

Toxiciteit van oliefracties in sediment voor *Corophium volutator*

N.H.B.M. Kaag, A.C. Sneekes, A.A. Koelmans,
E.T.H.M. Peeters

Rapport C008/09



Institute for Marine Resources and Ecosystem Studies

Wageningen **IMARES**

Vestiging Den Helder

Opdrachtgever: Rijkswaterstaat Waterdienst
t.a.v. Margriet Beek
Postbus 17
8200 AA Lelystad

Publicatiedatum: 29 januari 2009

- Wageningen **IMARES** levert kennis die nodig is voor het duurzaam beschermen, oogsten en ruimte gebruik van zee- en zilte kustgebieden (Marine Living Resource Management).
- Wageningen **IMARES** is daarin de kennispartner voor overheden, bedrijfsleven en maatschappelijke organisaties voor wie marine living resources van belang zijn.
- Wageningen **IMARES** doet daarvoor strategisch en toegepast ecologisch onderzoek in perspectief van ecologische en economische ontwikkelingen.

© 2009 Wageningen **IMARES**

Wageningen IMARES is een samenwerkingsverband tussen Wageningen UR en TNO.
Wij zijn geregistreerd in het Handelsregister Amsterdam nr. 34135929,
BTW nr. NL 811383696B04.



A_4_3_1-V2

De Directie van Wageningen IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Wageningen IMARES; opdrachtgever vrijwaart Wageningen IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets van dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Samenvatting

Naar aanleiding van toxiciteitexperimenten zijn milieu risicogrenzen voor minerale olie afgeleid, waarbij onderscheid wordt gemaakt naar fracties op basis van kookpunt (lengte van de koolstofketens). In dit onderzoek is onderzocht in hoeverre de voorgestelde risicogrenzen overeenkomen met waargenomen toxiciteit in veldsedimenten. Het oliegehalte werd in deze sedimenten bepaald door middel van XAD-extracties, waarmee het snel desorberend gehalte werd bepaald. Toxiciteit werd bepaald met een 10-daagse test met de slijkgarnaal *Corophium volutator*.

Voor de fractie C10-C11 werd een LC_{50} 0,59 mg/kg gevonden, ongeveer 40% van de voorgestelde MTR. Voor de fractie C12-C15 werd een LC_{50} van 2,87 mg/kg gevonden, ongeveer 19% van de MTR. De gemeten gehalten van beide fracties werden gesommeerd op basis van toxic units (TU). Dit leverde een LC_{50} op van 0,54 TU. Bij de berekening van de dosis-effect relaties is rekening gehouden met additionele effecten van andere stoffen, door monsters met een relatief hoge sterfte bij vergelijkbaar oliegehalte, niet mee te nemen in de berekening. Desondanks is de LC_{50} lager dan op basis van de risicogrenzen mag worden verwacht. Voor geen van de andere geanalyseerde stoffen kon echter een significante correlatie met het effect worden gevonden. De relatief hoge sterfte wordt dus mogelijk veroorzaakt door andere, niet geanalyseerde, stoffen. Wel is duidelijk dat de sterfte in de *Corophium*-toets altijd significant is als de TU groter is dan 1.

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1 Inleiding	7
2 Dataset en analyses	9
2.1 Beschrijving Nader Onderzoek	9
2.2 Bioassays.....	9
2.3 Olieanalyse	10
3 Resultaten	11
4 Discussie	15
5 Literatuur	17
6 Verantwoording.....	19

1 Inleiding

Vanaf 1997 wordt een nieuwe analyse methode voor minerale olie in sediment gebruikt. De resultaten van de oude IR (Infrarood) methode en de nieuwe GC-FID methode bleken echter significant verschillend te zijn. In de normstelling (4de Nota waterhuishouding) werd de oude norm voor minerale olie gehandhaafd. De nieuwe analyse methode was echter aanleiding om onderzoek te doen naar de specifieke toxiciteit van olie om de norm beter te kunnen onderbouwen.

Bij dit onderzoek werd er vanuit gegaan dat de toxiciteit van olie berust op de narcotiserende werking van de componenten en dat dit vooral veroorzaakt wordt door de componenten met een laag kookpunt (korte koolstofketens). In experimenten waarin sediment met verschillende olietypen werd gespiked, werd inderdaad gevonden dat toxiciteit vooral veroorzaakt wordt door olie bestaande uit fracties met een laag kookpunt (Scholten *et al.*, 1997; Rotteveel *et al.*, 2002). Naar aanleiding van deze resultaten zijn nieuwe normen afgeleid voor afzonderlijke oliefracties in sediment (Verbruggen, 2004; Beek *et al.*, 2007; Verbruggen *et al.*, 2008). Bij deze normen is de toxic unit (TU) benadering gevolgd.

De afdeling Milieu van Wageningen IMARES was in 2005 betrokken bij het Nader Onderzoek in de Jan van Riebeeckhaven en omgeving in het Noordzeekanaal. Tijdens dit onderzoek werden op ca. 200 punten sedimentmonsters verzameld voor chemische analyses en bioassays. Deze dataset is gebruikt om bruikbaarheid van de voorgestelde normen te valideren. Daarbij is gebruik gemaakt van de laatst gepubliceerde MTR waarden (Verbruggen *et al.*, 2008).

2 Dataset en analyses

2.1 Beschrijving Nader Onderzoek

In 2005 is in opdracht van Rijkswaterstaat Noord-Holland een Nader Onderzoek uitgevoerd in het gebied Jan van Riebeeckhaven aan het Noordzeekanaal. Het onderzoek was erop gericht ecologische risico's te karakteriseren van de sedimentlaag die zou achterblijven na baggerwerkzaamheden. In het hoofdkanaal werden daarom sedimentmonsters genomen van het 'moedersediment' onder de te verwijderen baggerlaag. In de zijhavens 'Jan van Riebeeck' en 'Voorzaan' werd de huidige waterbodem bemonsterd, omdat hier geen baggerwerkzaamheden voorzien waren.

De chemische analyses waren gericht op de beschikbare fracties. Voor metalen door poriewater te extraheren met behulp van een chelex kolom, voor PAK, PCB, OCB en minerale olie door de sediment monsters gedurende 24 uur te extraheren met XAD. Daarnaast werden alle monsters geanalyseerd met behulp van de DR-CALUX methode als indicatie voor de aanwezigheid van dioxines. Toxiciteit werd bepaald met een 10-daagse sediment contact test met de slijkgarnaal *Corophium volutator*.

Voor dit onderzoek zijn de gegevens van de monsters gebruikt waarin zowel toxiciteit, als de oliefracties zijn bepaald:

Olie is bepaald in 126 monsters. In 47 van deze monsters was het olie gehalte boven de detectielimiet van 5 mg/kg droge stof. Toxiciteit is bepaald in 38 van deze monsters en de aparte fracties in 31 monsters, zodat 7 monsters niet zijn meegenomen in de analyse.

2.2 Bioassays

De test met de slijkgarnaal *Corophium volutator* is gebaseerd op de blootstelling van een in het sediment levend organisme aan het sediment. De test duurt 10 dagen en wordt beschouwd als een acute test, met sterfte als effectparameter. Per sediment monster worden 20 organismen blootgesteld in een water-sediment testsysteem. Uiteindelijk worden 5 testsystemen per sedimentmonster getoetst (100 organismen per monster). Het effect wordt uitgedrukt als percentage sterfte.

De data zijn statistisch getoetst met behulp van variantie analyse (Anova) gevolgd door Tukey's Multiple Comparison test. Om ervoor te zorgen dat de data normaal verdeeld zijn werden ze voorafgaand aan de toetsing wortel-arcsinus getransformeerd (Sokal & Rohlf, 1995). Bij de toetsing zijn monsters waar experimentele randvoorwaarden (i.c. NH₄⁺) overschreden zijn niet meegenomen in de analyse (conform RIKZ standaardvoorschrift Specie 01).

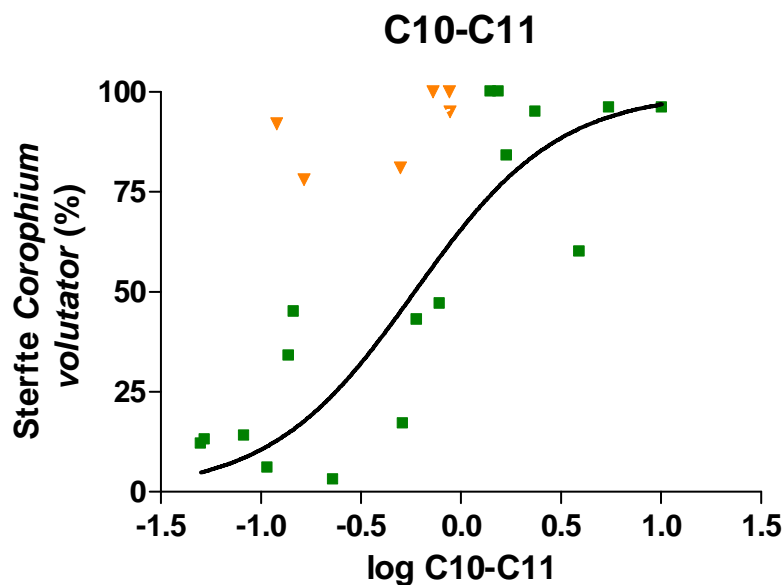
Uit het onderzoek blijkt dat een sterfte groter dan 20% als significant afwijkt van de referentiemonsters (Arcadis, 2006).

2.3 Olieanalyse

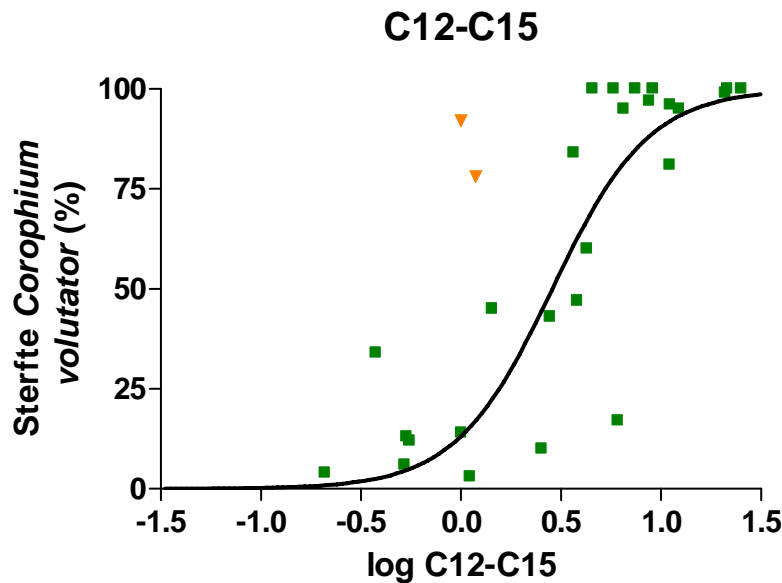
Een bekende hoeveelheid nat sediment (met bekend drooggewicht) is gedurende 8 uur geschud met 300 ml water en 10 gram geconditioneerde XAD. Na afscheiden van XAD is deze na toevoeging van interne standaarden geëxtraheerd. Het extract werd gezuiverd over geactiveerde silica (3 gr), drooggedampt en opgenomen in een recovery standaard. Het extract voor minerale olie is aanvullend gezuiverd over florisil (0,3 gr / 3 ml) en geanalyseerd op GC-FID ten opzichte van externe standaarden. Het oliegehalte is gekwantificeerd ten opzichte van externe standaarden.

3 Resultaten

De relatie tussen het oliegehalte en de sterfte in de Corophium-toets is onderzocht voor de fracties C10-C11 en C12-C15. Fracties met langere koolstofketens (C16 en groter) worden waarschijnlijk niet in voldoende mate opgenomen om tot significante narcotiserende effecten te leiden (Verbruggen *et al.*, 2008). In onderstaande figuren is de sterfte uitgezet tegen de concentratie van de fracties C10-C11 (Figuur 1) en C12-C15 (Figuur 2). Om enigszins rekening te houden met het effect van andere stoffen, zijn de dosis-effect curves niet door alle data gefit, maar zijn punten met een hoge sterfte uitgesloten. Op deze manier valt voor de fractie C10-C11 een LC50 van 0,59 mg/kg ($R^2=0,766$; 95% betrouwbaarheidsinterval 0,35-0,99) en voor de fractie C12-C15 een LC50 van 2.87 mg/kg ($R^2=0,769$; betrouwbaarheidsinterval 2,06-3,99).

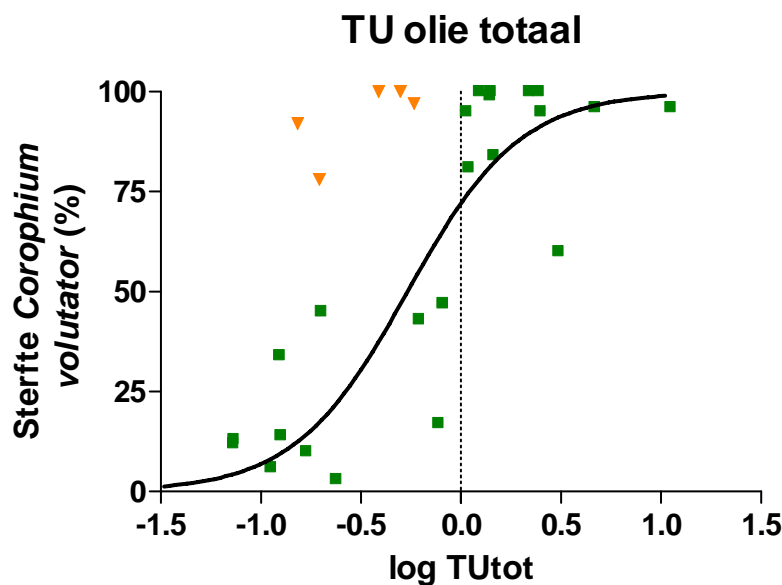


Figuur 1 Sterfte van de *Corophium volutator* ten opzichte van de concentratie C10-C11 alifaten. De dosis-effect curve is gefit door de groene blokjes ($n=17$).



Figuur 2 Sterfte van de *Corophium volutator* ten opzichte van de concentratie C12-C15 alifaten. De dosis-effect curve is gefit door de groene blokjes ($n=29$).

Beide fracties zijn gecombineerd door ze op te tellen op basis van toxic units. Hiervoor zijn de MTR waarden gebruikt uit Verbruggen *et al.* (2008): 1,4 mg/kg voor de fractie C10-C11 en 15 mg/kg voor de fractie C12-C15. Ook bij deze benadering resteren een aantal punten die gekenmerkt worden door een relatief hoge sterfte in verhouding tot het aantal TU. Bij het fitten van de dosis-effect curve zijn de 5 meest extreme punten niet meegenomen (Figuur 3). Dit resulteert in een LC_{50} bij 0.54 TU ($R^2=0,801$; 95% betrouwbaarheidsinterval 0,37-0,79).



Figuur 3 Sterfte van de *Corophium volutator* ten opzichte van de Toxic Units voor alifaten. De dosis-effect curve is gefit door de groene blokjes ($n=25$).

Mogelijke correlatie van de effecten in de Corophium-toets met gehalten in het sediment is onderzocht met een multiple regressie model met forward stepwise variable selection. Als potentiële onafhankelijke variabelen werden somPAK, somPCB, minerale olie en de aparte oliefracties (C10-C11, C12-C15, C16-C19 en C20-C25) ingevoerd. Voor de statistische analyses zijn alle gehalten logaritmisches getransformeerd en naar gelijke eenheden omgezet. Sterfte percentages van de Corophium toets werden wortel-arcsinus getransformeerd.

Het model geeft een significante positieve correlatie van de sterfte in de Corophium-toets met de fractie C12-C15 en een significant negatieve correlatie met de fractie C20-C25, na correctie voor het effect van de fractie C12-C15. Naast deze twee variabelen gaf geen van de andere stofgroepen een significante extra verbetering van de correlatie met de sterfte in de Corophium-toets.

4 Discussie

De nieuwe risicogrenzen voor olie zijn gebaseerd op toxiciteitgegevens. Met behulp van evenwicht-partitie berekeningen zijn hieruit risicogrenzen in het sediment berekend (Verbruggen, 2004; Verbruggen *et al.*, 2008). De consequentie van deze berekeningen is dat bij er in principe nauwelijks of geen effect verwacht wordt bij de voorgestelde MTR en dat effect pas optreedt als de MTR wordt overschreden. Met behulp van de TU benadering kan het risico van stofgroepen met een verschillende MTR worden opgeteld, waarbij effect verwacht wordt als de TU groter is dan 1.

De TU kan worden berekend door de concentratie in het sediment te delen door de MTR. Hierbij wordt er vanuit gegaan dat de beschikbaarheid volledig is. Gewoonlijk is dit echter niet het geval, omdat de olie zich bindt aan de organische fractie van het sediment en daardoor steeds minder beschikbaar wordt. De MTR is echter gebaseerd op experimenten met gespiked sediment, waarin de beschikbaarheid van de olie relatief veel hoger zal zijn geweest dan gewoonlijk in veldsedimenten het geval is. Bij de beoordeling van veldsedimenten kan het risico van de aanwezige olie daarom behoorlijk overschat worden.

In het Nader Onderzoek rondom de Jan van Riebeeckhaven in het Noordzeekanaal is olie niet gemeten in het totaal sediment, maar in de snel desorberende fractie door middel van extractie met XAD. Er wordt verondersteld dat vooral deze fractie biologisch beschikbaar is (Cornelissen & Kamerling, 2003). Een TU gebaseerd op het snel desorberend gehalte in sediment zou daarom moeten leiden tot een geringere overschatting van het risico. In deze analyse is dit gevalideerd door de berekende TU waarden te relateren aan de sterfte van de slijkgarnaal *Corophium volutator*, een van de soorten die ook gebruikt is voor het afleiden van de nieuwe MTR waarden voor de oliefracties. De resultaten lijken er op te wijzen dat het gebruik van de snel desorberende fractie (op basis van XAD) zou kunnen leiden tot een onderschatting van het risico. Waar een NOEC (of EC₁₀) verwacht zou worden bij TU=1, vinden wij een LC₅₀ bij TU=0,54. Ook voor de aparte stofgroepen is de LC₅₀ aanzienlijk lager dan de MTR (a. 40% van de MTR voor de fractie C10-C11 en ca. 19% van de MTR voor de fractie C12-C15). Het verschil in LC₅₀ tussen de fractie C10-C11 en C12-C15 is wel ongeveer een factor 10, net als voor de MTR.

De oorzaak voor dit verschil kan liggen in het feit dat de toxiciteit in de veldsedimenten niet alleen veroorzaakt wordt door de oliefracties, maar ook door andere stoffen. Dat andere stoffen een rol spelen is duidelijk, aangezien ook toxische effecten werden gevonden voor monsters waarin minerale olie niet in meetbare concentraties voorkwam. Voor de andere stoffen die in het Nader Onderzoek werden geanalyseerd kon echter geen relatie met de toxiciteit voor *C. volutator* worden aangetoond.

Ook moet worden opgemerkt dat de MTR is uitgedrukt op basis van standaard sediment met een organisch stofgehalte van 10%. De snel desorberende gehalten uit het Nader Onderzoek zijn uitgedrukt op totaal sediment, omdat slechts van enkele monsters de organisch stofgehalten zijn bepaald. Hiervoor corrigeren levert geen wezenlijk ander beeld op. Wel valt op dat alle monsters waarin het organisch stofgehalte lager was dan 10% significante sterfte vertonen (>60%), terwijl de sterfte op de monsters waarin het organisch stof gehalte groter was dan 10% niet significante was (<20%).

Niettemin staande het feit dat de toxiciteit op basis van het snel desorberend gehalte mogelijk onderschat wordt, is wel duidelijk dat de sterfte altijd significant is (>20%), als de TU voor de fracties C10-C15 groter is dan 1. Dat de sterfte in dergelijke gevallen meestal ook meteen 75-100% bedraagt is mogelijk te wijten aan andere (niet geanalyseerde) stoffen.

5 Literatuur

Arcadis (2006): Nader onderzoek Jan van Riebeeckhaven e.o. Amsterdam. Arcadis 110302/OF6/000963/LB.

Beek M., J. Pijnenburg & H. Zweers (2007): Waterbodem geanalyseerd op olie. Nieuw voorgestelde methode versus oude methode.
RWS WD Rapport 2007.001

Cornelissen G. & G.E. Kamerling (2003): Wat anders? Ecotoxicologische risico's en waterbodem normen. RWS Waterbodems Advies en Uitvoering. Notitie WAU.OWD-3-03013.

Rotteveel S., M.A.A.J. Kamps, J.L. Maas & M.A. Beek (2002): De toxiciteit van minerale olie in zoete sedimenten. Bioassays met *Chironomus riparius* (muggelarve) en *Plectus acuminatus* (nematode).
RWS RIZA werkdocument 2002.136x.

Scholten M.C.Th., S.L. Huwer, E.M. Foekema, H.P. van Dokkum, C.C. Karman & R.J.B. Peters (1997): Pilot study on the dose-effect responses of petroleum hydrocarbons in sediments (SLURP*olie). Final report.
TNO report R97/420.

Sokal R.R. & F.J. Rohlf (1995): Biometry: The principles and practice of statistics in biological research.
W.H. Freeman and Company, New York. 3rd ed.

Verbruggen E.M.J. (2004): Environmental Risk Limits for Mineral Oil (Total Petroleum Hydrocarbons).
RIVM report 601501021

Verbruggen E.M.J., M. Beek, J. Pijnenburg & T.P. Traas (2008): Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations.
Environmental Toxicology and Chemistry 27(12):2436-2448.

6 Verantwoording

Rapport C008/09

Projectnummer: 199.73029.01

Verantwoording

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van Wageningen IMARES.

Akkoord: Drs. J.H.M. Schobben
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 29 januari 2009

Akkoord: Drs. J.H.M. Schobben
Afdelingshoofd Milieu

Handtekening:



Datum: 29 januari 2009