietoxiciteit | Nee  |
|  |  | Teratogeniteit        | Nee  |

\* Tot voor kort werden polaire en non-polaire narcose onderscheiden. De laatste inzichten van Vaes *et al.* (1998) geven aan dat er slechts sprake is van een enkel mechanisme voor narcose. Narcose wordt ook wel aangeduid als 'niet-specifieke toxiciteit'.

### 3.1.3 Mogelijkheden en beperkingen van bioassays

Met bioassays, zowel de *in vivo*'s als de *in vitro*'s, worden effecten van stoffen of stofgroepen zichtbaar gemaakt, die chemisch-analytisch niet of niet goed kunnen worden bepaald of die nog onbekend zijn. Tevens kent een bioassay over het algemeen enige metabole activiteit, zodat ook processen als bioactivatie en biodegradatie een rol zullen spelen in de uitkomsten van het assay. Hoewel bioassays met deze eigenschappen een duidelijke meerwaarde hebben ten opzichte van de toepassing van (alleen) stofgerichte kwaliteitsbeoordelingen, kennen ze ook beperkingen. Hieronder wordt nader op een aantal van die beperkingen ingegaan.

Zo kunnen de geconstateerde effecten niet aan individuele stoffen worden toegeschreven, hetgeen eventueel te nemen maatregelen lastiger maakt. Daar komt bij dat de waargenomen effecten niet, of moeilijk, vertaalbaar zijn naar effecten op het ecosysteem als geheel of naar effecten op de mens (Slooff *et al.*, 2001). Ook bioassays zijn slechts een model van de werkelijkheid en niet de werkelijkheid zelf. Om dit zo goed als mogelijk te ondervangen wordt gebruik gemaakt van een testbatterij van testen met organismen uit verschillende hoofdgroepen en functies van het ecosysteem (RIWA, 2001).

Een andere beperking van bioassays betreft het gegeven dat niet altijd alle toxicologische effecten van stoffen gedetecteerd kunnen worden. Een goed voorbeeld hiervan is tributyltin (TBT), een stof die gebruikt wordt als antifouling (aangroeiwerende verf op schepen). Uit onderzoek blijkt dat deze stof reeds in zeer lage concentraties hormoonverstooring veroorzaakt bij mariene gastropoda (slakken, bijvoorbeeld de wulk), waardoor voortplantingsstoornissen en nadelige effecten op de populatie optreden. Op dit moment

is er geen *in vitro* of *in vivo* bioassay waarin het hormoonverstorende effect van TBT zichtbaar gemaakt kan worden.

Een overzicht van de mogelijkheden en beperkingen van bioassays (*in vivo* en *in vitro*) ten opzichte van chemische analyses is in tabel 3.2 weergegeven. Deze tabel is bedoeld als een globaal houvast om de nuances en verschillen inzichtelijk te maken. Ze is niet bedoeld als een uitputtende opsomming van al deze nuances en verschillen.

**Tabel 3.2**

Belangrijkste karakteristieken en verschillen van bioassays en chemische analyses

| <i>In vivo</i> bioassay   | <i>In vitro</i> bioassay  | Chemische analyse  |
|---|---|--|
| Resultaat is totale geïntegreerde toxiciteit van alle verbindingen        | Resultaat is somtoxiciteit van alle verbindingen met hetzelfde werkingsmechanisme             | Meting resulteert in concentraties van gemeten stoffen waaruit de somconcentratie berekend kan worden. Hieruit kan vervolgens de mengseltoxiciteit worden berekend indien de relatieve potenties bekend zijn |
| Resultaat uitgedrukt in % sterfte of ander effect                         | Resultaat vaak uitgedrukt in toxische equivalenten per ml of g (niet alle <i>in vitro</i> 's) | Resultaat uitgedrukt in mg/l of mg/g   |
| Potenties stoffen wegen mee in resultaat                                  | Potenties stoffen wegen mee in resultaat  | Potenties stoffen spelen vrijwel geen rol  |
| Onbekende stoffen en niet meetbare stoffen wegen mee in resultaat         | Onbekende stoffen en niet meetbare stoffen wegen mee in resultaat                             | Onbekende stoffen en niet gemeten/meetbare stoffen spelen geen rol   |
| Metabole activiteit van toetssoort speelt mee in resultaat                | Er is enige metabole activiteit, echter veelal van humane of zoogdierlijke oorsprong          | Geen metabole activiteit   |
| Gevoeligheid variabel   | Gevoeligheid variabel, aantal assays zeer gevoelig  | Gevoeligheid (limit of detection) variabel   |
| Bioaccumulatie speelt (in enige mate) mee in resultaat                    | Geen bioaccumulatie   | Geen bioaccumulatie  |
| Gebaseerd op concentraat/extract of totaalmonster                         | Gebaseerd op concentraat/extract of totaal monster  | Gebaseerd op concentraat/extract   |
| Redelijk voorspellende waarde van effecten richting soorten en ecosysteem | Beperkte voorspellende waarde van effecten richting soorten en ecosysteem                     | Beperkte voorspellende waarde van effecten richting soorten en ecosysteem  |
| Maatlat wordt ontwikkeld in dit rapport                                   | Aanzet tot maatlat in dit rapport   | Normstelling gericht op stoffen  |
| Geaccepteerd als instrumentarium bij onderzoekers en beleidsmakers        | Nog weinig geaccepteerd   | Volledig geaccepteerd  |

### 3.2 Voorwaarden voor toepassing van bioassays

Belangrijk voor de toepassing en acceptatie van bioassays is dat zij voldoen aan een bepaald kwaliteitsniveau. Onder kwaliteit wordt bijvoorbeeld verstaan dat de bioassay voldoende *relevant* is en voldoende *betrouwbaar*. Hieronder wordt een aantal van deze kwaliteitseisen, voor zover zij betrekking hebben op de mogelijke inzet van bioassays ten behoeve van het reguliere water(bodem)kwaliteitsbeheer, geïnventariseerd en nader toegelicht (zie ook Slooff *et al.*, 2001, voor een uitwerking van kwaliteitseisen voor de *in vivo*'s en Legierse, 2001, voor *in vitro*'s).



---

Uitgangspunt in de toepassing van bioassays ten behoeve van het hierboven genoemde doel is dat het ecosysteem zo goed mogelijk met dit instrumentarium kan worden beschermd. De ideale set van bioassays voor dit instrumentarium is representatief voor alle organismen en trofische niveaus in het betreffende ecosysteem. De gedachte hierachter is dat de bescherming van dat ecosysteem via bescherming van een aantal 'trigger-soorten' uit een aantal taxonomische groepen veilig gesteld wordt. Vervolgens dient, in het ideale geval, de respons van de set assays alle mogelijke stoffen af te dekken op zowel acuut als chronisch niveau. Dit betekent dat het instrumentarium er als volgt dient uit te zien:

*1. ecologisch en/of toxicologisch relevant*

De relevantie is de zekerheid dat de bioassay het (toxisch en ecologisch) effect, waar de interesse naar uitgaat, in werkelijkheid zal meten. De toxicologische relevantie wordt onder andere bepaald door de gevoeligheid, specificiteit en onderscheidend vermogen van de test (zie verder). Iets anders is of het gemeten effect ook daadwerkelijk ecologisch relevant is: bioassays vormen, als gezegd, 'slechts' een model van de werkelijkheid. Met name de ecologische relevantie van *in vitro* assays staat ter discussie. Resultaten uit een gecombineerde set van bioassays (dus zowel *in vivo's* als *in vitro's*) kunnen echter wel optellen om tot een uitspraak over de ecologische relevantie van de geconstateerde effecten te komen, uiteraard vooral in het geval dat de resultaten uit beide typen assays elkaar niet tegenspreken.

*2. representatief voor alle organismen en trofische niveaus in het betreffende ecosysteem*

Op dit moment is er geen bioassay voorhanden die representatief is voor alle organismen en trofische niveaus. Het ligt overigens ook niet voor de hand dat een dergelijke bioassay ontwikkeld zal worden gezien de variatie in organismen (van alg tot aalscholver). Dit betekent dat altijd een set bioassays nodig is, waarmee zo goed mogelijk het ecosysteem wordt afgedekt. Idealiter bestaat deze set uit een bioassay voor elke klasse van organismen, dus voor alg, bacterie, kreeftachtige, slak, vis, vogel, enzovoorts. Aansluiting bij wat op dit moment in de chemische normstelling als handvat wordt gehanteerd, namelijk minimaal 3 of 4 verschillende taxonomische groepen, waarvan minimaal 1 gewervelde, leidt tot een set van minimaal 3 of 4 *in vivo* bioassays, waarvan 1 met vissen.

*3. alle effecten van alle mogelijke stoffen of werkingsmechanismen zowel acuut als chronisch afdekkend*

Op dit moment is er geen *in vivo* of *in vitro* bioassay beschikbaar, die alle mogelijke stoffen, of alle mogelijke werkingsmechanismen detecteert. Integendeel zelfs, er blijken stoffen te bestaan die nadelige effecten hebben op organismen, maar die door geen enkele op dit moment bestaande bioassay worden opgepikt. Eerder werd in dit verband al het voorbeeld van tributyltin, TBT, aangehaald. De beste benadering van deze problematiek is een set van *in vivo* en *in vitro* bioassays die zoveel mogelijk verschillende werkingsmechanismen afdekt. De breedspectrum *in vivo* bioassays zijn, in tegenstelling tot de specifiekere *in vitro* bioassays, in staat om diverse werkingsmechanismen af te dekken.

Een aantal werkingsmechanismen wordt echter minder goed door *in vivo* bioassays afgedekt, ófwel omdat deze testen minder gevoelig zijn, ófwel omdat de betreffende effecten pas bij een langdurige chronische blootstelling optreden. Het betreft hier met name genotoxiciteit, immunotoxiciteit, hormoonverstoring en dioxineachtige toxiciteit en de eerste verschijnselen van neurotoxiciteit. Effecten via deze werkingsmechanismen kunnen *in vitro* bioassays vaak wel worden gedetecteerd.

---

#### 4. gevoelig, voldoende specifiek en onderscheidend om effecten te voorspellen

Sommige bioassays reageren zeer gevoelig op zeer kleine hoeveelheden verontreinigende stoffen in het te testen materiaal. Met name is dit het geval bij de *in vitro*'s, de testen die specifiek responderen op een bepaald werkingsmechanisme. De relatie tussen effecten gevonden in een *in vitro* assay en een (relevante) *in vivo* test is niet altijd eenduidig. Soms worden bepaalde effecten wel opgemerkt in een *in vivo* assay en zijn ze niet terug te vinden in de *in vitro* situatie. Dit kan bijvoorbeeld worden veroorzaakt door het ontbreken van bepaalde processen (biotransformatie, bioconcentratie) *in vitro* assays, die wel optreden *in vivo*'s. Ook de reciproke situatie komt voor: geen respons *in vivo*, wel *in vitro*. Dit kan bijvoorbeeld optreden door de aanwezigheid van onbekende stoffen en metabolieten hiervan of er is in het milieumonster verlies van verbindingen opgetreden tijdens voorbewerking en blootstelling. Bij de *in vitro* assay dient vooral de kans op zogenaamd fout-negatieve testuitslagen zo klein mogelijk te zijn, dit wil zeggen: de test slaat niet uit, terwijl dit op grond van voorkennis omtrent de in het monster aanwezige stoffen wél zou moeten. Op grond van alleen de effecten gemeten *in vitro* assays is het niet mogelijk een definitief uitsluitel te geven over te verwachten effecten in het intacte organisme. Om hiervoor een bevestiging te krijgen is het altijd nodig *in vivo* bioassays uit te voeren.

#### 5. betrouwbaar en reproduceerbaar

De betrouwbaarheid of precisie van een bioassay is de reproduceerbaarheid van de assay bij toepassing binnen een laboratorium, maar ook tussen een aantal laboratoria (intra- en interlaboratorium reproduceerbaarheid). De reproduceerbaarheid wordt bepaald door de stabiliteit ('robuustheid') van de assay. Bij een stabiele assay is een gestandaardiseerde methode, vastgelegd in een protocol, essentieel.

Op basis van de onder 1 tot en met 5 genoemde voorwaarden voor toepassing van bioassays is in de afgelopen jaren een groot aantal bioassays in verschillende kaders tot ontwikkeling gekomen. In paragraaf 3.3 wordt daarvan een klein overzicht geboden.

### 3.3 Huidige toepassing van bioassays in verschillende kaders en milieucompartimenten

Bioassays worden reeds in verschillende kaders van kwaliteitsbeoordeling en kwaliteitsbewaking (monitoring) ingezet. Op dit moment blijken ze vooral toepassing te vinden in de monitoring van de kwaliteit van de rijkswateren (onder andere bij de innamelocaties voor drinkwater) en bij de beoordeling van de kwaliteit van effluenten en baggerspecie. In het beheer van de regionale wateren worden bioassays om diverse redenen nog niet voluit ingezet.

In de volgende paragrafen wordt ten behoeve van het algemene beeld van bioassays een overzicht gegeven van de stand van zaken ten aanzien van de toepassing van bioassays in diverse kaders en in diverse milieucompartimenten. In bijlage 1 van dit rapport worden in een aantal tabellen de huidig toegepaste bioassays geïnventariseerd, onder andere gerangschikt per compartiment, per kader (monitoring, kwaliteitsbeoordeling) en per type (acuut of chronisch).

Per behandeld compartiment hieronder wordt voor de bijbehorende bioassays steeds naar de betreffende tabel in bijlage 1 verwezen. In Slooff *et al.* (2001) en STOWA (1997a en 1997b) wordt een algemeen overzicht gegeven van

---

de beschikbare effect monitoringstechnieken voor de verschillende milieu-compartimenten, de specifieke voor- en nadelen ervan en de verschillende gebieden van onderzoek met de specifieke doelstelling voor inzet van dergelijke technieken.

### 3.3.1 Oppervlaktewater

In tabel 1A van bijlage 1 zijn *in vivo* bioassays bijeengebracht, die op dit moment gebruikt worden in de kwaliteitsbewaking en kwaliteitsbeoordeling van zoet en zout oppervlaktewater. Een inventarisatie van *in vitro* bioassays en hun toepassing in oppervlaktewater is te vinden in tabel 1C van bijlage 1.

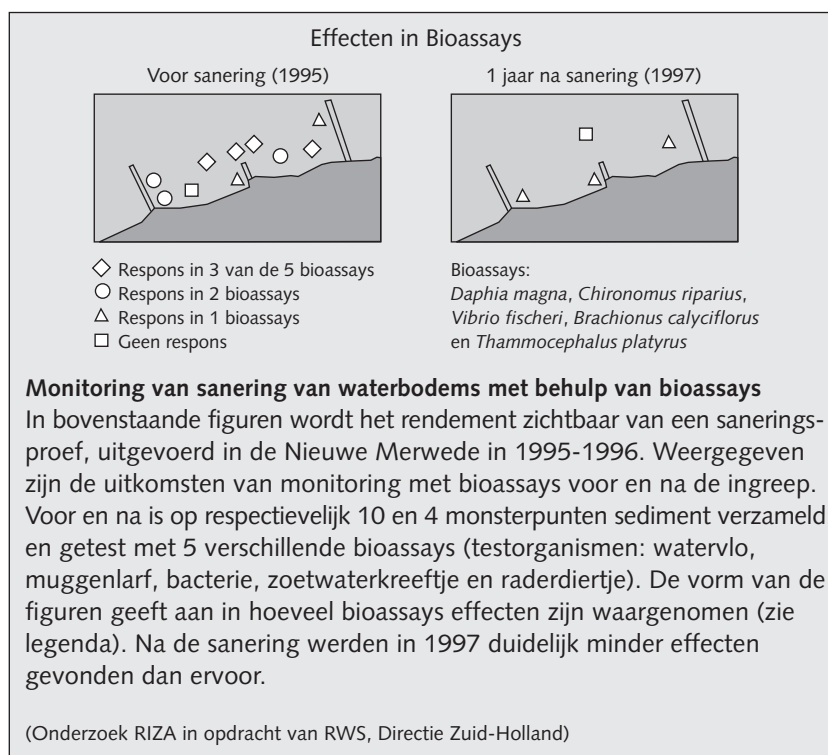
Bij de huidige stand van zaken gaat het bij bioassays voor de kwaliteitsbeoordeling van het oppervlaktewater overwegend om testen die in rijkswateren worden uitgevoerd. In regionale wateren wordt nog maar op zeer kleine schaal gebruik gemaakt van bioassays (Driesprong, 2000; STOWA, 1997a). Dit kwam ook naar voren in een korte inventarisatieronde die werd gemaakt langs verschillende waterschappen, waaruit onder andere blijkt dat *in vitro* bioassays nog in het geheel niet worden ingezet in het regionale beheer (zie het kader voor de resultaten). Voor deze terughoudendheid is een aantal redenen aan te geven: de kosten van implementatie van nieuwe technieken zijn hoog en brengen extra inspanningen met zich mee, terwijl er onder de waterkwaliteitsbeheerders nog wel scepsis bestaat over de kwaliteit van de metingen (Swertz *et al.*, 1999). Bovendien ontbreekt, zoals eerder reeds opgemerkt, een eenduidig beoordelingskader waaraan effecten uit bioassays gerelateerd kunnen worden. Dit staat toepassing ervan in de weg.

#### **Ervaring van de regionale waterkwaliteitsbeheerder met biologische effectmetingen voor kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater, waterbodembodem en effluent**

- Zuiveringsschap Limburg: inzet van bioassays in deze kaders is nooit overwogen. De respondent verwacht dat de meeste beheerders er ook niets mee zullen doen.
- Hoogheemraadschap Stichtse Rijnlanden: hier is wel eens een *Daphnia* in situ-test geprobeerd, maar was niet succesvol. Door eutrofiëring van het oppervlaktewater in de plassen groeiden de *Daphnia*'s als kool. In mesotrofe situaties hadden de testen geen resultaat. Voor waterbodembodem en effluent is de inzet nog niet duidelijk.
- Waterschap Maaskant: hier zijn bioassays nog nooit toegepast, omdat men er nog niet aan toegekomen is. De respondent verwacht dat het waterschap er in de toekomst wel toe zal moeten gaan.
- Hoogheemraadschap Rijnland: bioassays worden mondjesmaat (via uitbesteding) ingezet. Een voorbeeld is het gebruik (Triade) bij de sanering van waterbodembodem. Incidenteel komt biologische effectbeoordeling in projecten naar voren, bijvoorbeeld rond effluenten. In 1992 is bij een calamiteit in het gebied van Woerden een Microtox proef uitgevoerd aan het bluswater.
- Wetterskip Fryslân: geen inzet van bioassays in het waterkwaliteitsbeheer van het oppervlaktewater. Voor een ecotoxicologische effectbeoordeling van effluenten van RWZI's worden alle effluenten 3 maal per jaar met de Microtox gemeten in het kader van het Zwarte Lijststoffenonderzoek. Biologische effectbeoordeling van waterbodembodem vindt incidenteel plaats, onder andere een keer bij de lozingspunten van een zestal RWZI's. Het waterschap heeft 3 toxiciteitstesten in huis: bacteriën, algen en watervlooien.

(Resultaten van een korte interviewronde dd. september 2001)

Bij monitoring van de kwaliteit van het oppervlaktewater worden op dit moment op kleine schaal bioassays ingezet. Zo vindt reguliere monitoring in de rijkswateren in het kader van de 'waterstaatkundige toestand des lands' (MWTL) sinds 1992 plaats met behulp van bioassays. En verder worden er nog bioassays 'in situ' ingezet, de zogenaamde biologische alarmering, waarbij de toxiciteit van watermonsters wordt onderzocht door een continue blootstelling van watervlooiën en algen in een doorstroomcuve, waarbij zwemgedrag en fotosynthese de effectparameters zijn (Gilde *et al.*, 1999). Biologische alarmering wordt in Nederland toegepast bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater: ernstige verontreinigingen van het Maaswater worden uit het spaarbekken gehouden door geen water in te laten als de bioassays alarm slaan.



### 3.3.2 Sediment

Voor de beoordeling van de kwaliteit van waterbodems in situ worden reeds enkele jaren biologische effectmetingen toegepast (Gilde *et al.*, 1999). Ecotoxicologische testen worden ook ingezet om de effectiviteit van ingrepen vast te stellen (zie kader en Jans *et al.*, 2002). Tot nu toe zijn dit dezelfde effectmetingen als die gebruikt worden in de TRIADE-beoordeling (zie § 3.3.4). Daarbij gaat het om testen die geschikt zijn om *urgentie en prioriteit* van een te saneren locatie vast te stellen. Voor een beoordeling van de kwaliteit van het sediment in situ is eigenlijk een andere invulling van de set testen gewenst, waarbij de nadruk meer zou moeten komen te liggen op bioassays die worden uitgevoerd met sedimentbewonende organismen. Hiervoor is een uitbreiding van het aantal bioassays noodzakelijk. Een aantal daarvan is reeds beschikbaar, maar validatie en toepassing in de praktijk heeft nog nauwelijks plaatsgevonden.

In tabel 1B van bijlage 1 wordt een overzicht gegeven van de beschikbare testen en het kader waarin ze operationeel zijn. Een inventarisatie van *in vitro* bioassays en hun toepassing in sediment, is te vinden in tabel 1C van bijlage 1.

---

### 3.3.3 Effluent

In het kader van de kwaliteitsbeoordeling van effluënten heeft de laatste jaren vooral de ontwikkeling van de Totaal-effluentbeoordeling (TEB) veel aandacht getrokken. In dit totaal-programma worden behalve biologische testen voor zoute en zoete effluënten ook technieken ontwikkeld om de oorzaken van de effecten te achterhalen, zodat maatregelen aan de bron genomen kunnen worden (Tonkes *et al.*, 2000). Het idee achter deze methode is dat met behulp van verschillende testen inzicht wordt verkregen in de toxiciteit (acuut en chronisch), persistentie, bioaccumulatie en genotoxiciteit van het effluent. Met name deze parameters zijn van belang voor de beoordeling van de milieubezwaarlijkheid van het effluent. De methodiek, ontwikkeld door RIZA, dient in 2005 gereed te zijn voor implementatie.

Tabel 1D uit bijlage 1 geeft een overzicht van de assays die in het kader van TEB relevant geacht worden.

### 3.3.4 Verontreinigde waterbodems en baggerspecie

In het onderzoek aan verontreinigde waterbodems worden reeds enkele jaren biologische effectmetingen toegepast. Door middel van een geïntegreerd beoordelingssysteem, waarbij resultaten van fysisch-chemische analyses worden gezet naast gegevens uit bioassays en uit veldonderzoek (de zogenaamde TRIADE-benadering; Van Elswijk & Hin, 2002; den Besten, 1997; Den Besten *et al.*, 1995; van de Guchte *et al.*, 1991; Maas *et al.*, 1993) worden urgentie en prioriteit van de te saneren locaties vastgesteld. Bioassays vormen hierin de schakel tussen de andere twee typen metingen zodat oorzaak-gevolg relaties gelegd kunnen worden. De testen die voor TRIADE werden geselecteerd zijn te vinden in tabel 1E van bijlage 1.

Ten behoeve van het op diepte houden van watergangen worden zoet en zout sediment gebaggerd en verspreid in het milieu. Met behulp van biologische effectmetingen kan worden onderzocht in hoeverre de kwaliteit van de te verspreiden baggerspecie voldoet aan bepaalde criteria, waarbij naar verwachting het ontvangend milieu niet nadelig wordt belast. De biologische testbatterij die door RIKZ wordt voorgesteld in de nieuwe CTT-systematiek voor beoordeling van verspreiding van zoute baggerspecie op zee staat beschreven in tabel 1F in bijlage 1.

## 3.4 Ontwikkelingen in de nabije toekomst

Hoe ver is het op dit moment gesteld met de ontwikkeling van een biologische testbatterij voor de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodems? Zijn de bioassays, die in voorgaande paragrafen werden genoemd, al hiervoor in te zetten en zo niet, wat dient er dan nog te gebeuren? Om hier een idee van te krijgen wordt de stand van zaken ten aanzien van de ontwikkeling van een biologisch meetinstrumentarium hieronder kort geschetst. Deze schets leidt tot een overzicht van een aantal aanvullende voorwaarden waaraan een set van bioassays, in te zetten in het nieuwe instrumentarium, dient te voldoen.

Zoals hierboven al geïllustreerd, gebruikt het RIZA reeds enige jaren *in vivo* bioassays voor de beoordeling van water en waterbodems. Van vele testen zijn nu internationale richtlijnen aanwezig, maar deze zijn voornamelijk gericht op testen met stoffen. Het toepassen van deze testen op milieu-monsters vergt extra aandacht voor de voorbereiding van monsters en het vaststellen van fysisch-chemische randvoorwaarden waarbij géén effect verwacht wordt.

---

Op dit moment en de komende jaren wordt mede in samenwerking met het RIVM een inspanning geleverd om de methodiek en de set van bioassays voor de waterkwaliteitsbeoordeling geschikt te maken voor routinematig gebruik. Daarbij wordt met name ingezet op de analytische en ecologische validatie.

De set bioassays voor de beoordeling van sediment wordt momenteel geoptimaliseerd. Uitbreiding van de set is noodzakelijk niet alleen om meer sediment-testen te ontwikkelen, maar ook om meer onderscheidend vermogen te krijgen. Ook hiervoor geldt dat de aandacht met name uitgaat naar de analytische, milieuchemische en ecologische validatie van de testen. Naar verwachting is de validatie in 2006 gereed wanneer het chemisch-biologisch instrumentarium (CBI) geoperationaliseerd wordt. Extra aandacht vraagt de kwaliteit van het sediment in de brakke gebieden: juist hier hopen relatief veel verontreinigingen zich op, terwijl de huidige *in vivo* assays dikwijls nog te ongevoelig blijken om de biologische effecten te detecteren. Het is dan ook van groot belang dat de te ontwikkelen bioassays ook toepasbaar zijn in deze brakke wateren.

Diverse *in vitro* bioassays zijn of worden op dit moment binnen Nederland – voornamelijk in het kader van de ontwikkeling van het genoemde chemisch-biologisch instrumentarium door het RIKZ – en buiten Nederland ontwikkeld (zie § 3.1.2 en bijlage 1, tabel 1C). Er zijn enkele *in vitro's* (met name de DR-CALUX, maar ook andere) die in een meer of minder gevorderd stadium van ontwikkeling zijn (RWS-SOP voorhanden, internationale testrichtlijnen in ontwikkeling, analytische en milieuchemische validaties uitgevoerd, enzovoorts). Voor de meeste *in vitro's* geldt dat er nog meer onderzoek dient plaats te vinden naar de ecologische validatie: de relatie tussen de respons en de effecten die in veldsituaties optreden. Op dit moment wordt vanuit RIKZ een inspanning geleverd om een aantal van deze assays verder voor routinematige beoordeling en monitoring geschikt te maken. Daarbij dient ook voor alle assays de voorbehandelingsstap (de extractie van het milieumonster) milieuchemisch gevalideerd te worden. Ook hier geldt dat volledige validatie naar verwachting gereed is wanneer het CBI wordt geoperationaliseerd.

Voor de te ontwikkelen instrumentaria dient steeds uit het aanbod van bioassays een selectie gemaakt te worden. Behalve de wetenschappelijk-inhoudelijke criteria die hiervoor gehanteerd kunnen worden en die uitgewerkt werden in § 3.2, zullen ook andere criteria van meer praktische aard een rol spelen. Hieronder worden deze aanvullende voorwaarden op een rij gezet en kort toegelicht. Net als voor de eerdere reeks van criteria geldt ook voor deze dat er op dit moment slechts een aantal bioassays gedeeltelijk aan deze criteria voldoet. In de nabije toekomst zal er meer aandacht moeten komen voor een nadere uitwerking.

#### 1. (inter)nationale protocollen

Er moet een (inter)nationaal geaccepteerde richtlijn zijn voor het uitvoeren van een bioassay. De voorkeur verdient een internationaal geaccepteerde richtlijn zoals van de OECD of ISO. In ieder geval dient er een protocol te zijn dat in Nederland geaccepteerd wordt. Dit geldt zowel voor de bioassay zelf als voor de voorbereiding (zoals monsternamen en extractiemethode).

#### 2. juridisch kader

Samenhangend met het onder 1 genoemde zal de set van bioassays zodanig 'uitontwikkeld' en breed geaccepteerd moeten zijn, dat de resultaten in een juridisch kader in te passen zijn ('Raad van State-proof').

---

### 3. financiën

Inpassing van het instrument van bioassays in het reguliere pakket voor de beoordeling van de kwaliteit van oppervlaktewater en waterbodem brengt met zich mee dat de kosten niet te hoog kunnen oplopen. Een exact bedrag is hiervoor uiteraard niet te geven maar dure bioassay-pakketten zullen naar verwachting weinig kans maken om succesvol ingevoerd te worden.

### 4. beschikbaarheid laboratoria

Invoering van bioassays in de reguliere kwaliteitsbeoordeling van water en waterbodem zal een enorm beslag leggen op de beschikbare laboratoriumcapaciteit. Uitbreiding van deze capaciteit zal daarom gewenst zijn: er dienen – liefst meer – contractlaboratoria te zijn die de bioassays routinematig kunnen uitvoeren.

### 5. proefdiergebruik

Er is een maatschappelijke wens om het proefdiergebruik terug te dringen, met name voor gewervelde dieren zoals vissen. Verwacht mag worden dat deze tendens alleen maar sterker zal worden in de toekomst. Dit betekent automatisch dat voor een set van *in vivo* bioassays testen met ongewervelde organismen de voorkeur verdienen en assays met vissen dus minder gewenst zijn. Tevens betekent dit dat de ontwikkeling van *in vitro* bioassays meer aandacht zal krijgen.

### 6. beschikbaarheid van de test en inpassing in de maatlat

Lang niet alle testen die kansrijk zijn, zijn inmiddels al zo ver ontwikkeld dat opname in een biologisch meetinstrumentarium al mogelijk is. Op dit moment zijn voor de *in vivo* testen de assays met drie taxonomische groepen (algen, bacteriën en crustacea (veelal *Daphnia spec.*)) het meest kansrijk. Voor de *in vitro* testen werd geconcludeerd dat op korte termijn de DR-CALUX de meeste kansen biedt voor toepassing en opname in een biologisch meetinstrumentarium. Op langere termijn zijn naar verwachting de ER-CALUX en Acetylcholine-Esterase (AChE) assay kansrijk. Daarnaast dienen uiteraard de resultaten van de in de testbatterij gekozen bioassays in te passen te zijn in de maatlaten, die worden voorgesteld in hoofdstuk 4.

---



---

## 4 Beoordelingskader: maatlat en criteria

---

*In dit hoofdstuk staan de maatlatten centraal. In het eerste deel (§ 4.1) worden na een inleiding (§ 4.1.1) de nieuw ontwikkelde maatlatten voor in vivo bioassays bij de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en sediment voorgesteld (§ 4.1.2). Daarbij is dezelfde systematiek gebruikt als voor het afleiden van normen voor stoffen. In § 4.1.3 wordt een benadering van de maatlat voor een specifieke in vitro bioassay (de DR-CALUX) geïntroduceerd. In het tweede deel van het hoofdstuk (§ 4.2) wordt een overzicht gegeven van nationale ontwikkelingen op het gebied van een maatlat voor bioassays in andere milieucapartimenten (landbodems, het saneringstraject voor waterbodems en productgebieden als effluent en baggerspecie).*

### 4.1 Maatlatten voor bioassays

#### 4.1.1 Inleiding

Met een maatlat worden de resultaten van bioassays op een bepaalde schaal geplaatst. In deze paragraaf worden de maatlatten uitgewerkt op grond van in vivo bioassays voor oppervlaktewater en sediment en op grond van in vitro bioassays. In een aparte workshop, die plaatsvond op 9 april 2002, zijn deze maatlatten met deskundigen uit het werkveld uitgebreid besproken. Het discussiedocument – dat de basis van de voorstellen vormde – en het verslag van de workshop waarin de besluiten expliciet gemaakt zijn, is verschenen in een workshop-document (Van de Plassche & Straetmans, 2002). Dit workshop-document vormt dan ook de basis van deze paragraaf.

Aangezien volgens de Tussendoelennotitie van de regering (TK 24, 2000-2001) de 'nieuwe waterkwaliteitsparameter' gedefinieerd wordt als "een aanvullende normering voor de vele in het water aanwezige stoffen waarvoor nog geen normen bestaan en waarvoor nog geen routinematige monitoring plaatsvindt", ligt het voor de hand om de maatlat aan te laten sluiten bij de normstelling voor individuele stoffen. Onderscheiden worden drie, niet wettelijk vastgelegde, milieukwaliteitsnormen:

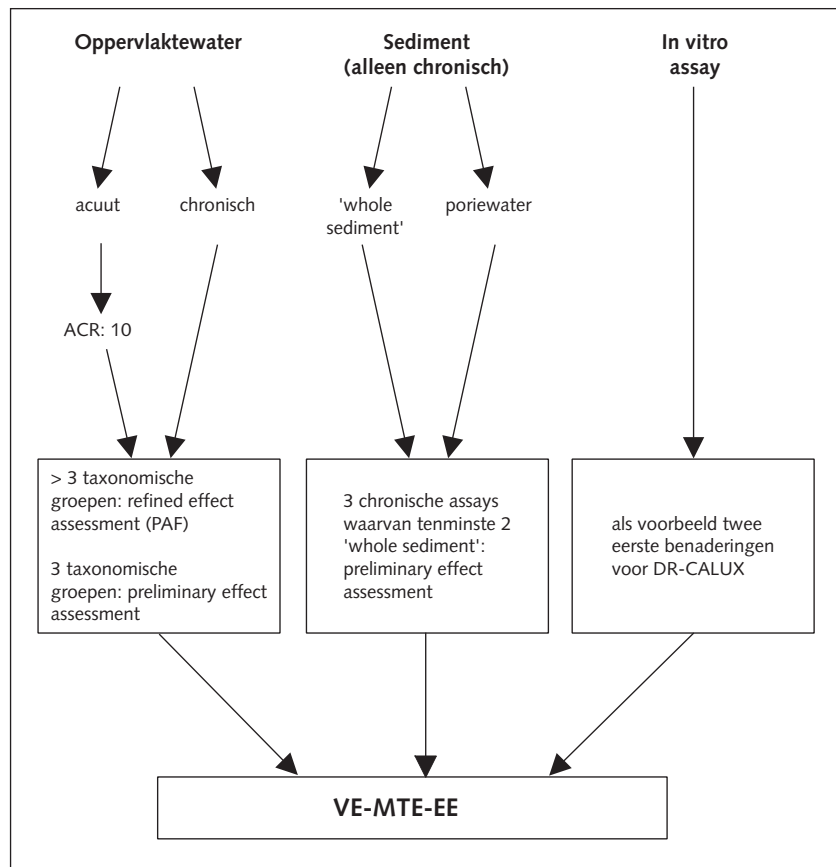
1. de interventiewaarde, die aangeeft bij welke concentratie ernstige risico's van de aanwezige stof optreden. Deze waarde stoelt op het wetenschappelijk afgeleide risiconiveau ER (Ernstige risiconiveau).
2. het maximaal toelaatbaar risico, de concentratie waarbij bescherming van het ecosysteem tegen de effecten van de blootstelling van één enkele stof beschermd is. Deze waarde is gebaseerd op het wetenschappelijk afgeleid risiconiveau MTR (Maximaal toelaatbaar risiconiveau, met dezelfde naam als de milieukwaliteitsnorm).
3. de streefwaarde, die bescherming biedt tegen gelijktijdige blootstelling aan mengsels van stoffen. Deze waarde is vastgelegd op 1/100 ste van het MTR, dat wetenschappelijk de naam VR (Verwaarloosbaar Risiconiveau) heeft meegekregen.

Het ER, MTR en VR zijn bekende risicogrenzen, die in de 'klassieke' stofbeoordeling en in het kader van 'Integrale Normstelling Stoffen' (INS) gehanteerd worden. De term 'risiconiveau' is echter te zeer gekoppeld aan afleiding van dit niveau voor één enkele stof op basis van enkelvoudige toxiciteitstesten. Daarom worden de volgende nieuwe termen voorgesteld:

Verwaarloosbaar Effect: VE,  
 Maximaal Toelaatbaar Effect: MTE,  
 Ernstig Effect: EE.

In de onderstaande paragrafen worden de criteria ingevuld (dit wil zeggen: 'de streepjes op de maatlat' gezet) voor oppervlaktewater en sediment, betrekking hebbend op *in vivo* bioassays (§ 4.1.2) en voor *in vitro* bioassays (§ 4.1.3). In figuur 4.1 zijn de maatlatten schematisch gepresenteerd.

**Figuur 4.1**  
 Samenvatting van de maatlatten op grond van *in vivo* bioassays voor oppervlaktewater en sediment en op grond van *in vitro* bioassays (ACR: acuut-chronische ratio; PAF: potentially affected fraction)



#### 4.1.2 Voorstel voor maatlat en criteria voor gebruik van *in vivo* bioassays in het kader van de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodem

Voor het schalen van de resultaten van deze bioassays wordt, zoals reeds opgemerkt in de inleiding, gekozen voor een maatlat conform het VR-MTR-ER-concept: het VE, MTE en EE.

Voor wat betreft de aansluiting bij normstelling voor individuele stoffen van de hier beschreven maatlat moet vooraf een tweetal opmerkingen gemaakt worden:

1. ten aanzien van de methode: voor de maatlat wordt gebruik gemaakt van dezelfde methoden als bij normstelling voor stoffen, beschreven in

---

het RIVM-rapport *Guidance Document on deriving Environmental Risk Limits* (Traas, 2001):

- als voor 4 of meer taxonomische groepen NOEC-waarden uit chronische studies aanwezig zijn wordt 'refined effect assessment' toegepast. Daarbij wordt gebruik gemaakt van species-gevoeligheidsverdelingen (SSD's), waarbij de methode volgens Aldenberg & Jaworska (2000) wordt toegepast. Het criterium voor het MTR (hier: MTE) is het 95% beschermingsniveau of de PAF<sub>5</sub> (PAF: potentially affected fraction).
- indien aan bovengenoemde voorwaarde niet wordt voldaan wordt 'preliminary effect assessment' toegepast, waarbij gebruik wordt gemaakt van zogenaamde 'assessment factors'. Deze factoren variëren tussen de 10 en 1000, waarbij de hoogte afhangt van de aard van de studie – acuut dan wel chronisch – en het aantal ecotoxiciteitsdata.

Voor de hieronder voorgestelde maatlat voor bioassays worden dus deze zelfde twee methoden gebruikt, waarbij de keuze voor een methode afhangt van het aantal beschikbare *chronische* gegevens. Opgemerkt moet worden dat voor de maatlat bij 'preliminary effect assessment' de 'assessment factors' op een andere wijze worden toegepast als bij normstelling voor stoffen, maar het principe is gelijk.

2. ten aanzien van de factor tussen MTE en VE: bij de afleiding van het VR voor individuele stoffen uit het MTR wordt een factor 100 gebruikt. De factor 100 is gekozen omdat in het milieu vele stoffen tegelijkertijd worden aangetroffen. De factor is dan ook met name bedoeld om rekening te houden met de mogelijke effecten van combinatietoxiciteit (Stuurgroep INS, 1999). In bioassays, waarbij gewerkt wordt met monsters uit het veld, wordt dit effect reeds meegewogen en kan bij de omrekening van MTE naar VE met een factor 10 worden volstaan.

Tevens bestaat er een aantal essentiële verschillen tussen *in vivo* bioassays met waterorganismen en sedimentbewoners, die consequenties hebben voor de maatlat:

- in sediment zijn, in tegenstelling tot het (zoete) oppervlaktewater, vrijwel alleen *chronische* testen inzetbaar;
- zowel voor oppervlaktewater als sediment kan gewerkt worden met verdunningen uitgaande van het onverdunde of onbehandelde monster (het zogenaamde 'as is' monster). Een oppervlaktewater-monster kan echter in tegenstelling tot sediment geconcentreerd worden, bijvoorbeeld met een 1:1 mengsel van XAD-4 en XAD-8 (De Zwart & Sterkenburg, 2002). Het kunnen toepassen van deze techniek voor oppervlaktewater-monsters maakt het eenvoudiger om de resultaten van *in vivo* bioassays met waterorganismen te schalen op de 'gehele' maatlat EE-MTE-VE (dus inclusief het VE).

In onderstaande kaders worden de maatlaten voor oppervlaktewater en sediment beschreven.

### Maatlat voor *in vivo* bioassays voor oppervlaktewater

**Methode 1: maatlat met 'preliminary effect assessment' (Cf: factor waarmee het monster geconcentreerd wordt ten opzichte van het onbehandelde monster, het 'as is' monster; dit kan gezien worden als de 'assessment factor' toe te passen bij 3 acute of chronische testen uit verschillende taxonomische groepen)**

#### Acute testen

VE (Verwaarloosbaar Effect): in 3 acute testen effect = 0, Cf = 100  
MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect): in 3 acute testen effect = 0, Cf = 10  
EE (Ernstig Effect): in 1 acute test effect  $\geq$  EC<sub>50</sub>, Cf = 10 óf  
in 2 acute testen EC<sub>20</sub> < effect < EC<sub>50</sub>, Cf = 10

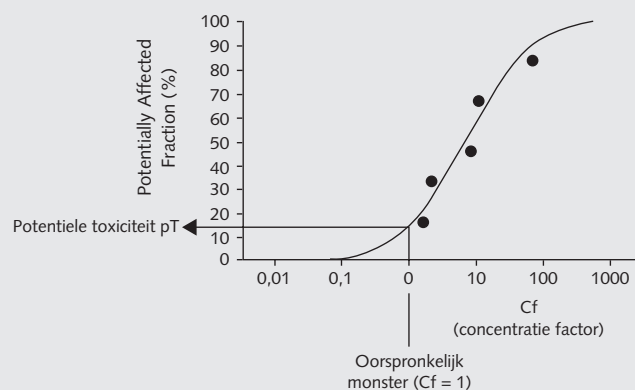
#### Chronische testen

VE (Verwaarloosbaar Effect): in 3 chronische testen effect = 0, Cf = 10  
MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect): in 3 chronische testen effect = 0, Cf = 1  
EE (Ernstig Effect): in 1 chronische test effect  $\geq$  EC<sub>50</sub>, Cf = 1 óf  
in 2 chronische testen NOEC < effect < EC<sub>50</sub>, Cf = 1

### Methode 2: maatlat met 'refined effect assessment' (PAF-benadering)

De methode werkt als volgt:

- Er dienen minimaal 4 chronische waarden van verschillende taxonomische groepen beschikbaar te zijn.
- Acute en chronische bioassays kunnen gebruikt worden.
- Resultaten van acute testen worden uitgedrukt als de factor waarmee het oorspronkelijke monster geconcentreerd moet worden voor het bereiken van 50% effect in de bioassay. Deze resultaten worden vervolgens omgerekend naar een chronische waarde door toepassing van een acuut-chronische ratio (ACR) van 10. Op dit moment is dit een algemeen geaccepteerde generieke factor (De Zwart, 2002).
- Met de chronische waarden wordt een gevoeligheidsverdeling geschat volgens een log-logistische verdeling zoals beschreven in Traas (2000; zie figuur).



- Bepaald wordt in welke mate de  $PAF_5$  (voor het MTE) en  $PAF_{50}$  (voor het EE) overschreden worden bij het ongeconcentreerde, onverdunde ofwel het 'as is' monster.
- Voor het VE wordt de Cf, behorend bij het MTE ( $PAF_5$ ), afgelezen en gedeeld door 10. Dit geeft de concentratiefactor aan waarbij het VE optreedt. Vervolgens wordt dit resultaat vergeleken met de resultaten van het onbehandelde monster om te bepalen of dit aan het MTE of het VE voldoet.

#### Maatlat voor *in vivo* bioassays voor sediment

De maatlat ziet er als volgt uit:

- Er wordt alleen een MTE- en een EE-niveau afgeleid en geen VE-niveau. Voor het VE heeft dit te maken met de praktische bezwaren die kleven aan het concentreren van sediment.
- Voor het vaststellen van het MTE dienen minimaal 3 chronische testen beschikbaar te zijn, waarvan tenminste twee 'whole-sediment' testen zijn.
- Het MTE is net als bij oppervlaktewater gelijk aan: in 3 chronische testen effect = 0. Als in tenminste 1 van 3 chronische testen een negatief effect wordt gemeten, dan is er sprake van overschrijding van het MTE.
- Het EE-niveau wordt bereikt wanneer in 1 chronische test ('as is' monster) een effect gemeten wordt  $\geq EC_{50}$ , of in 2 chronische testen een effect gemeten wordt, dat zich bevindt tussen NOEC en  $EC_{50}$ .

Het MTE op de maatlat voor zowel oppervlaktewater als sediment komt dus overeen met het niveau, waarbij in 3 *chronische* testen met verschillende taxonomische groepen van het 'as is' monster ( $Cf = 1$ ) geen effect wordt gemeten. Uitgaande van 3 *acute* testen komt het MTE overeen met het niveau, waarbij in deze testen geen effect wordt gemeten wanneer het monster geconcentreerd is met een factor 10 ( $Cf = 10$ ) ten opzichte van het 'as is' monster. Deze factor 10 volgt uit de ACR van 10 (zie kader). Het VE wordt alleen afgeleid voor oppervlaktewater; voor waterbodem is dit niet mogelijk, omdat het concentreren van sediment op praktische bezwaren stuit.

In bovenstaande presentatie van een maatlat voor *in vivo* bioassays in oppervlaktewater is geen voorkeur uitgesproken voor de inzet van acute dan wel chronische assays: voor beide trajecten is een maatlat ontwikkeld. De keuze voor chronisch of acuut zal mede ingegeven worden door de specifieke omstandigheden van de te onderzoeken locaties: het te beoordelen compartiment, kennis over de verontreinigingsgraad enzovoorts. Per type onderzoek en compartiment zal er in deze dus een keuze gemaakt moeten worden. Daarbij zullen de voordelen van acute testen vaak zwaarder wegen dan de nadelen. Zo zijn zelfs in concentraten chronische effecten soms moeilijk waar te nemen. Met acute testen is het eenvoudiger méér testen tegelijkertijd in te zetten, ze leiden sneller tot een resultaat, vragen minder watermonster en zijn goedkoper. Bovendien is door de kortere tijdsduur van de acute testen de matrix (het water) constanter van samenstelling, hetgeen een probleem blijkt bij inzet van chronische testen. In de derde workshop (Van de Plassche & Straetmans, 2002) kwam naar voren dat, indien het gaat om bijvoorbeeld een kostenafweging of méér acute assays ingezet dienen te worden of méér chronische, de voorkeur uitgaat naar de

---

eerste optie (méér acute, met andere organismen of andere taxonomische groepen). Het minimale aantal *in vivo* testen dat opgenomen dient te worden in een biologisch beoordelingsinstrument werd daarbij gesteld op 3.

#### **4.1.3 Voorstel voor maatlat en criteria voor gebruik van *in vitro* bioassays in het kader van de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater en waterbodembodem**

##### *4.1.3.1 Inleiding*

In deze paragraaf worden de contouren van een maatlat voor *in vitro* bioassays uitgewerkt. Hierbij passen allereerst de volgende opmerkingen:

- Het toepassen van *in vitro* bioassays voor het beoordelen van de kwaliteit van oppervlaktewater en waterbodems is nog relatief nieuw, zowel binnen als buiten Nederland. Dit geldt vanzelfsprekend ook voor het ontwikkelen van een maatlat en criteria voor deze beoordeling. De voorstellen zoals hier gepresenteerd zijn dan ook nog niet geheel 'uitontwikkeld'. Daarom wordt een verschil gemaakt in mogelijkheden voor de korte en lange termijn en wordt aangegeven wat nog gedaan moet worden om toepassing in de praktijk mogelijk te maken.
- In Nederland bestaat één beleidsmatige toepassing van *in vitro* bioassays: het gebruik van de DR-CALUX in het beoordelingssysteem voor de verspreiding van zoute baggerspecie, de chemie-toxiciteit-toets (CTT: zie paragraaf 1.3; Stronkhorst *et al.*, 2001). Het essentiële verschil tussen een maatlat ter beoordeling van de water(bodem)kwaliteit en een productnorm zoals de CTT, is dat de laatste gericht is op het bereiken van een status-quo ten aanzien van de verontreiniging in het product, waarbij ook economische motieven worden meegenomen, terwijl de beoordeling van de water(bodem)kwaliteit tot doel heeft de kwaliteit van het milieu vast te stellen. Dit betekent dat het criterium voor de DR-CALUX uit de chemie-toxiciteit-toets hier niet rechtstreeks gebruikt kan worden. Wel kunnen de data en overwegingen die gehanteerd zijn bij het afleiden van dit criterium gebruikt worden als referentie of startpunt.
- Net als bij de *in vivo* bioassays is het uitgangspunt om zo veel mogelijk aan te sluiten bij het gangbare Nederlandse normstellingskader en de terminologie (VR-MTR-ER). Analoog aan de maatlaten voor oppervlaktewater en sediment op grond van *in vivo* bioassays worden ook hier VE, MTE en EE gebruikt. Door het specifieke karakter van *in vitro* bioassays moeten echter misschien verschillende methodes gebruikt worden om de resultaten te plaatsen op de maatlat VE-MTE-EE.
- Hoewel de uitwerking van de maatlat in deze paragraaf vaak de DR-CALUX als voorbeeld neemt, dient opgemerkt te worden dat de hier beschreven methoden veelal toepasbaar zijn voor alle *in vitro* bioassays. Met andere woorden: de beschrijving van de methoden en benaderingen is generiek, maar de keuze voor een methode op grond van de DR-CALUX is specifiek.

##### *4.1.3.2 Benaderingen van de maatlat*

Er kan een aantal manieren gevonden worden om tot een maatlat voor *in vitro* bioassays te komen. Als eerste benadering ligt het voor de hand om uit te gaan van de detectielimiet van een *in vitro* bioassay. Hoe eenvoudig deze benadering ook is, de methode heeft een tweetal grote nadelen. Ten eerste zegt de detectielimiet van een *in vitro* bioassay niets over risico's van stoffen voor complete organismen. Ten tweede is een aantal *in vitro* bioassays zo gevoelig dat vrijwel altijd een respons wordt gevonden, zelfs op locaties die als 'schoon' worden beschouwd. Een voorbeeld hiervan is de respons van de DR-CALUX in de relatief schone Oosterschelde. De detectielimiet van een assay kan derhalve niet worden gebruikt.

---

Een andere – meer complexe – benadering voor een maatlat is om deze te baseren op gehalten in biologische weefsels. Dit is met name interessant voor *in vitro* bioassays die reageren op verbindingen die accumuleren in de voedselketen, zoals de dioxine-achtige verbindingen die gemeten worden met de DR-CALUX. In deze benadering wordt de transfer in de voedselketen (doorvergiftiging) meegewogen. Bovendien treden in het traject water-sediment – organisme – predator verschuivingen op in het relatieve gehalte en belang van dergelijke stoffen. Ook deze verschuivingen worden meegewogen. Het voordeel van deze benadering is dat zij een goede voorspellende waarde heeft voor risico's voor groepen van predatoren of organismen (de ecologische relevantie is groot). Hierop verdergaand kan ook een maatlat worden ontwikkeld door extrapolatie naar het ecosysteem, waarbij rekening wordt gehouden met de verschuiving van accumulatiepatronen binnen hogere trofische niveaus. Op basis van de *in vitro* bioassay respons in sediment kan dan een uitspraak worden gedaan over (lokale) risico's op ecosystemniveau. Een dergelijke maatlat kan na langdurig onderzoek worden vastgesteld, maar blijft beperkt tot een voedselketen in één gebied. Een voorbeeld is het onderzoek gedaan met de DR-CALUX in een otterbiotoop in Friesland (Traas *et al.*, 2001). Hoewel wellicht op dit moment de benodigde kennis voor het ontwikkelen van een maatlat volgens deze benaderingen ontbreekt, waarbij het waarschijnlijk ook niet haalbaar is een dergelijke benadering toe te passen voor alle verschillende gebieden en voedselketens in Nederland, dient deze maatlat zeker niet uitgesloten te worden. Gezien de eenvoudige extrapolatie naar ecosystemniveau is het van belang deze optie voor de toekomst open te houden.

De volgende twee benaderingen worden op de korte termijn kansrijk geacht:

1. op basis van bestaande metingen met *in vitro* bioassays Nederlands oppervlaktewater of waterbodembodem verdelen in schone en verontreinigde locaties. Dit in analogie met de CTT-waarde voor DR-CALUX voor de verspreiding van zoute baggerspecie (Stronkhorst *et al.*, 2001). Deze waarde is afgeleid op grond van buitenlandse criteria voor PCB's en dioxines en waargenomen effecten in referentiesedimenten uit het Nederlandse kustwater (zie kader).
2. *in vitro* bioassays kunnen in feite beschouwd worden als blootstellingsassays: een respons in een *in vitro* bioassay betekent dat er op een bepaald niveau (dit kan hoog zijn maar ook zeer laag, afhankelijk van de detectielimiet), blootstelling aan stoffen plaatsvindt die het assay triggert. Met deze achtergrond is aansluiting bij de stofbenadering, zoals bijvoorbeeld gehanteerd binnen Integrale Normstelling Stoffen (INS), voor de hand liggend.

De CTT-waarde voor de DR-CALUX is 50 ng TEQ/kg ds. Deze toetswaarde is gebaseerd op metingen met dit *in vitro* bioassay in referentiesedimenten. Dit zijn niet-vervuilde bodems uit het zoute watersysteem. Ongeveer 20 referentiegebieden in de Wadden, de Delta en de Noordzeekust zijn onderzocht. Op basis van deze resultaten en een vergelijking met bestaande (inter)nationale ecotoxicologische sediment-kwaliteitscriteria voor PCB's en dioxines is de CTT-waarde vastgesteld.

Voor de eerste benadering kan op de maatlat van 'van schoon naar verontreinigd' het VE dan gesteld worden op die grens, die gemiddeld of maximaal in de als 'schoon' veronderstelde locaties wordt gevonden. De 'schone' locatie moet daarbij wel voldoende afwijkend zijn van de verontreinigde

---

locaties. Het onderscheid tussen schoon en verontreinigd kan ook worden gemaakt op basis van chemisch-analytische resultaten van de stoffen die een respons geven in een *in vitro* bioassay. Ook zou daarin meegewogen kunnen worden, dat op de 'schone' locaties geen effect in de bioassay of op ecosysteemniveau is te zien, dat gerelateerd kan worden aan blootstelling aan stoffen waarvoor het assay screent. Dit is natuurlijk een zeer pragmatische benadering en alleen uitvoerbaar indien een aanzienlijke dataset van meetgegevens aanwezig is, bij voorkeur gematched met chemisch-analytische gegevens.

De maatlat die met deze methode wordt vastgesteld, heeft weinig relaties met de bestaande stofgerichte beoordeling, noch met risicobeoordeling. Evenmin wordt rekening gehouden met doorvergiftiging en aanverwante processen.

De tweede benadering werkt als volgt: op basis van de ecotoxicologische MTR- en VR-waarden kan worden omgerekend naar een ecotoxicologische TEQ-MTE via een link naar stoffen. Voor de gehele beoordelingssystematiek kan dan verder aangesloten worden bij de reeds bestaande stofgerichte beoordeling. De voordelen van deze methode is dat deze transparant is en naadloos aansluit bij het normstellingskader VR-MTR-ER, waarbij de voordelen van de effectgerichte testen natuurlijk wel een duidelijke meerwaarde hebben in vergelijking met de stofgerichte benadering. De methode heeft ook een aantal nadelen. Zo is de benadering afhankelijk van de aan- of afwezigheid van een MTR voor de – belangrijkste – stof(groepen) die een respons in het betreffende *in vitro* bioassay geven. Dit speelt bijvoorbeeld bij hormoonontregelende stoffen, waarvoor een MTR ontbreekt. Ook is het zo dat MTR-waarden vaak gebaseerd zijn op ecotoxicologische gegevens uit acute testen. Met deze testen worden specifieke werkingsmechanismen, die pas na langdurige blootstelling nadelige effecten veroorzaken op bijvoorbeeld de voortplanting, niet meegewogen al wordt dit wel in enige mate verdisconteerd in de extrapolatiefactor. Het is dus van belang om de achtergrond van de ecotoxicologische MTR kritisch te beoordelen bij het vaststellen van de maatlat. Voor de DR-CALUX wordt het een en ander geïllustreerd in onderstaand kader.

#### **Een maatlat voor de DR-CALUX met behulp van het MTR voor PCB's**

Voor PCB's is de streefwaarde in sediment voor de som van 7 PCB's 20 mg/kg ds. Dit betreft de PCB's 28, 52, 101, 118, 138, 153 en 180. De streefwaarde voor elk van de afzonderlijke PCB's is 1 mg/kg ds voor PCB 28 en 52 en voor de overige PCB's 4 mg/kg ds. Het MTR voor elk van deze PCB's afzonderlijk is 4 mg/kg ds. Met behulp van een DR-CALUX specifieke Toxic Equivalent Factor (TEF) – dit is de potentie van een bepaalde PCB om een repons in de DR-CALUX te veroorzaken ten opzichte van 2,3,7,8-TCDD – kunnen de streefwaarde en MTR voor PCB's omgerekend worden naar een maatlat voor sediment voor de DR-CALUX. Alleen voor PCB 118 is een DR-CALUX specifieke TEF beschikbaar van 0,005 (Stronkhorst *et al.*, in prep.). Het MTE voor de DR-CALUX is dan  $0,005 \times 4 \text{ mg TEQ/kg ds} = 20 \text{ ng TEQ/kg ds}$ . De streefwaarde kan dan conservatief gelijk gesteld worden aan  $0,005 \times 1 \text{ TEQ/kg ds} = 5 \text{ ng TEQ/kg ds}$ .

Het nadeel van het MTR voor de som van deze PCB's is dat zij – met uitzondering van PCB118 – geen van alle erg specifiek zijn in hun dioxine-achtige werking. De hierboven afgeleide maatlat voor de DR-CALUX



---

– een *in vitro* bioassay dat specifiek meet op een dioxineachtige werking – is dan ook niet bruikbaar. Recentelijk zijn daarom door het RIVM nieuwe ecotoxicologische MTR's afgeleid voor 8 PCB's die wel een duidelijke dioxineachtige werking hebben: de zogenaamde 'platte' PCB's 77, 105, 118, 126, 153, 156, 157 en 169 (Van Wezel *et al.*, 1999). Op dit moment wordt de afleidingssystematiek van het RIVM beoordeeld door een commissie van de Gezondheidsraad.

Opgemerkt moet worden dat een deel van de gemeten activiteit in een DR-CALUX veroorzaakt wordt door onbekende stoffen.

#### 4.1.3.3 Conclusie

De doelstelling is een maatlat te ontwikkelen voor *in vitro* bioassays, met als matrix water en waterbodem. In dat licht lijkt een combinatie van de laatste twee benaderingen het meest realistisch. Deze combinatie kan eruit bestaan, dat de met benadering 2 afgeleide TEQ-MTE en TEQ-VE waarden getoetst worden aan responsen in het assay, die gewoonlijk op 'schone' en verontreinigde locaties worden gevonden. Op korte termijn is dit echter niet mogelijk omdat bruikbare MTR- en VR-waarden ontbreken. Gewacht dient te worden op de uitkomst van, en de discussie over het advies van de Gezondheidsraad over het RIVM-rapport (zie kader). Daarom wordt voor de korte termijn benadering 1 aanbevolen. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van RIKZ-onderzoek waarbij in 1999 en 2000 voor 50 sedimenten uit havens langs de Nederlandse kust de DR-CALUX is toegepast, en van metingen uit het LOES-programma (Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen; Stronkhorst *et al.*, 2001; Vethaak *et al.*, 2002). In LOES zijn de DR- en ER-CALUX *in vitro* bioassays toegepast op verschillende locaties en matrices in Nederland. Voor de maatlat op basis van de DR-CALUX kan gebruik gemaakt worden van de metingen in zoet, estuarien en zout sediment en gesuspenseerd materiaal.

Opgemerkt wordt dat een deel van het LOES-onderzoek tevens opgevat kan worden als een onderzoek naar de ecologische relevantie van *in vitro* bioassays. Zo zijn de uitkomsten van de ER-CALUX in de gal van brasem en bot met succes gecorreleerd aan enerzijds gehalten xeno-oestrogene stoffen en anderzijds oestrogene effecten in deze vissen. Bovendien bleken de uitkomsten van de ER-CALUX een goede voorspellende waarde te hebben voor effecten op reproductie *in vivo* bioassays met zebravissen.

## 4.2 Huidige stand van zaken rondom een maatlat voor bioassays voor landbodem, waterbodem in situ (saneringstraject), baggerspecie en effluent

In deze paragraaf wordt voor de milieucompartimenten landbodem en waterbodem in situ en voor de productgebieden baggerspecie en effluent de stand van zaken rondom ontwikkeling van een normstelsel voor bioassays nagegaan. Waar mogelijk worden de uitkomsten vergeleken met de hierboven gepresenteerde maatlatten.

### 4.2.1 Landbodem

Voor de landbodem bestaat nog geen beoordelingskader waarbij bioassays ingezet worden, al is dit wel in ontwikkeling (De Zwart *et al.*, 1999). Een vergelijking met de maatlatten uit de vorige paragrafen kan dan ook niet gemaakt worden. De methodiek die voorgesteld wordt is vergelijkbaar met die voor waterbodems (zie § 4.2.2).

#### 4.2.2 Nader Onderzoek waterbodems

Recentelijk is de Richtlijn nader onderzoek voor waterbodems verschenen (Van Elswijk & Hin, 2002). Bij de bepaling van de urgentie wordt voor de beoordeling van het actuele risico voor het ecosysteem de TRIADE-benadering gekozen als instrument. Deze benadering is door het RIZA ontwikkeld (Den Besten *et al.*, 1995; van de Guchte, 1991). Zij bestaat uit chemische analyses, bioassays en veldwaarnemingen. Bioassays vormen hierin de schakel tussen de andere twee type metingen zodat oorzaak-gevolg relaties gelegd kunnen worden.

In de richtlijn worden in een stapsgewijze risicobeoordeling twee onderzoeksporen onderscheiden: i) directe effecten in het veld en ii) risico van doorvergiftiging. Voor de bepaling van de directe effecten worden *in vivo* bioassays ingezet: chronische test watervlo (poriewater), chronische test muggenlarve ('whole-sediment') en optioneel Microtox (poriewater). In bijlage 7.2 van de Richtlijn wordt vervolgens een zogenaamde 'effect-classificatie' voor de watervlo en muggenlarve test gepresenteerd, waarbij verwezen wordt naar de TRIADE. Hierin wordt een onderscheid gemaakt in geen, matig en ernstig effect. De classificatie is weergegeven in tabel 4.2.

**Tabel 4.2**  
Effect-classificatie volgens de TRIADE-benadering uit de richtlijn nader onderzoek voor waterbodems (Van Elswijk & Hin, 2002)

| Bioassay    | Matrix     | Eindpunten en testcriterium | Mate van effect       |                         |                   |
|-------------|------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|
|             |            |                             | Geen                  | matig                   | ernstig           |
| Watervlo    | poriewater | NOEC sterfte of reproductie | 100 vol% <sup>a</sup> | >10% - <100 vol%        | ≤10 vol%          |
| Muggenlarve | sediment   | sterfte of groei-vertraging | ≤10%                  | >10% - 50% <sup>b</sup> | ≥50% <sup>b</sup> |

a: vol%: volumepercentage van het poriewater t.o.v. het testmedium (100%: onverdund poriewater)

b: als aanvullend criterium geldt dat het effect tevens statistisch significant dient te zijn (P > 0,05)

De classificatie 'geen effect' dient in ieder geval niet strijdig te zijn met het MTE. Uit de vergelijking van tabel 4.2 met de maatlat voor sediment uit § 4.1.2 kan geconcludeerd worden dat de twee niet strijdig zijn. Het EE sluit echter niet helemaal aan bij de effect-classificatie uit tabel 4.2. Oorzaak hiervoor is dat bij de TRIADE een onderscheid wordt gemaakt in *matig* en *ernstig* effect, wat niet aansluit op het EE-concept, en bovendien de TRIADE-classificatie gebaseerd is op *twee* in plaats van *drie* bioassays.

#### 4.2.3 Baggerspecie

- Zoete baggerspecie

##### LIFE-sediment

In het project LIFE-sediment bereiden België, Frankrijk en Nederland een ecotoxicologisch beoordelingssysteem voor de verspreiding van zoete baggerspecie. Ontwikkelingen tot nu toe liggen vooral op het vlak van de selectie van bruikbare testen, het harmoniseren van testprotocollen en randvoorwaarden en de interpretatie van de testresultaten. Bij de ontwikkeling van de hierboven beschreven maatlat voor bioassays zijn de criteria voor bruikbare testen uit het LIFE-project meegenomen.

- Zoute baggerspecie

##### Chemie-toxiciteit-toets (CTT)

Met het overheidsbeleid als uitgangspunt (NW4, 1998) ontwikkelde de Werkgroep Bagger een nieuw beoordelingssysteem voor de kwaliteit van zoute baggerspecie (havenslib), alvorens deze verspreid kan worden in

---

zee. Deze nieuwe systematiek, CTT (Stronkhorst *et al.*, 2001), moet de huidige 'Uniforme Gehalte Toets' (UGT) gaan vervangen. Met de UGT konden circa 32 stoffen worden beoordeeld: PCB's, PAK's, OCP's en metalen. Met de CTT blijven de meeste toetsingsparameters met de bijbehorende getalswaarden relevant. Uitzondering vormen lindaan, endrin, aldrin en dieldrin: deze stoffen worden niet meer opgenomen, omdat ze alleen bij hoge uitzondering worden aangetroffen. Voor PAK's en PCB's wordt een somparameter voorgesteld. Nieuw in de CTT zijn de aanvullende parameters TBT (zie § 3.1.3) en een drietal biologische parameters: slijkgarnaal bioassay, Microtox *Solid Phase* en de DR-CALUX. Juist deze aanvulling maakt het mogelijk om de milieubezwaarlijkheid van het verspreiden van baggerspecie beter in te schatten dan op basis van de UGT mogelijk is. Het inzetten van bioassays kan hier dus weer uitkomst bieden.

Beoordeling van de resultaten uit de bioassays vindt plaats door vergelijk met een toetsingswaarde. Deze is per bioassay gedefinieerd, afhankelijk van het soort effect dat met de betreffende bioassay verkregen wordt: slijkgarnaal: 35% sterfte (zie kader), Microtox SP: 100 TU (Toxic Units: uitgedrukt als de reciproke van de sedimentconcentratie op droge stof basis waarbij de bioluminescentie van de bacteriën met 50% is afgenomen, gecorrigeerd voor de invloed van fijne slibdeeltjes ofwel  $1/EC_{50,corr}$ ) en DR-CALUX: 50 ng TEQ/kg ds (zie § 4.1.3.2). De toetsingswaarde is gebaseerd op enerzijds gepubliceerde en toegepaste criteria in het buitenland, anderzijds op waargenomen effecten in referentiesedimenten in het Nederlandse kustwater. De verschillende parameters in de CTT worden individueel beschouwd: overschrijding van de toetsingswaarde in één bioassay (of van één andere chemische parameter) leidt tot een verbod op het verspreiden van de baggerspecie in zee. Er vindt geen groepering van resultaten plaats tot één eindoordeel over de ecotoxicologische toestand van de baggerspecie.

**Voorbeeld: de toetsingswaarde voor de slijkgarnaalttest in de CTT**

In Stronkhorst *et al.* (2001) wordt de keuze voor de toetsingswaarde van de slijkgarnaalttest uit de CTT toegelicht. Uit literatuur kwam (onder andere) een percentage sterfte van 20 - 25 naar voren als toxiciteitscriterium om niet-toxische sedimenten te kunnen onderscheiden van toxische. Bij de beoordeling van baggerspecie in de USA is de overleving van amphipoden (waartoe ook de slijkgarnaal behoort) één van de belangrijkste toetsingsparameters. Als 'pass or fail' criterium wordt een verhoging van het sterftepercentage met 20% ten opzichte van schoon referentiesediment gehanteerd. In Engeland wordt een criterium van 40% aangehouden.

Het blijkt niet eenvoudig een 'schoon referentiesediment' te kiezen. Vereist is dat het materiaal niet gecontamineerd is en qua fysisch-chemische samenstelling (korrelgrootte e.d.) vergelijkbaar is met het te testen havensediment. Havensedimenten zijn vaak slibrijk, zodat slibrijk referentiesediment nodig is. De respons in de slijkgarnaalttest met referentiesedimenten uit het Nederlandse kustwater ligt tussen 3 en 30% mortaliteit. De hoge sterftepercentages zijn gevonden in slibrijke maar vervuilde sedimenten in de monding van de Haringvliet. Op grond van bovenstaande is de toetsingswaarde voor de slijkgarnaalttest in de CTT gesteld op 35% sterfte.

---

Een vergelijking van de CTT met de maatlatten gepresenteerd in § 4.1.2 voor sediment op grond van *in vivo* bioassays en § 4.1.3 op grond van *in vitro* bioassays is niet zinvol omdat bij het opstellen van de CTT ook economische motieven een rol hebben gespeeld. Invoering van de CTT mocht namelijk niet leiden tot een trendbreuk in de hoeveelheid te bergen zoute baggerspecie.

#### 4.2.4 Totaal-effluentbeoordeling

Voor de effectgerichte beoordeling van effluënten wordt de Totaal-effluentbeoordeling (TEB) ontwikkeld (Tonkes *et al.*, 2000; Tonkes *et al.*, 1998; STOWA, 2001; FWVO, 2000). Effluënten zijn – evenals water(bodem) monsters – veelal complexe mengsels van stoffen. Beoordeling op basis van individuele stoffen heeft daarom ook in effluënten enkele nadelen. Niet alle stoffen zijn bekend en van de wél bekende stoffen is niet altijd de milieubezwaarlijkheid vastgesteld of zijn normen afgeleid.

In de huidige stofgerichte aanpak wordt de milieubezwaarlijkheid van effluënten beoordeeld op drie parameters: persistentie, bioaccumulatie en toxiciteit (PBT). Doel is om te voorkomen dat toxische, bioaccumulerende of persistente stoffen in het oppervlaktewater geloosd worden. Dezelfde parameters worden ook in de effectgerichte beoordeling met TEB gebruikt. Voor toxiciteit worden drie soorten onderscheiden, zodat de beoordeling plaatsvindt met vijf parameters:

- acute toxiciteit;
- chronische toxiciteit;
- genotoxiciteit;
- bioaccumulatie;
- persistentie.

De ontwikkeling van TEB is begonnen in 1994 en moet gereed zijn voor implementatie in de praktijk in het jaar 2006. In het programma wordt gewerkt aan het ontwikkelen van:

- testen voor het meten van effecten (5 parameters);
- maatlat voor beoordelen resultaten;
- methodieken voor het identificeren van de oorzaken van de effecten.

Het programma kent drie fasen: onderzoek, praktijkonderzoek en beleidsinbedding. DG Water zorgt voor de financiering van het onderzoek en de beleidsinbedding (via CIW), terwijl het praktijkonderzoek betaald wordt door de regionale directies van RWS. De coördinatie van het geheel is in handen van RIZA.

Momenteel (begin 2003) is de onderzoeksfase zo goed als gereed. Er zijn testen ontwikkeld voor het meten van effecten en voor het identificeren van de oorzaken daarvan. Voor alle parameters (met uitzondering van persistentie) is praktijkonderzoek uitgevoerd (zie ook kader). In de komende jaren zal gewerkt worden aan validatie van de testen, aanvullende praktijkonderzoeken en het ontwikkelen van een maatlat. De maatlat zal in CIW kader worden gebruikt voor het afleiden van een beleidsmatig toetsingskader.

---

**TEB: Acut toxiciteitsonderzoek aan effluenten door regionale waterkwaliteitsbeheerders**

Bij acut toxiciteitsonderzoek aan effluenten uit onder andere industriële lozingen, landbouw en rwzi's bleken van de 139 toxiciteitstesten er 68 in meer of mindere mate acute toxiciteit te vertonen. De acute testen (*in vivo* bioassays) werden uitgevoerd met organismen uit 4 taxonomische groepen: een bacterie-test, een test met een kreeftachtige, een algentest en een test met vissen. Over het algemeen werd er bij de industriële lozingen meer toxiciteit gemeten dan bij de rwzi's. Bij een groot aantal industriële lozingen werd een hoge mate van toxiciteit geconstateerd. De meeste industriële lozingen bleken echter indirecte lozingen te zijn: lozing op het oppervlaktewater vindt plaats via een rwzi. Van de lozingen uit de landbouwsector bleken de meeste direct te worden geloosd op oppervlaktewater. Bij een aantal van deze lozingen werd een sterke toxiciteit geconstateerd. Bij de effluenten van de onderzochte rwzi's werd over het algemeen de minste toxiciteit gemeten. Voor alle lozingen werd naast het toxiciteitsonderzoek een standaard pakket 'klassieke chemie' geanalyseerd, aangevuld met een aantal specifieke analyses op basis van de in de lozing te verwachten stoffen. Uit de resultaten van het vergelijkend onderzoek is gebleken dat de in de testen aangetoonde toxiciteit in de meeste gevallen slechts in zeer beperkte mate te verklaren viel aan de hand van de in de lozing aanwezige bekende stoffen. Enerzijds is niet bekend wat de exacte samenstelling van het complexe effluent is, anderzijds ontbreken vaak toxiciteitsgegevens van de stoffen die wel gemeten zijn. Hierdoor zal in toxiciteitstesten vaak meer toxiciteit worden gemeten dan op grond van concentraties van bekende stoffen wordt verwacht.

STOWA/RIZA, 2001.

De maatlat voor effluenten zal worden afgestemd met die voor oppervlaktewater en waterbodem (§ 4.1.2 en § 4.1.3). Voor acute en chronische toxiciteit kan bijvoorbeeld een relatie gelegd worden tussen de waterkwaliteitsdoelstellingen of de actuele waterkwaliteit. Wellicht dat hierbij gebruik gemaakt kan worden van de methodiek van de emissie-immissietoets, waarbij als criterium geldt dat de lozing maximaal 10% van het MTR mag bedragen (CIW, 2001).

Voor genotoxiciteit en bioaccumulatie bestaan minder raakvlakken met de effectgerichte beoordeling van water(bodems). Voor genotoxiciteit kan gedacht worden aan een grens voor de inductiewaarde, terwijl voor bioaccumulatie ofwel referentiewateren, ofwel het 'geen effect-niveau' gebruikt kan worden.

---

---

## 5 Toepassing in de praktijk

---

*In dit hoofdstuk staat de toepassing van de in hoofdstuk 4 afgeleide maatlat voor bioassays centraal. Toepassing van de maatlat voor in vivo bioassays in de Nederlandse praktijk wordt voor oppervlaktewater (§ 5.1.1) en waterbodembodem (§ 5.1.2) geïllustreerd aan de hand van twee bekende datasets. Dit hoofdstuk wordt besloten met een beschrijving van internationale ontwikkelingen in diverse kaders (§ 5.2), die in de toekomst mogelijk hun stempel zullen gaan drukken op nationale ontwikkelingen voor wat betreft de implementatie van een biologisch beoordelingsinstrumentarium.*

### 5.1 Toetsing van de maatlat in de praktijk van het waterbeheer in Nederland

De maatlaten die in het voorgaande hoofdstuk voor *in vivo* bioassays zijn afgeleid, worden in de volgende paragrafen toegepast op een tweetal bestaande datasets: één RIVM/RWS-set voor oppervlaktewater en één RIZA-dataset voor zoet sediment. De resultaten uit de chemische en de biologische beoordeling zullen ter vergelijking naast elkaar worden gezet.

#### 5.1.1 Toetsing van de maatlat bij toepassing van *in vivo* bioassays in oppervlaktewater

Hoe de maatlat voor oppervlaktewater kan werken in de praktijk, kan geïllustreerd worden aan de hand van RIVM- en RWS-onderzoek naar de toxiciteit van oppervlaktewater in rijkswateren in Nederland op 15 plaatsen in 1996 (De Zwart & Sterkenburg, 2002). Acute toxiciteitstesten zijn uitgevoerd met 5 *in vivo* bioassays: Microtox assay, Algen fotosynthese test met *Selenastrum capricornutum*, Rotox test, Thamnotox test en Daphnia IQ test. Na extrapolatie van acute EC<sub>50</sub>-waarden naar chronische NOEC-waarden met een factor 10 is een PAF<sub>chemie</sub> curve gefit op dezelfde wijze als in hoofdstuk 3 voor de *in vivo* maatlat beschreven wordt. Hoewel De Zwart & Sterkenburg (2002) de toxiciteit van het originele watermonster schatten met de pT-methode (pT: toxic potency ofwel de PAF van het onverdunde watermonster), kan uit de presentatie van hun resultaten ook afgeleid worden of het MTE of VE overschreden wordt. Resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel. Naast de pT (range van 6 metingen over 1996), MTE- en VE-overschrijding is ook de PAF<sub>chemie</sub> aangegeven. Dit is de PAF op basis van chemische metingen op de verschillende lokaties. De PAF<sub>chemie</sub> wordt berekend door omrekening naar Toxic Units (TU). De methode wordt hier niet verder uitgewerkt, maar is beschreven in Traas *et al.* (2002). Het aantal stoffen dat gemeten wordt verschilt aanzienlijk per lokatie.

Het MTE wordt 5 maal overschreden. Het VE wordt op alle locaties overschreden met uitzondering van 3 metingen in Wolderwijd en Markermeer. Interessant in het kader van dit rapport is de vergelijking tussen de pT waarden en de PAF<sub>chemie</sub>. Dit zegt namelijk iets over de relatie tussen chemische en biologische monitoring, al moet opgemerkt worden dat de correlatiecoëfficiënt tussen de pT en de PAF<sub>chemie</sub> slechts 0,17 is (De Zwart & Sterkenburg, 2002). Duidelijk is dat in een groot aantal gevallen de PAF hoger is op basis van chemie dan op basis van de acute *in vivo* bioassays. Met andere woorden: op basis van chemische metingen zal eerder geconcludeerd worden dat de waterkwaliteitsdoelstelling (MTR of VR) overschreden wordt.

Het omgekeerde is echter ook het geval bijvoorbeeld bij Puttershoek en Belfeld. Verklaringen voor beide verschijnselen kunnen gezocht worden in:

- de uitvoering en het type *in vivo* bioassay: het zijn acute assays waarbij geconcentreerd wordt. De concentratie procedure is selectief voor bepaalde stoffen, waardoor verlies van toxiciteit kan optreden. In de concentratiestap gaan bijvoorbeeld metalen verloren. Daardoor kan de PAF<sub>chemie</sub> hoger uitvallen dan de pT-waarde;
- 'onbekende' niet chemisch gemeten stoffen kunnen zorgen voor een hogere pT-waarde dan berekend op basis van de gemeten stoffen.

**Tabel 5.1**

Illustratie van de maatlat voor oppervlaktewater aan de hand van metingen in oppervlaktewater in Nederland in 1996 (De Zwart & Sterkenburg, 2002)

| Locatie                 | pT in % range van 6 metingen | Overschrijding |            | PAF <sub>chemie</sub> in % | Aantal stoffen in metingen |
|-------------------------|------------------------------|----------------|------------|----------------------------|----------------------------|
|                         |                              | MTE            | VE         |                            |                            |
| Nieuwe Waterweg         | 0,04 - 0,54                  | nee            | ja         | 14,55                      | 74                         |
| Rijn - Lobith           | 0,00 - 0,22                  | nee            | ja         | 13,49                      | 74                         |
| Maas - Eijsden          | 0,02 - 7,46                  | 1 maal ja      | ja         | 10,83                      | 74                         |
| Schelde - Schaar v O.D  | 1,33 - 10,06                 | 2 maal ja      | ja         | 7,02                       | 74                         |
| Haringvliet (sluis)     | 0,02 - 6,10                  | 1 maal ja      | ja         | 5,75                       | 39                         |
| Noordzeekanaal (A'dam)  | 0,00 - 2,04                  | nee            | ja         | 4,87                       | 37                         |
| Volkerakmeer            | 0,02 - 1,92                  | nee            | ja         | 3,64                       | 37                         |
| Lek - Nieuwegein        | 0,01 - 4,54                  | nee            | ja         | 2,34                       | 22                         |
| Oude Maas - Puttershoek | 0,00 - 8,60                  | 1 maal ja      | ja         | 0,77                       | 17                         |
| IJsselmeer - Vrouwenznd | 0,00 - 1,95                  | nee            | ja         | 0,14                       | 17                         |
| Maas - Belfeld          | 0,10 - 4,77                  | nee            | ja         | 0,00                       | 15                         |
| Ketelmeer - west        | 0,05 - 0,40                  | nee            | ja         | 0,00                       | 15                         |
| Markermeer - midden     | 0,00 - 0,26                  | nee            | 2 maal nee | 0,00                       | 15                         |
| Wolderwijd              | 0,00 - 0,65                  | nee            | 1 maal nee | 0,00                       | 15                         |
| Maas - Keizersveer      | 0,00 - 2,72                  | nee            | ja         | 0,22                       | 3                          |

### 5.1.2 Toetsing van de maatlat bij toepassing van *in vivo* bioassays in sediment

Voor zoete sedimenten is eveneens een pilot uitgevoerd. Het RIZA heeft in 1998 onderzoek laten verrichten aan sedimenten van 20 locaties met een chemische verontreinigingsgraad in de klasse van 0 tot 4. Acute toxiciteits-testen zijn uitgevoerd met 4 *in vivo* bioassays, waarvan 3 in poriewater: Microtox assay, Thamnotoxtest en Rototoxtest, en 1 in sediment: Microtox Solid-Phase test. Daarnaast zijn 2 chronische toxiciteitstesten uitgevoerd met *in vivo* bioassays: *Daphnia magna* reproductietest in poriewater en *Chironomus riparius* in sediment. Het onderzoek is beschreven door Lahr *et al.* (2003). Deze set testen, die is uitgevoerd, voldoet nog niet aan de criteria, zoals deze voor de *in vivo* maatlat in hoofdstuk 4 beschreven zijn. Intussen zijn meer testen met sedimentbewonende organismen beschikbaar, maar er is nog geen praktijkstudie met een volledige set van deze *in vivo* bioassays uitgevoerd. Om de toepassing van bovengenoemd onderzoek te kunnen toetsen aan de voorgestelde maatlat zijn de acute testresultaten met poriewater meegenomen in de eindbeoordeling. Elke test (acuut of chronisch) die een positieve uitslag (effect) geeft betekent een overschrijding van het MTE. Het bepalen van een overschrijding van het VE is niet mogelijk. Wel is gekeken of ook het EE op basis van chronische toxiciteit overschreden wordt. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel. In de tabel is aangegeven of de effecten door de acute en/of de chronische testen werden veroorzaakt. Naast de overschrijdingen van het MTE voor *in vivo* bioassays is ook de overschrijding van het MTR, de interventiewaarde (IW) en de streefwaarde (VR) voor de chemie aangegeven. Tenslotte staat in de laatste kolom welke stof(fen) voor deze overschrijding verantwoordelijk is (zijn).



Tabel 5.2

Illustratie van de maatlat voor sediment aan de hand van metingen in sediment in Nederland in 1998 (Lahr *et al.*, 2003)

| Locatie                 | Overschrijding bioassays |     | Type bioassays <i>in vivo</i> |        | Chem. klasse | Overschrijding |     |     | Voor de stof                            |
|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------|--------|--------------|----------------|-----|-----|---|
|                         | MTE                      | EE  | ac.                           | chron. |              | MTR            | VR  | IW  |   |
| Vossemeer               | nee                      |     |                               |        | 0            | nee            | nee |     |   |
| Markermeer              | nee                      |     |                               |        | 0            | nee            | nee |     |   |
| Wolderwijd              | ja                       | nee | 2                             |        | 0            | nee            | nee |     |   |
| Eemmeer                 | ja                       | ja  | 1                             | 2      | 0            | nee            | nee |     |   |
| Twenthekanaal           | ja                       | nee | 1                             |        | 2            | ja             |     | nee | PCB's                                   |
| Volkerakmeer            | nee                      |     |                               |        | 2            | ja             |     | nee | PCB's                                   |
| Haringvliet             | nee                      |     |                               |        | 2            | ja             |     | nee | PCB's, HCB                              |
| Helmond RWZI            | ja                       | nee | 1                             |        | 3            | ja             |     | nee | min olie, PCB's                         |
| Ketelmeer               | nee                      |     |                               |        | 3            | ja             |     | nee | PCB's, HCB                              |
| Hollands Diep           | ja                       | ja  | 2                             | 1      | 3            | ja             |     | nee | Cu, PCB's, HCB                          |
| Oude Maas - Puttershoek | ja                       | nee | 1                             | 2      | 3            | ja             |     | nee | Cu, min olie, PCB's, HCB                |
| Waal - Gameren 2        | nee                      |     |                               |        | 3            | ja             |     | nee | PCB's, HCB                              |
| Dommel - Neerpelt       | nee                      |     |                               |        | 4            | ja             |     | ja  | Cd                                      |
| Waal - Gameren 1        | ja                       | nee |                               | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Cu, Zn, PCB's, HCB                      |
| Dommel RWZI             | ja                       | nee | 2                             |        | 4            | ja             |     | ja  | Cd, Cu, Ni, Zn, PCB's                   |
| Brabantse Biesbosch     | ja                       | nee | 1                             | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Cu, Zn, min olie, PCB's, HCB            |
| Amer - centrale         | ja                       | ja  | 2                             | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Cu, Ni, Zn, min olie, PCB's, HCB        |
| Amer                    | ja                       | ja  |                               | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Zn, min olie, PCB's, HCB                |
| Rijn - Lobith haven     | ja                       | ja  |                               | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Cu, Ni, Zn, min olie, PCB's, PAK's, HCB |
| Maas Borgharen stuw     | ja                       | ja  | 1                             | 1      | 4            | ja             |     | ja  | Cu, Zn, min olie, PCB's, som DDT        |

Het MTE wordt op verschillende locaties overschreden. Niet alleen de sedimenten met klasse 3 en 4 geven effecten te zien, ook op de 'schone' locaties treden effecten op. De gemeten concentraties aan stoffen konden deze effecten niet volledig verklaren. Aan de andere kant traden in klasse 3 sedimenten geen effecten op, terwijl dit op basis van de concentraties van enkele stoffen wel werd verwacht. Verklaringen voor beide verschijnselen kunnen gezocht worden in:

- de aanwezigheid van 'onbekende' stoffen, die leiden tot hogere effecten dan op grond van de chemische parameters werd verwacht (bijvoorbeeld het Eemmeer);
- de beschikbaarheid van de gemeten stoffen; blijktbaar zijn de stoffen beter gebonden en minder vrij beschikbaar dan de totaalgehalten doen vermoeden (zie Dommel - Neerpelt en RWZI);
- de uitvoering van het type *in vivo* bioassays; de organismen die gebruikt worden dekken niet voldoende de werkingsmechanismen af van de gemeten stoffen (bijvoorbeeld in het Ketelmeer, Volkerak, Haringvliet en de Waal bij Gameren (2)).

Vaak wordt de vraag gesteld of biologische monitoring de plaats kan innemen van chemische monitoring. Op grond van bovenstaande illustratie lijkt dit niet op voorhand positief beantwoord te kunnen worden, maar dient dit per stof beoordeeld te worden. Gemeten stoffen die niet of nauwelijks bijdragen aan een PAF<sub>chemie</sub> bevestigd in de biologische meting, zouden bijvoorbeeld uit het analysepakket verwijderd kunnen worden. Daarbij moet bedacht worden dat stofgericht beleid niet gevoerd kan worden op grond van biologische effectmetingen. De TIE-methode (Toxiciteit, Identificatie en Evaluatie), bekend uit het effluentenonderzoek, kan hier wellicht uitkomst gaan bieden. Indien 'onbekende' stoffen bijdragen aan een overschrijding van het MTE of VE kan TIE ingezet worden om deze stoffen te karakteriseren. Hierbij worden veelal fractioneringstechnieken toegepast, gevolgd door

---

chemische identificatie. De ervaring tot nu toe leert dat het nog niet goed mogelijk is om op basis van deze technieken de gevonden toxiciteit in een monster volledig te kunnen verklaren.

## 5.2 Afstemming met de toepassing van bioassays in internationale kaders

De discussie over de ontwikkeling van een maatlat voor bioassays, zoals beschreven in hoofdstuk 4, speelt – nog – niet in de diverse internationale kaders. Wel wordt inmiddels veel aandacht besteed aan de toepassing van bioassays in diverse kaders en milieucompartimenten. Ter illustratie wordt hieronder gekeken naar de mogelijkheden om bioassays in de kwaliteitsbeoordeling van oppervlaktewater in te zetten in het kader van de EU Kaderrichtlijn Water en de kwaliteitsbeoordeling van zoute baggerspecie binnen de kaders van LC, PIANC en OSPARCOM.

Sinds oktober 2000 is de EU Kaderrichtlijn Water van kracht (Richtlijn 2000/60/EC). In deze richtlijn wordt het begrip ecologische kwaliteit geïntroduceerd waarbij gestreefd wordt naar een zo hoog mogelijke kwaliteit voor de Europese wateren. Onderscheid wordt gemaakt in vijf klassen: zeer goede, goede, matige, slechte en zeer slechte kwaliteit. Voor de verschillende typen wateren (die meer of minder door de mens zijn beïnvloed: rivieren, meren, overgangswateren, kustwateren en sterk veranderde of kunstmatige wateren) wordt dit nader uitgewerkt aan de hand van een aantal biologische kwaliteitselementen. Voor rivieren zijn dit bijvoorbeeld fytoplankton, macrofyten en fytobentos, benthische invertebraten-fauna en vis-fauna. Eén van de belangrijke onderscheidende criteria is het verschil tussen de actuele taxonomische samenstelling van het betreffende water en die onder niet-verstoorde omstandigheden. Een ander belangrijk element uit de richtlijn is het vaststellen van milieukwaliteitsdoelstellingen voor individuele stoffen. Hierbij worden veiligheidsfactoren toegepast op resultaten van ecotoxicologische testen met één enkele soort, waarbij een case-by-case beoordeling mogelijk is, indien resultaten uit de veldsituatie of uit modelmatige ecosysteem-studies beschikbaar zijn.

In beide elementen – de ecologische status en de chemische status – kunnen bioassays een rol spelen. De huidige tekst van de richtlijn – en dan met name Annex V – geeft hiervoor nog geen duidelijke handvatten. Dit heeft te maken met het feit dat in de Kaderrichtlijn de nadruk ligt op stoffen, met als onderliggende doelstelling nul-emissies. Op grond daarvan zal waarschijnlijk een monitoringsverplichting blijven bestaan voor het analyseren van de stoffen uit de 'klassieke chemie'. Nederland blijkt in het Europese forum vrij solitair te staan op het gebied van toepassing van bioassays bij de beoordeling van de kwaliteit van het waterig milieu. Internationaal is er meer aandacht voor de productnormen (vergelijk bijvoorbeeld de ontwikkelingen rond de beoordeling van effluenten). Toch is de verwachting dat bioassays in de loop van het implementatietraject van de Kaderrichtlijn een rol gaan spelen. Voor Nederland wordt implementatie voorbereid door de werkgroep 'Doelstellingen en Monitoring'. Het onderhavige rapport met de resultaten van de discussies over een maatlat voor bioassays, zal input zijn voor deze werkgroep.

Verspreiding van zoute baggerspecie op de Noordzee wordt in internationaal verband geregeld in diverse conventies, waaronder LC (London Convention), PIANC (Permanent International Association of Navigation Congresses) en OSPARCOM (Oslo Paris Convention), waarvan de besluiten opgenomen dienen te worden in nationale regelgeving. Deze besluiten hebben, behalve

---

op het management van de baggerspecie, ook betrekking op de kwaliteit. Zo brengen de OSPAR-verdragen een rapportageverplichting met zich mee met betrekking tot het meten van gehalten standaardstoffen in de baggerspecie. Verder zijn er de Conferenties aangaande bescherming van de Noordzee, met als uitvloeisel het Verdrag over de bescherming van het mariene milieu van de Noordoost-Atlantische Oceaan. Voor wat betreft de biologische testen wordt in een aantal hierboven genoemde kaders (onder andere PIANC (PIANC, 1997 en 1998), LC (LC, 2000) en OSPAR (OSPARCOM, 1998)) aangegeven dat, waar nodig, de volgende aspecten in de beoordeling meegenomen dienen te worden: acute toxiciteit, chronische toxiciteit, bioaccumulatie, milieubelasting, genotoxiciteit en mutageniteit (PIANC). Alleen in de OSPAR-richtlijn wordt de biologische effectbeoordeling nader gespecificeerd in Annex 1 (1998).

Op wereldschaal zijn er voor wat betreft de (biologische) monitoring van de kwaliteit van te verspreiden baggerspecie ontwikkelingen in het kader van het GIPME-programma (1999, Programme of Global Investigation of Pollution in the Marine Environment) en van ICES (2000; International Council for Exploration of the Sea: Working Group on Biological Effects of Contaminants). In deze laatste werkgroep is uitgesproken dat men in de kwaliteitsbeoordeling inzet van een testbatterij wenst; er heeft nog geen selectie van bioassays plaatsgevonden.

---

---

# Afkortingen

---

|                  |   |
|------------------|---|
| ABM              | Algemeen beoordelingsmethodiek (voor stoffen en preparaten)       |
| ACR              | Acuut-chronische ratio  |
| CBI              | Chemisch-Biologisch beoordelingsInstrumentarium                   |
| Cf               | Concentratie factor   |
| CIW              | Commissie Integraal Waterbeheer                                   |
| CTT              | Chemie-Toxiciteit-Toets   |
| EC <sub>50</sub> | Concentratie waar 50% Effect op testorganismen optreedt           |
| EE               | Ernstig Effect  |
| ER               | Ernstig Risiconiveau  |
| FWVO             | Functionele Werkgroep Verontreiniging Oppervlaktewateren          |
| GIPME            | Global Investigation of Pollution in the Marine Environment       |
| ICES             | International Council for Exploration of the Sea                  |
| INS              | Integrale Normstelling Stoffen                                    |
| ISO              | International Standardisation Organisation                        |
| LC               | London Convention   |
| LC <sub>50</sub> | Lethal Concentration - waarbij 50% van de testorganismen doodgaan |
| LOES             | Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen                            |
| MTE              | Maximaal Toelaatbaar Effect                                       |
| MTR              | Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau                                 |
| NW4              | Vierde Nota Waterhuishouding                                      |
| NOEC             | No Observed Effect Concentration                                  |
| OCP              | OrganoChloor Pesticiden   |
| OECD             | Organisation for Economic Co-operation and Development            |
| OSPAR(COM)       | Oslo Paris (Convention)   |
| PAF              | Potentially Affected Fraction                                     |
| PAK              | Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen                        |
| PBT              | Persistentie, bioaccumulatie en toxiciteit                        |
| PCB              | PolyChloorBifenylen   |
| PIANC            | Permanent International Association of Navigation Congresses      |
| Pt               | Potentiële toxiciteit   |
| SPME             | Solid Phase Micro Extraction                                      |
| SOP              | Standard Operation Procedure                                      |
| SSD              | Species Sensitivity Distribution                                  |
| TBT              | Tributyltin   |
| TEB              | Totaal-effluentbeoordeling  |
| TEF              | Toxic Equivalent Factor   |
| TEQ              | Toxic Equivalent  |
| TIE              | Toxiciteit Identificatie en Evaluatie                             |
| TU               | Toxic Unit  |
| UGT              | Uniforme Gehalte Toets  |
| VE               | Verwaarloosbaar Effect  |
| VR               | Verwaarloosbaar Risiconiveau                                      |

---

---

# Referenties

---

- Aldenberg, T. & J. Jaworska, 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotox. Environ. Saf.* 25, 48-63.
- Beek, M.A., A. Espeldoorn, M. Greijdanus en J.L. Maas, 2003. *Eco(toxi)cologische Monitoring Maas (EMMA)*. (in voorbereiding).
- Besten, P.J. den, C.A. Schmidt, M. Ohm, M.M. Ruys, J.W. van Berghem & C. v.d. Guchte, 1995. Sediment quality assessment in the delta of rivers Rhine and Meuse based on field observations, bioassays and food chain implications. In: *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4: 257 - 270.
- Besten, P.J. den, 1997. Biotisch effectonderzoek Hollandsch Diep en Dordtsche Biesbosch. Nader Onderzoek Waterbodems. RIZA rapport nr. 97.098.
- CIW, 2000. Normen voor het waterbeheer. Achtergronddocument bij de Vierde Nota Waterhuishouding (NW4). Commissie Integraal Waterbeheer, mei 2000.
- CIW, 2001. Emissie-immissie. Prioritering van bronnen en de immissietoets. Commissie Integraal Waterbeheer, werkgroep VI, juni 2001.
- Dekker, T., O.E. Krips & W. Admiraal, 2002. Life history changes in the benthic cladoceran *Chydorus piger* induced by low concentrations of sediment-bound cadmium. *Aquatic Toxicology*, 56; 93-101.
- Driesprong, A., F. de Jong, C. van de Guchte & R. van Gerwen, 2000. Bioassays zijn geschikt voor het waterbeheer. In: *H<sub>2</sub>O*, 11-2000, p. 48 - 49.
- Elswijk, M. van & J.A. Hin, 2002. Richtlijn nader onderzoek voor waterbodems. Ernst en urgentiebepaling van verontreinigde waterbodems. AKWA rapport 01.005, RIZA nota 2001.052.
- EPA, 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA 600/R-99/064. Second edition.
- FWVO, 1997. Baggerspecie, meer of minder schadelijk. Kwaliteitsbeoordeling met bioassays. Rijkswaterstaat, FWVO-nota 97.04.
- FWVO, 2000. Handreiking bepaling acute toxiciteit van effluenten. Rijkswaterstaat, FWVO-nota 00.06.
- Geest, H.G. van der, 2001. Insects in polluted rivers: an experimental analysis. Proefschrift UvA.

- 
- Gilde, L.J., K.H. Prins & C.A.M. van Helmond, 1999. Monitoring Zoete Rijkswateren. RIZA nota 99.004.
- GIPME (IOC-UNEP-IMO), 1999. Final report on guidance on assessment of sediment quality. Programme of Global Investigation of Pollution in the Marine Environment (GIPME).
- Guchte, C. van de, 1991. The sediment quality TRIAD: an integrated approach to assess contaminated sediments. International Conference of River Water Quality; Ecological Assessment and Control. Commission of the European Communities, Bruxelles. December 1991.
- Hendriks, J., Th. Brock, C. v.d. Guchte, H. Maas, D. v.d. Meent, C. Schipper, J. Stronkhorst & D. de Zwart, 1998. Criteria voor de beoordeling van resultaten van bioassays. RIZA Werkdocument 98.044.
- ICES, 2000. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants. Final draft. Nantes, France 27-31 March 2000.
- Jans, L., M. Schropp, M. Greijdanus-Klaas, V. van der Meij, J. Oosterbaan, J. Backx, B. van der Heijdt, J. de Jonge, A. van der Scheer, M. van Wijngaarden & J. Kranenbarg, 2002. Monitoring Nevengeulen, integrale jaarrapportage 2001/2002. RIZA werkdocument 2002.083X.
- Jong, F.M.W. de, W. Deneer & W.L.M. Tamis, 2000. Veldbioassays. Ontwikkeling van een richtlijn voor veldbioassays met waterlooien en waterplanten voor het aantonen van bestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater. CML rapportnr. 150. Alterra rapportnr. 061. Centrum voor Milieukunde, Leiden.
- Lahr, J., J.L. Maas-Diepeveen, S.C. Stuijzand, P.E.G. Leonards, J.M. Drüke, S. Lücker, A. Espeldoorn, L.C.M. Kerkum, L.L.P. van Stee & A.J. Hendriks, 2003. Responses in sediment bioassays used in the Netherlands: can observed toxicity be explained by routinely monitored priority pollutants? Water Research (in press).
- LC, 2000. London Convention, Scientific Group. Waste assessment guidance: development of waste-specific guidance. Dredged Material Assessment Framework. Note by the secretariat for the 23<sup>rd</sup> meeting 2000.
- Legierse, K., 2001. *In vitro* bioassays. Visie, profiel en status binnen RIKZ-projecten WT\*2-CBI en WB\*2-BIOSYST. Werkdocument RIKZ/OS rapportnr. 2001.856x.
- Maas, J.L., C. van de Guchte & F.C.M. Kerkum, 1993. Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE-benadering. Methode-beschrijvingen voor enkele bioassays, bioaccumulatiemetingen en veldstudies. RIZA, rapport nr. 93.027.
- Maas, J.L., E. de Bruijne, A. Espeldoorn, E.M. Foekema & A.J. Hendriks, 2000. Validatie risicoschatting gifstoffen in uitslagwater bij drie gemalen in Flevoland. RIZA werkdocument. 2000.195X.
- NW4, 1998. Vierde Nota Waterhuishouding. Regeringsbeslissing, 1998. Ministerie van Verkeer en Waterstaat.



- 
- OSPARCOM, 1998. OSPAR guidelines for the management of dredged material.
- PIANC, 1997. Dredged material management guide. Special report of the Permanent Environmental Commission. Supplement to bulletin no 96. Brussels, Belgium.
- PIANC, 1998. Management of aquatic disposal of dredged material. Report of working group I of the Permanent Environmental Commission. Brussels, Belgium.
- Plassche, E.J. van de & A. Straetmans, 2002. Omgaan met bioassays. Verslag van de workshop gehouden op 9 april 2002 te Utrecht. RIZA werkdocument 2002. 121X; RIKZ/OS werkdocument 2002.816X.
- RIWA, 1995. Auteurs: Noij, Th.H.M. en M.A. Meerkerk. Toxicologisch en ecologisch onderzoek van de Rijn in 1994. In relatie tot de drinkwaterbereiding.
- RIWA, 2001. Auteurs: E.J.M. Penders & W. Hoogenboezem. Biotesten, een bruikbaar instrument voor de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewater? RIWA, Amsterdam.
- Schipper, C.A., 2000. Biologisch Chemisch Instrumentarium. RIKZ/OS-2000.881x, 2000.
- Schipper C.A. & J. Stronkhorst, 1999a. Zeeklitten en slijkgarnalen testen baggerspecie. Water, 1999, nr. 54.
- Schipper C.A. & J. Stronkhorst, 1999b. RIKZ Handboek Toxiciteitstesten voor zoute baggerspecie. RIKZ rapportnr. 99.012. ISBN 90-369-3493.
- Slooff, W., D. de Zwart, M. Tonkes, M. Rutgers & C. v.d. Guchte, 2001. Basis voor effectgerichte beoordeling? Eindconcept. RIVM rapport nr. 601503.020. RIZA Werkdocument nr. 2001.048.
- STOWA, 1997a. Biomonitoringstechnieken voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 1: Inventarisatie en selectie van geschikte technieken. Deel 2: Keuzesysteem en praktijktoetsing. STOWA nr. 97.08.
- STOWA, 1997b. Ecotoxicologische risicobeoordeling van verontreinigde waterbodems. RIZA notanr. 97.085.
- STOWA, 2001. Acut toxiciteitsonderzoek aan effluenten uitgevoerd door regionale waterkwaliteitsbeheerders. Rapportage van praktijkervaringen. Auteur: C.A.M. Baltus. RIZA rapportnr. 2001.001; STOWA rapportnr. 2001.03.
- Stronkhorst, J., C.A. Schipper, J. Honkoop & K. van Essen, 2001. Bagger-specie in Zee: hoe regelen we dat verantwoord? Een nieuw effectgericht beoordelingssysteem. RIKZ/2001.030.
- Stronkhorst, J., P. Leonards & T. Murk, in prep. Screening of harbour sediments for compounds with a dioxinelike mode of action using the DR-CALUX *in vitro* bioassay.

- 
- Stuijzand, S.C., 1999. Variables determining the response of invertebrate species tot toxicants: a case study on the river Meuse. Proefschrift UvA.
- Stuurgroep Integrale Normstelling Stoffen, 1999. Integrale Normstelling Stoffen: Milieukwaliteitsnormen Bodem, Water en Lucht.
- Swertz, O.C., J.L. Maas - Diepeveen & J.W.F.M. van Grunsven, 1999. Visievorming beoordeling van watersystemen op bio-effecten. RIKZ. Rapport 99.042; RIZA Rapport 99.068.
- Tonkes, M., G.B.J. Rijs, F.H. Wagemaker & C. Baltus, 2000. Totaal-effluentbeoordeling bij rwzi's. Literatuurstudie naar de toepassing van ecotoxicologische testmethoden bij totaal-effluentbeoordeling van rwzi-effluenten. RIZA rapportnr. 2000.055.
- Tonkes, M., H.P. Pols, H. Warmer & V. Bakker, 1998. Totaal-effluentbeoordeling. RIZA rapportnr. 98.034.
- Traas, T.P. (ed.), 2001. Guidance Document on deriving Environmental Risk Limits. RIVM rapport nr. 601501 012.
- Tuinstra, J., 1999. Omgaan met bioassays & beoordelingscriteria binnen het waterbeheer. Verslag van de gelijknamige workshop. Iwaco, rapportnr. 37513.
- TK, 1998 - 1999. Tweede Kamer vergaderjaar 1998 - 1999, 26 401, nr. 12.
- TK, 2000 - 2001. Tweede Kamer, vergaderjaar 2000 - 2001, 26 401, nr 24.
- Vaes, W.H.J., E. Urestarazu Ramos, H.J.M. Verhaar and J.L.M. Hermens, 1998. Acute toxicity of nonpolar versus polar narcosis: is there a difference? Environ. Toxicol. Chem. 17, 1380 - 1384.
- Vethaak, A.D., G.B.J. Rijs, S.M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen en J. Lahr, 2002. Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: Occurrence, Potency and Biological Effects. RIZA/RIKZ report no. 2002.001.
- Wezel, van A.P., T. Traas, M. Polder, R. Posthumus, P. van Vlaardingen, T. Crommentuijn en E.J. van de Plassche, 1999. Maximum Permissible Concentrations for Polychlorinated Biphenyls, RIVM report nr. 601501006.
- Zwart, D. de, M. Rutgers & J. Notenboom, 1999. Bepaling van het locatie-specifieke ecologische risico van bodemverontreiniging: een opzet voor een beoordelingssystematiek. RIVM rapport nr. 711701 011.
- Zwart, D. de & A. Sterkenburg, 2002. Toxicity-based assessment of water-quality. In: Posthuma, L., G.W. Suter II and T.P. Traas (Eds). Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis Publishers.
- Zwart, D. de, 2002. Observed regularities in species sensitivity distributions for aquatic species. In: Posthuma, L., G.W. Suter II and T.P. Traas (Eds). Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis Publishers.

---

# Bijlage

---

**Tabel 1A: In vivo bioassays in oppervlaktewater (zoet, zout)**

| Type test   | Eindpunt  | Criterium                          | Toepassingskader  | Referentie   |
|---|---|------------------------------------|---|--|
| <b>• Als zodanig (lab)</b>  |   |                                    |   |  |
| <b>Chronische effecten</b>  |   |                                    |   |  |
| <b>zoet:</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)   | populatiegroei                                    | NOEC                               | Monitoring en kwaliteitsbeoordeling zoete oppervlaktewateren  | Beek <i>et al.</i> , 2003; Maas <i>et al.</i> , 2000; STOWA, 1997a   |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)  | overleving, reproductie                           | NOEC                               |   |  |
| <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alg)   | populatiegroei                                    | NOEC                               |   |  |
| <i>Brachydanio rerio</i> (vis)  | overleving/groei                                  | NOEC                               |   |  |
| Early Life Stage (ELS)  |   |                                    |   |  |
| <b>zout:</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)   | populatiegroei                                    | NOEC                               | Monitoring en kwaliteitsbeoordeling zoute oppervlaktewateren  |  |
| <i>Acartia tonsa</i> (kreeftachtige)  | reproductie                                       | NOEC                               |   |  |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (alg)  | populatiegroei                                    | NOEC                               |   |  |
| <i>Cyprinidon variegatus</i> (vis) ELS-test                                     | overleving/groei                                  | NOEC                               |   |  |
| <i>Psammecinus miliaris</i> (zeeëgel)   | fertilisatietoets                                 | NOEC                               |   |  |
| <i>Scophthalmus maximus</i> (vis)   | reproductie                                       | NOEC                               |   |  |
| <b>Acute effecten</b>   |   |                                    |   |  |
| <b>zoet:</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)  | sterfte, onbeweeglijkheid                         | EC <sub>50</sub>                   | Monitoring en kwaliteitsbeoordeling van zoete oppervlaktewateren  | STOWA, 1997a   |
| <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alg)   | populatiegroei                                    | EC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)   | lichtafname                                       | EC <sub>50</sub> /EC <sub>20</sub> |   |  |
| <i>Brachydanio rerio</i> (vis)  | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> (kreeftachtige)                                 | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Brachionus calyciflorus</i> (rotifeer)                                       | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   | Waterkwaliteit  | Van der Geest, 2001  |
| <i>Hydropsyche angustipennis</i>  | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Ephoron virgo</i> (insects)  |   |                                    |   |  |
|   |   |                                    |   |  |
| <b>zout:</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Acartia tonsa</i> (kreeftachtige)  | sterfte   | EC <sub>50</sub>                   | Monitoring en kwaliteitsbeoordeling van zoute oppervlaktewateren  |  |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (alg)  | populatiegroei                                    | EC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)   | lichtafname                                       | EC <sub>50</sub> /EC <sub>20</sub> |   |  |
| <i>Artemia salina</i> (kreeftachtige)   | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Brachionus plicatilis</i> (rotifeer)   | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
| <i>Poecilia reticulata</i> (vis)  | sterfte   | LC <sub>50</sub>                   |   |  |
|   |   |                                    |   |  |
| <b>• Concentraten (lab)</b>   |   |                                    |   |  |
| <b>Acute effecten (alleen de organische fractie - concentratie middels XAD)</b> |   |                                    |   |  |
| <b>zoet en zout (cq. brak)</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Daphnia magna</i> IQ (kreeftachtige)   | enzymatische test op toxische stress (letaliteit) | Ecf <sub>50</sub>                  | Deze set testen wordt toegepast in de monitoring en kwaliteitsbeoordeling van rijkswateren; de keuze van testen in concentraten wordt mede bepaald doordat deze testen in kleine volumes kunnen worden uitgevoerd | De Zwart & Sterkenburg, 2002; RIWA, 2001; RIWA, 1995   |
| <i>Raphidocelis subcapitata</i> PAM (alg)                                       | fotosynthese test                                 | ECf <sub>50</sub>                  |   |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)   | lichtafname                                       | ECf <sub>50</sub>                  |   |  |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> (kreeftachtige)                                 | sterfte   | LCf <sub>50</sub>                  |   |  |
| <i>Brachionus calyciflores</i> (rotifeer)                                       | sterfte   | LCf <sub>50</sub>                  |   |  |
| <b>Als zodanig (veld - in situ)</b>   |   |                                    |   |  |
| <b>Chronische blootstelling:</b>  |   |                                    |   |  |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)  | overleving populatiegroei                         |                                    | Beoordelen waterkwaliteit oppervlaktewater. Blootstelling in kooitjes, voornamelijk in gebieden waar diffuse lozingen met bestrijdingsmiddelen of metalen plaatsvinden  | Beek <i>et al.</i> , 2003; Maas <i>et al.</i> , 2000; STOWA, 1997a STOWA, 1997a Stuifzand <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Lemna minor</i> (plant)  | populatiegroei                                    |                                    |   |  |
| <i>Gammarus sp.</i> (kreeftachtige)   | overleving  |                                    |   |  |
| <i>Hydropsyche spec.</i> (insect)   | overleving  |                                    |   |  |

**Tabel 1B: In vivo bioassays in zoet en zout sediment**

| Type test  | Eindpunt               | Criterium                          | Toepassingskader   | Referentie   |
|--|------------------------|------------------------------------|--|--|
| <b>• Poriewater zoet</b>                                     |                        |                                    |  |  |
| <b>Chronische effecten</b>                                   |                        |                                    |  |  |
| <i>Daphnia magna</i> IQ (kreeftachtige)                      | overleving/reproductie | NOEC                               | Kwaliteitsbeoordeling waterbodems en monitoring van ingrepen | Jans <i>et al.</i> , 2002; Lahr <i>et al.</i> , 2003; STOWA, 1997b; FWVO, 1997 |
| <b>Acute effecten</b>  |                        |                                    |  |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)                            | lichtafname            | EC <sub>50</sub> /EC <sub>20</sub> | Kwaliteitsbeoordeling waterbodems en monitoring van ingrepen | Lahr <i>et al.</i> , 2003; STOWA, 1997b; FWVO, 1997                            |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> (kreeftachtige)              | sterfte                | LC <sub>50</sub>                   |  |  |
| <i>Brachionus calyciflorus</i> (rotifeer)                    | sterfte                | LC <sub>50</sub>                   |  |  |
| <b>• Sediment zoet</b>                                       |                        |                                    |  |  |
| <b>Chronische effecten</b>                                   |                        |                                    |  |  |
| <b>zoet en zout (cq. brak)</b>                               |                        |                                    |  |  |
| <i>Chironomus riparius</i> (muggelarve - insect)             | sterfte en groei       | NOEC                               | Kwaliteitsbeoordeling waterbodems en monitoring van ingrepen | Jans <i>et al.</i> , 2002; Lahr <i>et al.</i> , 2003; STOWA, 1997b; FWVO, 1997 |
| <i>Plectus acuminatus</i> (nematode)                         | overleving/reproductie | NOEC                               | Nog geen ervaring in praktijk                                |  |
| <b>Acute effecten</b>  |                        |                                    |  |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie; Solid Phase test)          | afname luminescentie   | EC <sub>50</sub>                   | Wordt weinig toegepast op zoete slibrijke sedimenten         | Lahr <i>et al.</i> , 2003; FWVO, 1997  |
| <i>Ephoron virgo</i> (insect)                                | sterfte                | EC <sub>50</sub>                   | Nog weinig ervaring in praktijk                              | Lahr <i>et al.</i> , 2003  |
| <i>Hyalella azteca</i> (kreeftachtige)                       | sterfte                | EC <sub>50</sub>                   | Nog weinig ervaring in praktijk                              | EPA, 2000  |
| <i>Chydorus sphaericus/piger</i> (chydoride - kreeftachtige) | sterfte en eivorming   | EC <sub>50</sub>                   | Nog in ontwikkeling  | Dekker <i>et al.</i> , 2002  |
| <b>• Poriewater zout</b>                                     |                        |                                    |  |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)                            | lichtafname            | EC <sub>50</sub> /EC <sub>20</sub> | Kwaliteitsbeoordeling van zoute sedimenten                   | FWVO, 1997   |
| <b>• Sediment zout</b>                                       |                        |                                    |  |  |
| <b>Acute effecten</b>  |                        |                                    |  |  |
| <i>Corophium volutator</i> (slijkgarnaal)                    | sterfte                | EC <sub>50</sub>                   | Kwaliteitsbeoordeling van zoute sedimenten/baggerspecie      | Stronkhorst <i>et al.</i> , 2001; Schipper & Stronkhorst, 1999a                |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie; Solid Phase test)          | lichtafname            | EC <sub>50</sub>                   |  | Stronkhorst <i>et al.</i> , 2001; Schipper & Stronkhorst, 1999b                |
| <i>Echinocardium cordatum</i> (zeeklit)                      | sterfte                | EC <sub>50</sub>                   |  | Schipper & Stronkhorst, 1999a; FWVO, 1997                                      |
| <i>Nereis diversicolor</i> (copepod)                         | sterfte                | EC <sub>50</sub>                   |  | Schipper, 2000   |

---

| Type test                                   | Eindpunt                            | Criterium | Toepassingskader         | Referentie |
|---|-------------------------------------|-----------|--------------------------|------------|
| <b>Chronische effecten</b>                  |                                     |           |                          |            |
| <i>Corophium volutator</i> (slijkgarnaal)   | overleving en reproductie           | NOEC      | In ontwikkeling bij RIKZ |            |
| <i>Nereis diversicolor</i> (zeeduizendpoot) | overleving, groei en bioaccumulatie | NOEC      | In ontwikkeling bij RIKZ |            |
| <i>Nereis virens</i> (zandzager)            | overleving, groei en bioaccumulatie | NOEC      | In ontwikkeling bij RIKZ |            |

---

• Als zodanig (veld - in situ) zoetl

|  |                  |  |  |              |
|--|------------------|--|--|--------------|
| <b>Chronische effecten</b><br><i>Chironomus riparius</i> (muggelarve - insect) | overleving/groei |  | Kwaliteitsbeoordeling zoete sedimenten | STOWA, 1997b |
|--|------------------|--|--|--------------|

**Tabel 1C: Bestaande *in vitro* bioassays en toepassingsgebieden**

| Mechanisme   | Type toxiciteit / te verwachten effect | <i>In vitro</i> test  | Toepassing  |
|--|--|---|---|
| Genotoxiciteit   | chronisch                              | Ames -test<br>SOS-chromo bioassay<br>Umu-C -test<br>MutatoxTM<br>Comet -test  | De assays meten primaire DNA-schade of mutageniteit. Zowel Mutatox als Umu-C zijn in beperkte mate onderzoeksmatig in Nederland toegepast in de beoordeling van (afval)water- en sedimentkwaliteit. De genotoxiciteits-assays zijn beperkt ecologisch relevant.   |
| Immunotoxiciteit   | chronisch                              | Human NK-cells<br>Diverse primaire cellen   | Toepassing van deze assays heeft zich tot nu toe beperkt tot het beoordelen van immunotoxiciteit van individuele stoffen. Of de testen ook geschikt zijn voor het beoordelen van milieumonsters is onbekend.  |
| Oestrogene hormoonverstoring                                 | chronisch                              | ER-CALUX<br>ER Bindingsassay<br>YES bioassay<br>MCF-7 bioassay<br>CARP-HEP bioassay<br>Transgene zebravis                               | Deze testen zijn recentelijk onderzoeksmatig in Nederland gebruikt in de beoordeling van water- of sedimentkwaliteit. Dit betekent dat praktische kennis over de testen beschikbaar is. Met name is veel onderzoek uitgevoerd binnen het kader van LOES (Landelijk Onderzoek Oestrogene Stoffen) en de daarbij behorende voorstudies. |
| Dioxine-achtige toxiciteit                                   | chronisch                              | DR-CALUX<br>Ah-receptor bioassays   | De DR-CALUX wordt sinds 1996 op grote schaal onderzoeksmatig in Nederland toegepast in de beoordeling van met name sediment, poriewater, voedsel, bloedplasma en lucht. Tevens opgenomen in CTT (beoordeling baggerspecie bij verspreiding in zee).   |
| Ontkoppeling Oxidatieve fosforylering / inhibitie respiratie | acuut, chronisch                       | AChE  | Dit assay meet de esterase inhibitie relevant voor de groep pesticiden organofosfaten en carbamaten; referentiestof is dichloorvos.   |
| Neurotoxiciteit  | acuut, chronisch                       | ófwel geen <i>in vitro</i> bioassay beschikbaar/nog in ontwikkeling, ófwel mechanisme voldoende afgedekt door <i>in vivo</i> bioassays. |   |
| Narcose  | acuut                                  |   |   |
| Cytotoxiciteit   | acuut, chronisch                       |   |   |
| Remming fotosynthese   | acuut, chronisch                       |   |   |

Tabel 1D: *In vivo* en *in vitro* bioassays voor de Totaal-effluentbeoordeling (TEB)

| Type test                                   | Eindpunt                | Criterium        | Referentie                  |
|---|-------------------------|------------------|-----------------------------|
| <b>• Toxiciteit (als zodanig)</b>           |                         |                  |                             |
| <b>Acute effecten</b>                       |                         |                  |                             |
| <b>zoet:</b>                                |                         |                  |                             |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)           | lichtafname             | EC <sub>50</sub> | Tonkes <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)        | overleving              | EC <sub>50</sub> |                             |
| <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alg)       | populatiegroei          | EC <sub>50</sub> |                             |
| <i>Brachydanio rerio</i> (vis)              | overleving/groei        | LC <sub>50</sub> |                             |
| <b>zout:</b>                                |                         |                  |                             |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)           | lichtafname             | EC <sub>50</sub> | Tonkes <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Acartia tonsa</i> (kreeftachtige)        | overleving              | EC <sub>50</sub> |                             |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (alg)      | populatiegroei          | EC <sub>50</sub> |                             |
| <i>Poecilia reticulat</i> (vis) ELS-test    | overleving              | LC <sub>50</sub> |                             |
| <b>Chronische effecten</b>                  |                         |                  |                             |
| <b>zoet:</b>                                |                         |                  |                             |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)        | overleving, reproductie | NOEC             | Tonkes <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alg)       | populatiegroei          | NOEC             |                             |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)           | populatiegroei          | NOEC             |                             |
| <b>zout:</b>                                |                         |                  |                             |
| <i>Acartia tonsa</i> (kreeftachtige)        | overleving en eivorming | NOEC             | Tonkes <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (alg)      | populatiegroei          | NOEC             |                             |
| <i>Psammechinus miliaris</i> (zeeëgel)      | fertilisatietoets       | NOEC             |                             |
| <i>Scophthalmus maximus</i> (vis)           | reproductie             | NOEC             |                             |
| <b>• Genotoxiciteit (in concentraten)</b>   |                         |                  |                             |
| <b><i>In vitro</i> testen</b>               |                         |                  |                             |
| Umu-C -test                                 | genotoxiciteit          |                  | Tonkes <i>et al.</i> , 2000 |
| <b>• Bioaccumulatie (in SPME)</b>           |                         |                  |                             |
| <b>• Persistentie (biologische afbraak)</b> |                         |                  |                             |



**Tabel 1E: *In vivo* bioassays in de TRIADE-benadering (sediment, zoet)**

| Type test  | Eindpunt                | Criterium                          | Toepassingskader   | Referentie   |
|--|-------------------------|------------------------------------|--|--|
| <b>• Poriewater zoet</b>                         |                         |                                    |  |  |
| <b>Chronische effecten</b>                       |                         |                                    |  |  |
| <i>Daphnia magna</i> (kreeftachtige)             | overleving/ reproductie | NOEC                               | Wordt toegepast in kader van vaststellen ernst en urgentie sanering verontreinigde waterbodems | Van Elswijk & Hin, 2002;<br>STOWA, 1997b<br>Maas, <i>et al.</i> , 1993 |
| <b>Acute effecten</b>                            |                         |                                    |  |  |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie)                | lichtafname             | EC <sub>50</sub> /EC <sub>20</sub> |  |  |
| <b>• Sediment zoet</b>                           |                         |                                    |  |  |
| <b>Chronische effecten</b>                       |                         |                                    |  |  |
| <i>Chironomus riparius</i> (muggelarve - insect) | sterfte en groei        | NOEC                               |  |  |

**Tabel 1F: *In vivo* en *in vitro* bioassays voor de beoordeling zoute baggerspecie (CTT)**

| Type test  | Eindpunt                   | Criterium        | Toepassingskader  | Referentie                       |
|--|----------------------------|------------------|---|----------------------------------|
| <b>• Sediment - zout</b>                                       |                            |                  |   |                                  |
| <b>Acute effecten</b>  |                            |                  |   |                                  |
| <i>Corophium volutator</i> (slijkgarnaal)                      | sterfte                    | EC <sub>50</sub> | Worden toegepast in de beoordeling van zoute baggerspecie (CTT) | Stronkhorst <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacterie; Solid Phase test)            | lichtafname                | EC <sub>50</sub> |   |                                  |
| <b>• Concentraten - sediment zout</b>                          |                            |                  |   |                                  |
| <b>Potentieel chronische effecten - <i>in vitro</i> testen</b> |                            |                  |   |                                  |
| DR-CALUX   | dioxine-achtige toxiciteit | TEQ              |   |                                  |

---