

TBT-gehalten en effecten bij de Gewone Alikruik, de Gevlochten Fuikhoorn en de Purperslak langs de Nederlandse kust in 2011

M. Hoek-van Nieuwenhuizen en J. Jol

Rapport C120/11 [Vertrouwelijk, na 6 maanden
openbaar]



IMARES Wageningen UR

Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies

Opdrachtgever:

Rijkswaterstaat Waterdienst
M. van der Weijden
Postbus 17
8200 AA Lelystad

Publicatiedatum:

24 oktober 2011

IMARES is:

- een onafhankelijk, objectief en gezaghebbend instituut dat kennis levert die noodzakelijk is voor integrale duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van de zee en kustzones;
- een instituut dat de benodigde kennis levert voor een geïntegreerde duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van zee en kustzones;
- een belangrijke, proactieve speler in nationale en internationale mariene onderzoeksnetwerken (zoals ICES en EFARO).

P.O. Box 68	P.O. Box 77	P.O. Box 57	P.O. Box 167
1970 AB IJmuiden	4400 AB Yerseke	1780 AB Den Helder	1790 AD Den Burg Texel
Phone: +31 (0)317 48 09 00	Phone: +31 (0)317 48 09 00	Phone: +31 (0)317 48 09 00	Phone: +31 (0)317 48 09 00
Fax: +31 (0)317 48 73 26	Fax: +31 (0)317 48 73 59	Fax: +31 (0)223 63 06 87	Fax: +31 (0)317 48 73 62
E-Mail: imares@wur.nl	E-Mail: imares@wur.nl	E-Mail: imares@wur.nl	E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl	www.imares.wur.nl	www.imares.wur.nl	www.imares.wur.nl

© 2011 IMARES Wageningen UR

IMARES is onderdeel van Stichting DLO
KvK nr. 09098104,
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart 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 uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1-V12.1

Samenvatting

Sinds 2005 analyseert IMARES in opdracht van Rijkswaterstaat (RIKZ, later de Waterdienst) het voorkomen van intersex bij de Gewone Alikruiken (*Littorina littorea*) die op vaste locaties langs de Nederlandse kust verzameld worden. Het doel van dit onderzoek is effecten van verontreiniging met organotinverbindingen vast te stellen.

Gewone Alikruiken zijn in vergelijking met andere gastropoden echter vrij ongevoelig voor TBT. In overleg met de opdrachtgever zijn in 2011 naast de Gewone Alikruiken ook Gevlochten Fuikhoorns (*Nassarius reticulatus*) en Purperslakken (*Nucella lapillus*) verzameld. De Gevlochten Fuikhoorns zijn verzameld tijdens de schelpdierbemonsteringen die IMARES in opdracht van het Ministerie van EL&I uitvoert. Voor de Purperslakken is een aparte bemonstering, speciaal voor dit onderzoek, uitgevoerd. Bij de Gevlochten Fuikhoorn en de Purperslak resulteert TBT in imposex verschijnselen, een gevoeligere parameter dan intersex.

Bij de Gewone Alikruik werden op geen van beide onderzochte locaties intersex verschijnselen aangetroffen. Bij de Gevlochten Fuikhoorn werd bij 4 van de 5 monsters in de Noordzee kustzone een lichte mate van imposex geconstateerd (Stadium 1a). Bij de Purperslak werd op alle drie de locaties een lichte mate van imposex geconstateerd (Stadium 1a) en op 1 locatie (Brouwersdam, GREVLGKZNE) werd een vrouwtje met stadium 4 (vorming vas deferens, met penis ontwikkeling) aangetroffen.

Op basis van de imposex-resultaten bij de Gevlochten Fuikhoorn en de Purperslak, vallen alle onderzochte monsters in OSPAR Assessment Class A (VDSI Purperslak $<0,3$) of Class A/B (VDSI Gevlochten Fuikhoorn $<0,3$).

In alle bemonsterde dieren zijn organotin-gehalten geanalyseerd. In geen enkel monster werden meetbare concentraties Phenyltin-verbindingen aangetroffen. Ook de Butyltin-gehalten waren in alle gemeten slakken laag. Er was geen aantoonbare relatie tussen gehalten en de mate van de effecten, zowel de organotingehalten als de intersex/imposex indices waren in alle gevallen laag.

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1 Inleiding	5
2 Methode	6
2.1 Intersex en imposex	7
2.2 Chemische analyses	9
3 Resultaten	10
3.1 Intersex Gewone Alikruiken	11
3.2 Imposex Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken	11
3.3 Organotin gehalten	13
4 Discussie en conclusie	15
5 Kwaliteitsborging	16
Referenties	17
Verantwoording	18
Bijlage 1. Resultaten intersex analyse Gewone Alikruiken	19
Bijlage 2. Resultaten imposex analyse Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken	20
Bijlage 3. Gehalten aan organotinverbindingen in Gewone alikruiken, Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken 2011 in µg/kg nat gewicht	21
Bijlage 4.1 Resultaten referentiematerialen	22
Bijlage 4.2 Resultaten ringonderzoek Quasimeme in biota (labcode: Q127A IMARES)	23
Bijlage 4.3 Rapportagegrenzen en meetonzekerheid	24

1 Inleiding

Sinds 2005 analyseert IMARES het voorkomen van intersex bij Gewone Alikruiken (*Littorina littorea*) die op vaste locaties langs de Nederlandse kust verzameld worden. Het doel van dit onderzoek is effecten van verontreiniging met organotinverbindingen, specifiek tributyltinverbindingen (TBT), vast te stellen. De uitvoering geschiedt volgens het Projectplan chemisch meetnet MWTL 2011; Monitoren van Biologische effecten in mariene slakken, auteur M.H. van der Weijden, van 24 augustus 2011, hetgeen een vervangend projectplan was van het projectplan dat bij de aanvraag van de opdracht was toegevoegd.

Gewone Alikruiken zijn algengrazers en in vergelijking met andere gastropoden vrij ongevoelig voor TBT. Blootstelling aan TBT kan leiden tot intersex, een afwijking waarbij de vrouwelijke genitaliën vergroeien tot mannelijke genitaliën. Bij roofslakken resulteert blootstelling aan TBT in imposex. Hierbij ontwikkelen de vrouwtjes naast normale vrouwelijke genitaliën, ook mannelijke genitaliën, die uiteindelijk de oviduct (eileider) blokkeren, wat leidt tot steriliteit (en sterfte) (Bauer *et al.*, 1995). Imposex treedt al bij veel lagere TBT-gehalten op dan intersex.

De Purperslak (*Nucella lapillus*) is een van de gevoeligste soorten met betrekking tot TBT. Deze soort komt voor in de Zeeuwse wateren en vertoont voldoende variatie in imposex om een realistisch onderscheid te kunnen maken tussen locaties met betrekking tot de TBT belasting (Kaag & Jol, 2007). Door de beperkte verspreiding is deze soort echter niet geschikt om als indicatorsoort voor de gehele Nederlandse kustzone te dienen.

Een alternatief is de Gevlochten Fuikhoorn (*Nassarius reticulatus*). Deze soort wordt sinds enkele jaren steeds talrijker aangetroffen tijdens de jaarlijkse schelpdierssurveys die IMARES in opdracht van het Ministerie van EL&I uitvoert in de Nederlandse wateren. Ook de Gevlochten Fuikhoorn vertoont imposex en is gevoeliger dan de Gewone Alikruik, maar niet zo extreem gevoelig als de Purperslak (Stroben *et al.*, 1992a; Bryan *et al.*, 1993; Oehlmann *et al.*, 1996). In 2009 zijn daarom niet alleen Gewone Alikruiken verzameld op de standaardlocaties, maar zijn ook op vijf locaties Gevlochten Fuikhoorns verzameld (Kaag *et al.*, 2009). De keuze van de locaties was van te voren alleen globaal bepaald (monding Westerschelde, monding Europoort en voor de kust van Noord-Holland), aangezien niet bekend was waar de aantallen hoog genoeg zouden zijn voor het verzamelen van een voldoende groot monster. Het bemonsteringsplan voor 2010 was geënt op de resultaten van 2009. Tijdens de bemonstering in 2011 is naast de Gewone Alikruik en de Gevlochten Fuikhoorn, tevens de Purperslak als indicatorsoort bemonsterd (Tabellen 2, 3 en 4).

2 Methode

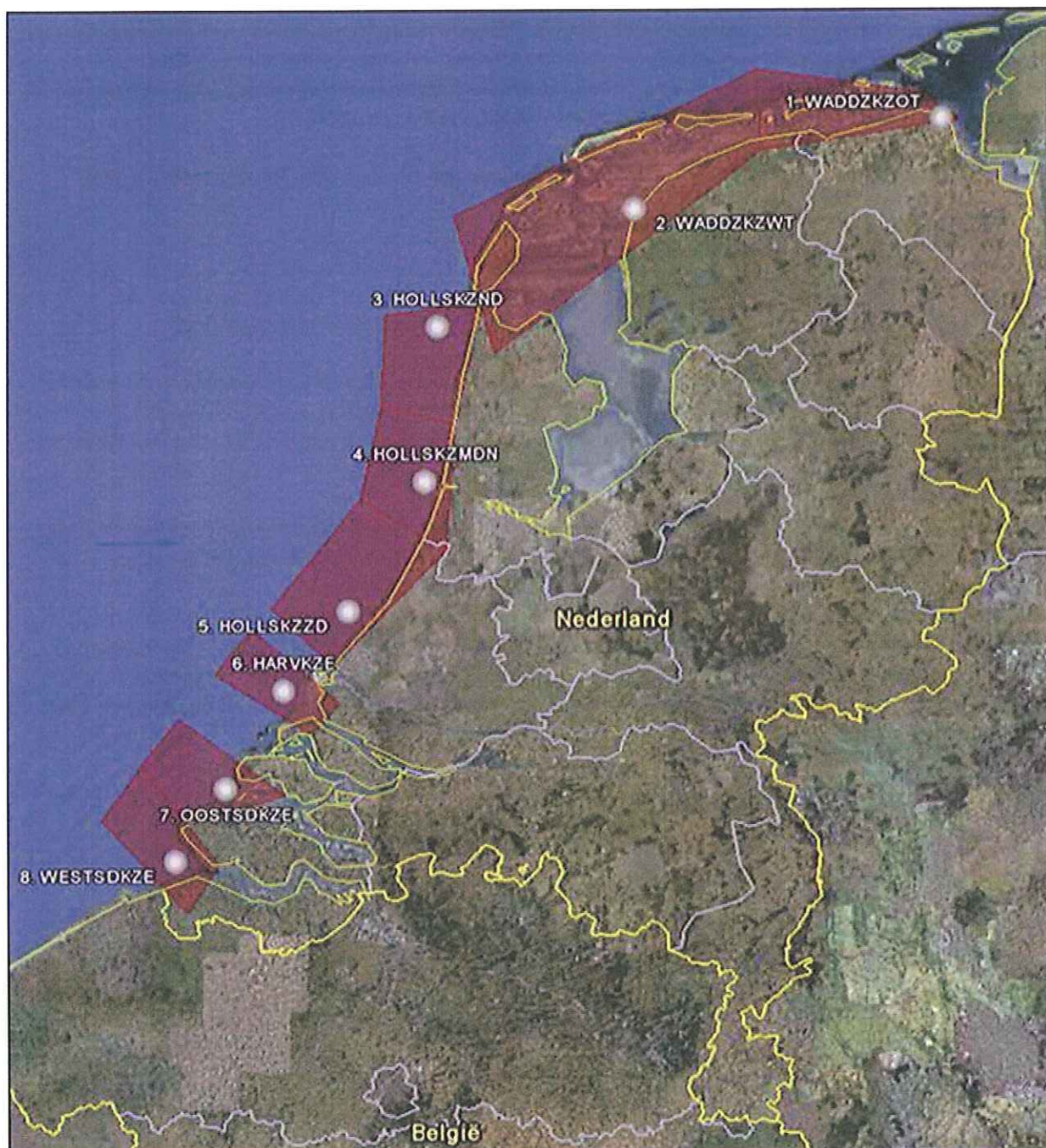
In een vooroverleg met de Waterdienst in april 2011 zijn voor de bemonstering van slakken 8 aandachtsgebieden gedefinieerd (Tabel 1). De bedoeling was dat in elk aandachtsgebied slechts 1 monster geanalyseerd zou worden, waarbij verschillende monsters uit de schelpdiersurvey samengevoegd konden worden, indien het aantal exemplaren per afzonderlijk monster te laag zou zijn. In de Zeeuwse Delta zouden eventueel Purperslakken gezocht worden langs dijken, indien de aantallen Gevlochten Fuikhoorns er, net als in 2010, te laag zouden zijn.

Tabel 1 Voorgestelde onderzoeklocaties waar de verschillende indicatorsoorten volgens projectplan 2011 bemonsterd dienen te worden (zie figuur 1 voor de ligging van de betreffende locaties)

Gebied	DONAR-code	Locatie	Soort
Waddenzee kustzone Oost	WADDZKZNOT	Eemshaven	Gewone Alikruik
Waddenzee kustzone West	WADDZKZNWT	Roptazijl	Gewone Alikruik
Hollandse kustzone Noord	HOLLSKZNND	Petten/Den Helder	Gevlochten fuikhoorn
Hollandse kustzone midden	HOLLSKZNMDN	Monding Noordzeekanaal	Gevlochten Fuikhoorn
Hollandse kustzone Zuid	HOLLSKZNZD	Scheveningen	Gevlochten Fuikhoorn
Haringvliet kustzone	HARVKZNE	Monding Haringvliet	Gevlochten Fuikhoorn
Oosterschelde kustzone	OOSTSDKZNE	Monding Oosterschelde	Gevlochten Fuikhoorn
Westerschelde kustzone	WESTSDKZNE	Monding Westerschelde	Gevlochten Fuikhoorn

In figuur 1 zijn de onderzoeklocaties met hun bijbehorende DONAR-codes voor 2011 weergegeven die door de opdrachtgever in het projectplan zijn voorgesteld. Helaas kwam dit nieuwe projectplan pas na afloop van de bemonsteringen beschikbaar.

Bij de Gewone Alikruiken wordt de mate van intersex vastgesteld en wordt het organotin-gehalte in het weefsel van de dieren bepaald. Bij de Gevlochten Fuikhoorns en de Purperslakken wordt de mate van imposex vastgesteld en wordt tevens het organotin-gehalte in het weefsel van de dieren bepaald.



Figuur 1 Voorgestelde onderzoekslocaties in 2011 (uit Projectplan 2011. NB. DONAR-codes zijn iets afwijkend van codes in Tabel 1 (in DIF de juiste codes uit tabel 1 aangehouden)).

2.1 Intersex en imposex

De uitvoering van de intersex- en imposex-analyses is respectievelijk gedaan in overeenstemming met de standaardvoorschriften RIKZ SPECIE-11 (Jol, 2004) en RIKZ SPECIE-12 (Jol, 2007).

Gewone Alikruiken werden op 21 juni 2011 verzameld, door handmatig op de dijk te rapen bij laag water, op twee Waddenzee locaties (Tabel 2). Op beide locaties zijn voldoende Gewone Alikruiken geraapt voor de analyse van minimaal 40 individuen op het voorkomen van intersex en chemische

analyse van de weefsels op organotin-verbindingen. De verzamelde Gewone Alikruiken zijn dezelfde dag gekoeld (koelbox met voldoende koelelementen) naar het laboratorium in Yerseke vervoerd.

Intersex bij Gewone Alikruiken kan in een gradueel systeem geclassificeerd worden, waarbij 4 stadia worden onderscheiden, lopend van 0 (geen effect) tot 3 (volledig steriliteit).

De ISI (intersex index) is het gemiddelde intersex stadium van de populatie. De ISI wordt als volgt bepaald:

ISI = som intersex stadia alle vrouwtjes/aantal vrouwtjes

Gevlochten Fuikhoorns werden tussen 13 april en 30 mei 2011 verzameld tijdens de WOT schelpdierbemonstering (Tabel 3).

Tijdens deze bemonstering worden de schelpdieren bemonsterd met de IMARES-bodemschaaf in raaien van 150 meter lang. De schaaft is 15 cm breed, zodat een totale oppervlak van 22,5 m² wordt bemonsterd. De verzamelde Gevlochten Fuikhoorns werden zo mogelijk nog dezelfde dag aan boord van het schip geanalyseerd.

Purperslakken werden op 8 februari 2011 verzameld tijdens een aparte bemonstering speciaal voor dit project (Tabel 4). Purperslakken bevinden zich in het intertijdegebied en worden bij laag water handmatig van de stenen geraapt.

De imposex-analyse in beide organismen is uitgevoerd conform Jol J. (2007). Imposex bij Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken kan in een gradueel systeem geclassificeerd worden, lopend van 0 (geen effect) tot 4 (Gevlochten Fuikhoorn) of 6 (Purperslak). Er zijn geen aanwijzingen dat bij de Gevlochten Fuikhoorn steriliteit optreedt (stadia 5 en 6).

De belangrijkste karakteristiek voor de populatie is de VDSI (Vas Deferens Sequence Index). Dit is het gemiddelde imposex stadium in de populatie. De VDSI wordt als volgt bepaald:

$$VDSI = \frac{\sum (\text{intersex stadia van alle vrouwtjes})}{\text{totale aantal vrouwtjes}}$$

Daarnaast kan ook de Relative Penis Size worden uitgedrukt in een index (RPSI). De RPSI wordt als volgt bepaald:

$$RPSI = \frac{(\text{gemiddelde lengte van de penis van alle onderzochte vrouwtjes})^3}{(\text{gemiddelde penislengte van alle mannetjes})^3} \times 100$$

Alle onderzochte dieren zijn voorbehandeld voor de analyse op organotin verbindingen. Deze voorbehandeling bestaat uit het zoveel mogelijk verwijderen van de schaal en operculum, schoonspoelen en invriezen. De ingevroren monsters zijn naar het laboratorium van IMARES in IJmuiden gebracht voor analyse op organotin-gehalten.

2.2 Chemische analyses

Voor elk monster is van de weefsels van alle onderzochte slakken op intersex en imposex een mengmonster gemaakt t.b.v. organotinanalyses.

Onderstaande stoffen zijn geanalyseerd en gerapporteerd als gehalte Sn of kation. In het rapport zullen verder de volgende afkortingen gebruikt worden om de stof aan te duiden.

Stofnaam	Afkorting	CAS nummer
Tributyltin	TBT	688-73-3
Dibutyltin	DBT	1002-53-5
Monobutyltin	MBT	78763-54-9
Trifenyyltin	TPhT	668-34-8
Difenyyltin	DPhT	1011-95-6
Monofenyyltin	MPhT	2406-68-0

De volgende analysemethoden zijn toegepast:

Organotin:

Zes organotinverbindingen worden gerapporteerd (MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT en TPhT) als Sn en als kation. Bij deze methode wordt de extractie en derivatisering simultaan uitgevoerd. Een korte beschrijving van de methode is als volgt: Water gebufferd tot een pH 4-5 en een mengsel van azijnzuur en natrium acetaat, methanol en hexaan worden toegevoegd aan het monster. Na een continue toevoeging van natriumtetraethylboraat gedurende 15 minuten en continu roeren, wordt de pH boven de 12 gebracht met natriumhydroxide. De organische laag wordt d.m.v. centrifugeren gescheiden van de waterfase en het extract wordt gefractioneerd over een aluminiumoxide kolom. De stoffen worden, na concentratie van het monster, met behulp van GC-MS geanalyseerd (SIM mode).

De analyse van organotinverbindingen is door de Raad voor Accreditatie opgenomen bij de geaccrediteerde verrichtingen op hun website (geldig van 21/12/2010 t/m 01/04/2013). De componenten TBT en DBT zijn geaccrediteerd (testlaboratoriumnummer L097, verrichting nummer 8).

Droge stof:

Voor de bepaling van het droge stofgehalte wordt het gewogen monster gemengd met een oppervlakte vergrotende stof, vervolgens gedroogd in een stoof (105 °C, 3 uur) en na afkoelen in een exsiccator teruggewogen.

De methode is geaccrediteerd door de Raad voor Accreditatie (testlaboratoriumnummer L097, verrichting nummer 2).

De volgende Interne Standaard Werkvoorschriften (ISW) zijn gebruikt:

Organotin	ISW 2.10.3.024 Biota en milieumatrices: "Bepaling van Organotin met behulp van GC-MS"
Vochtgehalte	ISW 2.10.3.011 "Visserijproducten. Bepaling van het gehalte aan vocht (droogstoofmethode)"

3 Resultaten

In de tabellen 2, 3 en 4 zijn de exacte posities aangegeven waar in 2011 Gewone Alikruiken, Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken bemonsterd zijn. Tevens zijn de bemonsterdata, locatienamen en de bijbehorende DONAR locatiecodes weergegeven.

Tabel 2 Datum van bemonstering Gewone Alikruiken en exacte posities in de monstergebieden

Datum	Locatienaam	DONAR-code	Coördinaten (WGS84)		Coördinaten (format DIA)	
			E	N	X	Y
21/06/2011	Waddenzee kustzone Oost	WADDZKZNOT	006°50.20'	53°27.10'	006502000	053271000
21/06/2011	Waddenzee kustzone West	WADDZKZNWT	005°26.20'	53°12.60'	005262000	053126000

Tabel 3 Datum van bemonstering Gevlochten Fuikhoorns en exacte posities in de monstergebieden

Datum	Locatienaam	DONAR-code	Coördinaten (WGS84)		Coördinaten (format DIA)	
			E	N	X	Y
14/04/2011	Hollandse kustzone midden	HOLLSKZNMDN	004°32.50'	52°34.00'	004325000	052340000
26/04/2011	Hollandse kustzone Zuid	HOLLSKZNZD	004°20.00'	52°14.00'	004200000	052140000
13/04/2011	Hollandse kustzone Zuid	HOLLSKZNZD	004°00.00'	52°10.00'	004000000	052100000
30/05/2011	Hollandse kustzone Zuid	HOLLSKZNZD	004°02.50'	52°06.00'	004025000	052060000
19/05/2011	Westerschelde kustzone	WESTSDKZNE	003°12.30'	51°41.10'	003123000	051411000

Tabel 4 Datum van bemonstering Purperslakken en exacte posities in de monstergebieden

Datum	Locatienaam	DONAR-code	Coördinaten (WGS84)		Coördinaten (format DIA)	
			E	N	X	Y
08/02/2011	Brouwersdam	GREVLGKZNE	003°49.60'	51°45.30'	003496000	051453000
08/02/2011	Neeltje-Jans	OOSTSDKZNE	003°40.60'	51°37.40'	003406000	051374000
14/06/2011	Domburg	WESTSDKZNE	003°29.00'	51°33.70'	003290000	051337000

Bij de bemonstering is enigszins afgeweken van de oorspronkelijke voorgestelde locaties uit het projectplan.

De locaties Hollandse kustzone Noord (HOLLSKZNND) en Haringvliet kustzone (HARVKZNE) zijn niet bemonsterd, aangezien hier geen slakken werden aangetroffen. Aangezien op de locatie Haringvliet kustzone geen slakken werden aangetroffen, zijn op een niet gevraagde locatie Brouwersdam, waaraan de opdrachtgever de nieuwe DONAR-code GREVLGKZNE heeft toegekend (e-mail 25/08/2011), Purperslakken bemonsterd. Tevens zijn extra op de locaties Neeltje-Jans (OOSTSDKZNE) en Domburg (WESTSDKZNE) Purperslakken bemonsterd.

Op de DONAR-locatie WESTSDKZNE zijn zowel Gevlochten Fuikhoorns als Purperslakken bemonsterd.

In totaal zijn er dus 10 monsters genomen, afkomstig van 7 verschillende DONAR-locaties.

De resultaten van alle 10 afzonderlijke monsters worden zowel in dit rapport als in de DIF t.b.v. ICES gerapporteerd, zoals overeengekomen in e-mail 28/09/2011.

3.1 Intersex Gewone Alikruiken

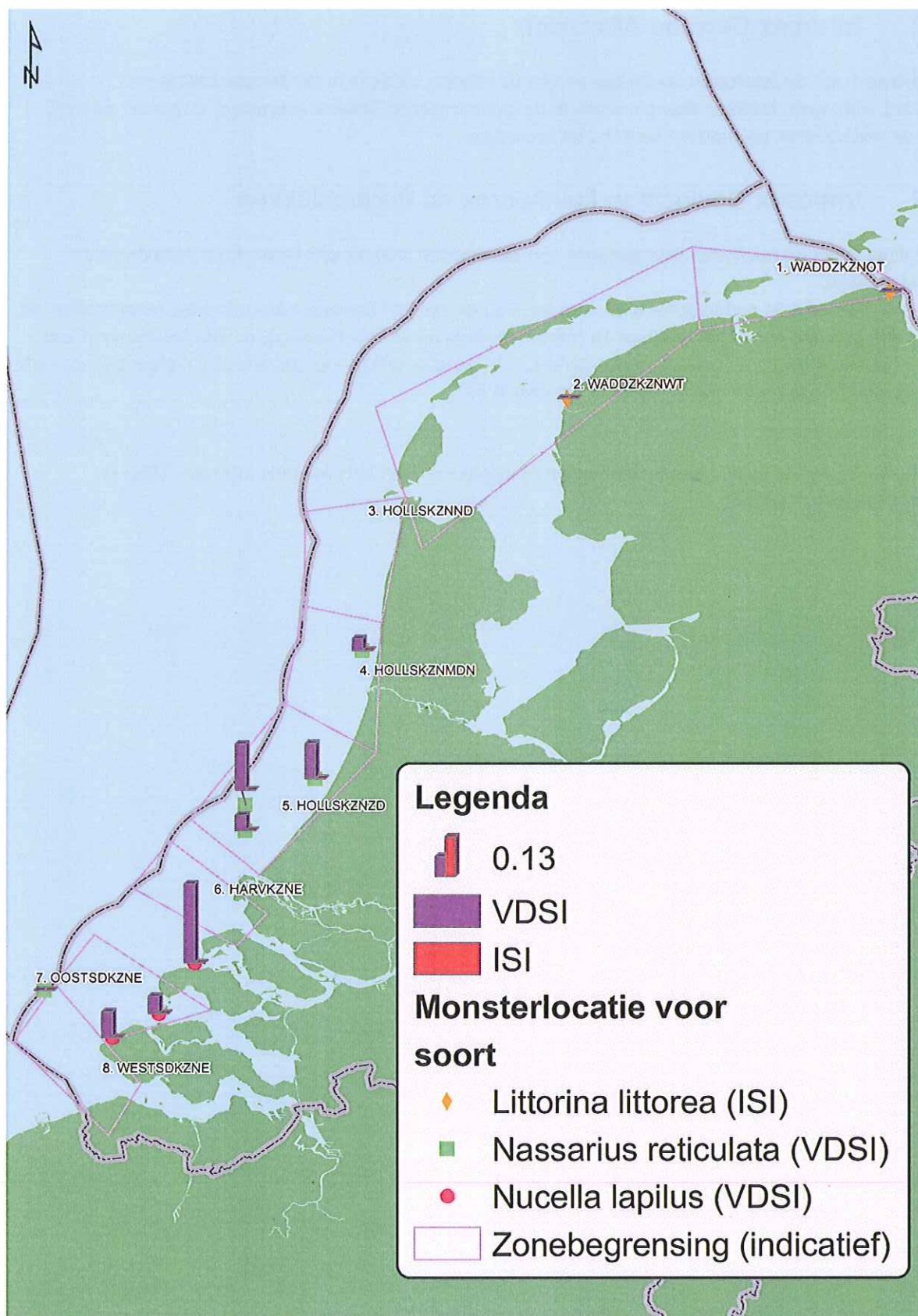
In bijlage 1 zijn de resultaten weergegeven van de intersex analyse in de Gewone Alikruiken. In 2011 werd geen intersex waargenomen in de geanalyseerde Gewone Alikruiken. Ongeveer de helft van de onderzochte exemplaren bestond uit vrouwtjes.

3.2 Imposex Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken

In bijlage 2 zijn de resultaten weergegeven van de imposex analyse van Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken.

In zeven van de acht onderzochte monsters werd bij de slakken imposex verschijnselen aangetroffen. In bijna alle gevallen betrof het stadium 1a (eerste stadium penis ontwikkeling), op één locatie werd een vrouwtje met stadium 4 (vorming vas deferens, met penis ontwikkeling) aangetroffen. Meer dan de helft van de onderzochte exemplaren bestond uit vrouwtjes.

Zie figuur 2 voor de ligging van de bemonsterde locaties en hun bijbehorende intersex- (ISI) en imposexgegevens (VDSI).



Figuur 2 Bemonsterde onderzoekslocaties in 2011, inclusief ISI en VDSI.

3.3 Organotin gehalten

De resultaten vermeld in dit rapport zijn alleen van toepassing op de geanalyseerde monsters. De analyses van de organotinverbindingen en van droge stof zijn in september/oktober 2011 uitgevoerd. T.a.v. de resultaten voor de organotinverbindingen en droge stof kan opgemerkt worden dat ze voldoen aan de kwaliteitseisen, zoals genoemd in hoofdstuk 2 en in hoofdstuk 5 kwaliteitsborging. Er zijn geen afwijkingen van de kwaliteitscriteria geconstateerd, zoals gesteld in de geaccrediteerde werkvoorschriften. Aan alle gerapporteerde organotingehalten kan dan ook de kwaliteitswaardecode 0 (normale waarde) worden toegekend.

De resultaten van de analyses aan organotinverbindingen in Gewone Alikruiken, Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken zijn weergegeven in bijlage 3.

De Kaderrichtlijn Water hanteert een concept biotanorm voor het TBT-kation van 230 µg/kg op productbasis. Dit betreft een Milieukwaliteitsnorm voor prioritaire stoffen voorgesteld door het Fraunhofer Instituut (CIS Data Sheets). Alle gemeten gehalten liggen ver beneden deze norm. Het hoogste gehalte was voor het TBT-kation (6.8 µg/kg) gemeten in Gevlochten Fuikhoorns afkomstig van de locatie HOLLSKZNZD bemonsterd op 26/04/2011. De gehalten tussen de drie monsters Fuikhoorns afkomstig van de locatie HOLLSKZNZD (bemonsterd op 3 verschillende data) varieerden van <0.7 – 6.8 µg/kg voor de component TBT-kation.

In bijlage 4.1 zijn de gemeten gehalten in een meegeanalyseerd referentiemateriaal weergegeven. Het betreft het gecertificeerde referentiemateriaal mosselen (CRM-CE477).

De door IMARES gemeten gehalten in dit monster worden voor de componenten TBT, DBT en MBT als kation binnen de 2s-grenzen van de gecertificeerde waarden teruggevonden en kunnen dus als goed gekwalificeerd worden. Voor de overige organotincomponenten zijn geen gecertificeerde waarden vastgesteld voor dit CRM.

In bijlage 4.2 zijn de resultaten van deelname aan Quasimeme ringonderzoeken weergegeven. Indien een z-score de kwalificatie 'unsatisfactory' heeft gekregen wordt daarop, vastgelegd in ons kwaliteitssysteem, adequaat actie ondernomen. De betekenissen van de kwalificaties, zoals door Quasimeme toegekend, zijn als volgt:

Satisfactory:	$ Z < 2$, resultaat voldoet
Unsatisfactory:	$ Z > 3$, resultaat voldoet niet (adequate actie vereist)
Questionable:	$ Z < 3$, resultaat is twijfelachtig (geen actie vereist)
Consistent:	er is een waarde (x) < rapportagegrens door het deelnemend lab gerapporteerd, deze waarde was in overeenstemming met de assigned value (consensus waarde), bv. < 0.03 gerapporteerd, terwijl assigned value 0.02 is
Inconsistent:	er is een waarde (x) < rapportagegrens door het deelnemend lab gerapporteerd, deze waarde was niet in overeenstemming met de assigned value (consensus waarde), bv. < 0.03 gerapporteerd, terwijl assigned value 0.06 is
Blanc:	geen z-score bepaald door Quasimeme (mogelijke oorzaken: te weinig laboratoria hebben resultaten gerapporteerd of de spreiding van de resultaten tussen de laboratoria onderling was te groot)

De resultaten van ronde 62 en 64 zijn gerapporteerd aan Quasimeme. Voor de meeste resultaten kon, vanwege statistische overwegingen door Quasimeme, geen Z-score berekend worden. Aan deze resultaten is de kwalificatie Blanc toegekend. De overige Z-scores voldeden aan het criterium $-2 < Z\text{-score} < 2$ voor de componenten TBT, DBT en MBT voor alle gemeten matrices en hebben de kwalificatie Satisfactory gekregen. Echter voor de component TBT in ronde 62 voor de matrix QSP035BT werd een Z-score berekend van 4.9 en in ronde 64 voor de matrix QSP037BT werd een Z-score berekend van 7.6, de kwalificatie hiervoor is Unsatisfactory.

In bijlage 4.3 zijn de rapportagegrenzen van de monsters weergegeven.

De OSPAR richtlijn voor de rapportagegrens voor TBT is 1 µg/kg nat gewicht uitgedrukt als Sn (OSPAR Agreement, 2009).

De rapportagegrenzen bij de toegepaste methode worden afgeleid van de laagste gemeten standaard.

Vanwege verschillen in ingewogen hoeveelheden worden verschillende rapportagegrenzen gerapporteerd.

Een compromis voor de rapportagegrenzen, berekend aan de hand van de gemiddelde inweeg van de monsters, is weergegeven in bijlage 4.3. De gerapporteerde rapportagegrens (0.3 µg/kg nat gewicht) voldoet aan bovengestelde richtlijn voor de rapportagegrens voor TBT (1 µg/kg nat gewicht).

De meeste TBT-gehalten liggen op of boven de rapportagegrens.

De RMS (root mean square) wordt berekend volgens NEN 7779 als basis voor de gecombineerde meetonzekerheid (standard uncertainty) uit de resultaten van verschillende ringonderzoeken (verschillende matrices) van meerdere rondes ($n > 8$). De relatieve uitgebreide meetonzekerheid (expanded uncertainty) is gedefinieerd als twee maal de relatieve standard uncertainty. De relatieve standard uncertainty is weergegeven in bijlage 2.3. Hierin zijn de reproduceerbaarheid, de tussenmonster-spreiding en de methode juistheid verwerkt. Eventuele inhomogeniteit van het monster is hier niet in verwerkt, maar is bij ringonderzoekmonsters niet van toepassing.

Voor de rapportage aan OSPAR dient bij iedere meetwaarde de expanded uncertainty (95% betrouwbaarheidsinterval) berekend te worden. De expanded uncertainty is gedefinieerd als tweemaal de standaard deviatie. Voor OSPAR dient dus een absolute meetonzekerheid gerapporteerd te worden. De berekening van de absolute expanded uncertainty is gebaseerd op onderstaande formules uit de OSPAR guideline voor de bepaling van de meetonzekerheid. De relative standard uncertainty (uitgedrukt in %) wordt door IMARES als maat voor de v_c gehanteerd. In bijlage 4.3 zijn zowel de relative standard uncertainty ($=v_c$) als de constant error ($=d_c$) opgenomen. Beide dienen als input in de formules voor de berekening van de absolute expanded uncertainty.

Formules uit de OSPAR guideline:

$$s_c = \sqrt{d_c^2 + \left(\frac{v_c}{100}\right)^2 C^2}$$

waarin:

S_c = standard deviation (eenheid = eenheid van concentratie component)

d_c = "combined constant error" (eenheid = eenheid van concentratie component)

v_c = variatie coëfficiënt (eenheid= percentage)

C = concentratie van de component in het monster (meetwaarde)

$$U_c = 2s_c$$

waarin:

U_c = (absolute) expanded uncertainty (eenheid = eenheid van concentratie component)

Voor componenten waarvoor geen deelname plaatsvindt aan ringonderzoeken is, indien mogelijk, de meetonzekerheid vastgesteld op basis van juistheidsbepaling en monsterinhomogeniteit. Voor componenten waarvoor zowel geen ringonderzoeken als geen referentiematerialen voorhanden zijn, kan de meetonzekerheid niet worden vastgesteld. Voor componenten waarvoor het aantal deelgenomen rondes aan ringonderzoeken minder bedraagt dan 8, kan nog geen meetonzekerheid worden vastgesteld volgens NEN 7779.

De componenten die met Q aangegeven zijn voldoen aan de kwaliteitskenmerken volgens ISO 19025.

4 Discussie en conclusie

Op geen van beide bemonsterde locaties werden intersex-verschijnselen gevonden bij de Gewone Alikruik. Door zijn geringere gevoeligheid vertonen de Gewone Alikruiken geen verschijnselen van intersex meer.

In 2009 zijn voor het eerst Gevlochten Fuikhoorns verzameld langs de Nederlandse kust. Deze vertoonden in beperkte mate verschijnselen van imposex (Kaag *et al.*, 2009). In 2010 en in 2011 werden wederom Gevlochten Fuikhoorns verzameld. Gepoogd werd zoveel mogelijk te verzamelen op locaties die ook in 2009/2010 bemonsterd waren. Ten zuiden van de Nieuwe Waterweg werden echter te weinig Gevlochten Fuikhoorns gevonden (hooguit 1 á 2 per locatie). Er is daarom voor gekozen hier Purperslakken te bemonsteren.

VDSI en RPSI van de Gevlochten Fuikhoorns waren op de drie locaties langs HOLLSKZNZD, duidelijk hoger dan bij de meer noordelijk gelegen locatie in HOLLSKZNMDN. Nog verder noordelijk werden dit jaar geen slakken aangetroffen, maar was de VDSI in 2009 en 2010 niet verhoogd. Ook voor de monding van de Westerschelde werd geen verhoogde VDSI aangetroffen in de Gevlochten Fuikhoorns. Bij de Purperslak werd op alle drie bemonsterde locaties een licht verhoogde VDSI vastgesteld. Bij Brouwersdam werd zelfs een vrouwtje met stadium 4 aangetroffen. Verder onderzoek op deze locatie in de komende jaren zou moeten uitwijzen of dit toevallig een oude dame was, of dat hier serieus nog iets speelt. Een assessment van de Purperslak in het gehele Deltagebied, hetgeen weliswaar geen verplichting is voor OSPAR, zou interessant kunnen zijn.

De VDSI van de Gevlochten Fuikhoorns valt bij alle locaties in OSPAR Assessment Class A/B (VDSI <0,3). (OSPAR, 2003; 2004). Dit is beter dan in 2009 en 2010 (Kaag *et al.*, 2009; 2010). Ook de VDSI van de Purperslak, een nog gevoeliger soort, wijst in deze richting. Ook voor deze soort is de VDSI altijd <0,3, waarmee de desbetreffende locaties Assessment Class A scoren. Deze laagste klasse duidt erop dat er geen TBT-effecten meer zijn (OSPAR, 2003; 2004).

Er zijn in dit onderzoek organotin-gehalten bepaald in het weefsel van alle op intersex en imposex geanalyseerde slakken. Alle organotingehalten zijn laag en liggen in dezelfde orde van grootte. Daarnaast zijn de vastgestelde VDSI's laag en duiden op geen effecten. Bij de bepaling van de organotingehalten in het monster Purperslakken afkomstig van de locatie WESTSDKZNE is de meting niet goed gegaan, om die reden zijn de gehalten in dat monster als niet bepaald opgegeven. Van de locatie WESTSDKZNE is echter ook een monster Gevlochten Fuikhoorns geanalyseerd.

5 Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 57846-2009-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2012. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Milieu over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 27 maart 2013 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie.

Om de kwaliteit van de analyses te garanderen participeert IMARES in de door QUASIMEME georganiseerde ringtesten betreffende imposex en intersex in mariene slakken (BE-1) en de analyse van organotinverbindingen in biota.

Referenties

- Bauer B., P. Fioroni, I. Ide, S. Liebe, J. Oehlmann, E. Stroben & B. Watermann (1995) TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: A possible indicator of tributyltin pollution. *Hydrobiologia* 309:15-27.
- Bryan G.W., G.R. Burt, P.E. Gibbs & P.L. Pascoe (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 73(4):913-929.
- Gibbs P.E., G.W. Bryan, P.L. Pascoe & G.R. Burt (1987) The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 67:507-523.
- Gibbs P.E. (1999) Biological effects of contaminants: Use of imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a bioindicator of tributyltin pollution. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 24.
- Jol J. (2004) Vaststellen van intersex bij de Gewone Alikruik (*Littorina littorea* L.). RIKZ standaardvoorschrift SPECIE-11.
- Jol J. (2007) Vaststellen van imposex bij de Purperslak (*Nucella lapillus* L.). RIKZ standaardvoorschrift SPECIE-12.
- Kaag N.H.B.M. & J. Jol (2007) Monitoring imposex bij de purperslak, *Nucella lapillus*, in de Zeeuwse wateren. IMARES rapport C112/07.
- Kaag N.H.B.M., J. Jol & M. Hoek-van Nieuwenhuizen (2009) TBT-gehalten en effecten bij de Gewone Alikruik (*Littorina littorea*) en de Gevlochten Fuikhoorn (*Nassarius reticulatus*) langs de Nederlandse kust in 2009. IMARES rapport C113/09.
- Kaag N.H.B.M., J. Jol & M. Hoek-van Nieuwenhuizen (2010) TBT-gehalten en effecten bij de Gewone Alikruik (*Littorina littorea*) en de Gevlochten Fuikhoorn (*Nassarius reticulatus*) langs de Nederlandse kust in 2010. IMARES rapport C130/10.
- Oehlmann J., E. Stroben, U. Schulte-Oehlmann, B. Bauer, P. Fioroni & B. Markert (1996) Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354(5-6):540-545.
- OSPAR (2003) Harmonisation of criteria for the assessment of TBT-specific biological effects. OSPAR MON 03/3/1-E.
- OSPAR (2004) Provisional JAMP Assessment Criteria for TBT - Specific Biological Effects. OSPAR Agreement 2004-15.
- OSPAR (2009) JAMP Guidelines for Contamination Specific Biological Effects. OSPAR Agreement 2008-09.
- Standaard voorschrift A646. Analyse van butyltin en phenyltin verbindingen in mosselen, RIKZ, Haren, 1999.
- Stroben E., J. Oehlmann & P. Fioroni (1992a) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Mar. Biol.* 114:289-296.
- Stroben E., J. Oehlmann & P. Fioroni (1992b) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): A potential indicator of tributyltin pollution. *Mar. Biol.* 113(4):625-636.
- Weijden, M.H. van der (2011). Projectplan chemisch meetnet MWTL 2011. Monitoren van Biologische effecten in mariene slakken, 24 maart 2011, RWS/Waterdienst.

Verantwoording

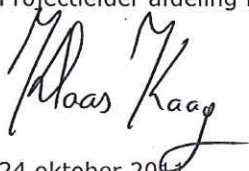
Rapport C120/11

Projectnummer: 4305108601

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

Akkoord: Dr. N.H.B.M. Kaag
Projectleider afdeling Milieu

Handtekening:



Datum: 24 oktober 2011

Akkoord: Drs. J.H.M. Schobben
Hoofd afdeling Milieu

Handtekening:

b/h



Datum: 24 oktober 2011

Bijlage 1. Resultaten intersex analyse Gewone Alikruiken

Intersex						monster datum	aantal onderzocht	aantal vrouwtjes	gemiddelde penislengte vrouwtjes	gemiddelde penislengte mannetjes	aantal vrouwtjes met intersex	stadium				
RQ-nummer	LIMSnr.	Monster soort	DONARcode	0	1							2	3	ISI		
RQ20110926/130	2011/1700	Gewone alikruiken	WADDZKZNOT			21/06/2011	40	20	n.b.	n.b.	0	20				0.00
RQ20110926/131	2011/1701	Gewone alikruiken	WADDZKZNWT			21/06/2011	40	22	n.b.	n.b.	0	22				0.00

Bijlage 2. Resultaten imposex analyse Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken

Imposex RQ-nummer	LIMSnr.	Monster soort	DONARcode	monster datum	aantal onderzocht	aantal vrouwtjes	gemiddelde penis lengte vrouwtjes	gemiddelde penis lengte mannetjes	aantal vrouwtjes met imposex	stadium				VDSI	RPSI
										0	1a	2	3b		
RQ20110926/132	2011/1702	Gevlochten Fuikhoorns	HOLLSKZNMD	14/04/2011	40	26	0.3000000	14.8750000	1	25	1			0.04	0.000820
RQ20110926/133	2011/1703	Gevlochten Fuikhoorns	HOLLSKZNZD	26/04/2011	40	26	0.4000000	10.5705882	3	23	3			0.12	0.005419
RQ20110926/134	2011/1704	Gevlochten Fuikhoorns	HOLLSKZNZD	13/04/2011	40	27	1.6875000	16.0153846	4	23	4			0.15	0.116982
RQ20110926/135	2011/1705	Gevlochten Fuikhoorns	HOLLSKZNZD	30/05/2011	41	20	0.4500000	14.6428571	1	19	1			0.05	0.002902
RQ20110926/136	2011/1706	Gevlochten Fuikhoorns	WESTSDKZNE	19/05/2011	33	18	0.0000000	14.7500000	0	18				0.00	0.000000
RQ20110926/137	2011/1707	Purperslakken	GREVLGKZNE	08/02/2011	40	21	2.1875000	3.9523810	2	19	1		1	0.24	16.953829
RQ20110926/138	2011/1708	Purperslakken	OOSTSDKZNE	08/02/2011	34	18	0.3750000	4.1953125	1	17	1			0.06	0.071417
RQ20110926/139	2011/1709	Purperslakken	WESTSDKZNE	14/06/2011	40	24	0.3000000	4.0406250	2	22	2			0.08	0.040928

Bijlage 3. Gehalten aan organotinverbindingen in Gewone alikruiken, Gevlochten Fuikhoorns en Purperslakken 2011 in µg/kg nat gewicht

RQnummer	LIMSnr.	Monster soort	DONARcode	Monster - datum	DBT Sn µg/kg	DBT kation µg/kg	DPHT Sn µg/kg	DPHT kation µg/kg	MBT Sn µg/kg	MBT kation µg/kg	MPHT Sn µg/kg	MPHT kation µg/kg	TBT Sn µg/kg	TBT kation µg/kg	TPHT Sn µg/kg	TPHT kation µg/kg	droge stof %
RQ20110926/130	2011/1700	Alikruik	WADDZKZNOT	21/06/2011	<0.4	<0.8	<0.3	<0.8	<0.4	<0.6	<0.4	<0.7	2.1	5.1	<0.2	<0.7	20.4
RQ20110926/131	2011/1701	Alikruik	WADDZKZNWT	21/06/2011	0.9	1.8	<0.3	<0.6	<0.3	<0.5	<0.3	<0.5	1.4	3.5	<0.2	<0.5	22.4
RQ20110926/132	2011/1702	Fuikhoorn	HOLLSKZNMD	14/04/2011	<0.4	<0.8	<0.3	<0.8	<0.4	<0.6	<0.4	<0.7	2.1	5.2	<0.2	<0.7	26.6
RQ20110926/133	2011/1703	Fuikhoorn	HOLLSKZNZD	26/04/2011	1.2	2.3	<0.4	<0.8	<0.5	<0.7	<0.4	<0.7	2.8	6.8	<0.2	<0.7	27.1
RQ20110926/134	2011/1704	Fuikhoorn	HOLLSKZNZD	13/04/2011	<0.3	<0.6	<0.3	<0.6	<0.3	<0.5	<0.3	<0.5	<0.3	<0.7	<0.2	<0.5	25.5
RQ20110926/135	2011/1705	Fuikhoorn	HOLLSKZNZD	30/05/2011	1.6	3.1	<0.4	<0.9	<0.5	<0.7	<0.4	<0.8	1.7	4.2	<0.3	<0.8	22.5
RQ20110926/136	2011/1706	Fuikhoorn	WESTSDKZNE	19/05/2011	<0.3	<0.5	<0.2	<0.6	<0.3	<0.5	<0.3	<0.5	0.5	1.2	<0.2	<0.5	27.5
RQ20110926/137	2011/1707	Purperslak	GREVLGKZNE	08/02/2011	<0.3	<0.7	<0.3	<0.7	<0.4	<0.6	<0.3	<0.6	1.4	3.4	<0.2	<0.6	28.4
RQ20110926/138	2011/1708	Purperslak	OOSTSDKZNE	08/02/2011	<0.3	<0.6	<0.3	<0.7	<0.4	<0.5	<0.3	<0.6	1.3	3.1	<0.2	<0.6	28.7
RQ20110926/139	2011/1709	Purperslak	WESTSDKZNE	14/06/2011	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	24.3

nb = niet bepaald

Bijlage 4.1 Resultaten referentiematerialen

Component	Referentiemateriaal	IMARES-waarde in 2011	n in 2011	IMARES-waarde QC-kaart	n totaal	ng/dg	gecertificeerde waarde	eenheid	kwalificatie
TBT als kation	CRM-CE477 (Mossel)	2346	2	2137	18	dg	2200 ± 190	µg/kg	goed
DBT als kation	CRM-CE477 (Mossel)	1571	2	1463	18	dg	1540 ± 120	µg/kg	goed
MBT als kation	CRM-CE477 (Mossel)	1617	2	1506	18	dg	1500 ± 280	µg/kg	goed
Vocht	haring/makreel IRM 2005/0775	69.97 ± 0.52	14	70.00 ± 0.52	120	ng	n.v.t.	%	goed

Bijlage 4.2 Resultaten ringonderzoek Quasimeme in biota (labcode: Q127A IMARES)

Exercise	Round	Period	Matrix	Determinand	Mean	Units	Z-score	Qualification
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	TBT	21.00	µg/kg	0.8	Satisfactory
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	DBT	2.570	µg/kg	0.9	Satisfactory
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	MBT	0.540	µg/kg		Blanc
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	TPhT	<0.070	µg/kg		Blanc
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	DPhT	<0.110	µg/kg		Blanc
904	62	jul-oct 2010	QSP034BT	MPhT	<0.130	µg/kg		Blanc

Exercise	Round	Period	Matrix	Determinand	Mean	Units	Z-score	Qualification
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	TBT	14.60	µg/kg	4.9	Unsatisfactory
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	DBT	10.70	µg/kg	1.3	Satisfactory
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	MBT	5.750	µg/kg	-1.0	Satisfactory
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	TPhT	<0.110	µg/kg		Blanc
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	DPhT	<0.160	µg/kg		Blanc
904	62	jul-oct 2010	QSP035BT	MPhT	<0.190	µg/kg		Blanc

Exercise	Round	Period	Matrix	Determinand	Mean	Units	Z-score	Qualification
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	TBT	21.00	µg/kg	2.3	Questionable
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	DBT	1.800	µg/kg	-0.7	Satisfactory
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	MBT	<0.200	µg/kg		Inconsistent
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	TPhT	<0.200	µg/kg		Blanc
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	DPhT	<0.200	µg/kg		Blanc
922	64	jan-april 2011	QSP036BT	MPhT	<0.200	µg/kg		Blanc
918	64	jan-mei 2011	QTM089BT	Droge stof	27.70	%	0.5	Satisfactory

Exercise	Round	Period	Matrix	Determinand	Mean	Units	Z-score	Qualification
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	TBT	3.600	µg/kg	7.6	Unsatisfactory
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	DBT	1.200	µg/kg	-0.4	Satisfactory
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	MBT	<0.300	µg/kg		Inconsistent
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	TPhT	<0.200	µg/kg		Blanc
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	DPhT	<0.200	µg/kg		Blanc
922	64	jan-april 2011	QSP037BT	MPhT	<0.300	µg/kg		Blanc
918	64	jan-mei 2011	QTM090BT	Droge stof	25.60	%	0.1	Satisfactory

Bijlage 4.3 Rapportagegrenzen en meetonzekerheid

Component	rapportage- grens	detectie- limiet	unit	ng/dg	V _c rel. standard uncertainty (%)	n	d _c (µg/kg)	Accreditatie
TBT als Sn	0.3		µg/kg	ng	15.4	2	0	Q
DBT als Sn	0.4		µg/kg	ng	16.1	4	0	Q
MBT als Sn	0.4		µg/kg	ng	nog niet vastgesteld, n<8	1		geen Q
TPhT als Sn	0.2		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
DPhT als Sn	0.3		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
MPhT als Sn	0.4		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
TBT als kation	0.8		µg/kg	ng	15.4	2	0	Q
DBT als kation	0.7		µg/kg	ng	16.1	4	0	Q
MBT als kation	0.6		µg/kg	ng	nog niet vastgesteld, n<8	1		geen Q
TPhT als kation	0.6		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
DPhT als kation	0.7		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
MPhT als kation	0.6		µg/kg	ng	niet vastgesteld			geen Q
droge stof	1	0.5	%	ng	3.73	45	0	Q
op basis van juistheidsbepaling en monsterinhomogeniteit								
verwaarloosbaar klein								
n = aantal ringonderzoeken aan de hand waarvan een Z-score bepaald kon worden								
d _c is de combined constant error in de eenheid van de concentratie van de component								
De rapportagegrens is berekend aan de hand van de gemiddelde inweeg van de monsters								