

Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard

1998b

Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard

1998b

in opdracht van	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad
------------------------	--

uitvoering	ing. J.M. Drüke, ir. J. Lahr, ing. D. van Hussen, ing. A. van Mullem, dr. J.F. Postma, ing. S. de Valk
namens opdrachtgever	E. Reinhold-Dudok van Heel

rapportnummer	code opdrachtgever	status
04.1248b	29293/IHO	Eindrapport



autorisatie	naam	paraaf	datum
opgemaakt	ir. J. Lahr		18-06-04
goedgekeurd	Dr. J.T. Meulemans		18-06-04

AquaSense

Kruislaan 411a
Postbus 95125
1090 HC Amsterdam
telefoon 020-5922244
telefax 020-5922249

Generaal Foulkesweg 72
6703 BW Wageningen
telefoon 0317-419039
telefax 0317-426151

Citeren als: AquaSense (2004). Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard 1998b - In opdracht van : Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad. Rapportnummer: 04.1248b.

© AquaSense - Het copyright van deze notitie is nadrukkelijk voorbehouden aan AquaSense. Niets uit dit rapport mag op enigerlei wijze worden vermenigvuldigd zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van AquaSense, noch mag het zonder dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander doel dan waarvoor het is vervaardigd. Het is de opdrachtgever toegestaan vrijelijk copieën van deze notitie te maken. Dit rapport is gedrukt op chloorvrij gebleekt papier. De omleg is gemaakt van PVC vrije

Inhoud

Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Methoden	5
2.1. Bemonstering en monstervoorbehandeling.....	5
2.2. Toxiciteitstesten	6
2.2.1. Acute test met de bacterie <i>Vibrio fischeri</i>	6
2.2.2. Chronische test met de watervlo <i>Daphnia magna</i>	7
2.2.3. Chronische test met de muggenlarve <i>Chironomus riparius</i>	8
2.2.4. Kwaliteitstesten testorganismen toxiciteitstesten.....	9
2.3. Bioaccumulatie test met oligochaeten.....	10
3. Resultaten en discussie	13
3.1. Bioassays.....	13
3.1.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden.....	13
3.1.2. Resultaten bioassays.....	14
3.2. Bioaccumulatie	17
3.3. Beoordeling volgens criteria TRIADE-benadering	17
4. Conclusies	21
5. Literatuur	23
Bijlagen	25

Samenvatting

In het uiterwaardengebied de Gamerense Waard worden in het kader van natuurontwikkeling nevengeulen gegraven. Het in dit rapport beschreven biotische onderzoek werd uitgevoerd om inzicht te krijgen in de mogelijke effecten van toxische stoffen op een viertal locaties in het gebied. Conform de TRIADE-richtlijn van het RIZA (Maas *et al.*, 1993) werden chronische bioassays uitgevoerd met watervlooien (*Daphnia magna*) en muggenlarven (*Chironomus riparius*) en acute testen met de bacterie *Vibrio fischeri* (Microtox®).

Er werden diverse biologische effecten in bioassays waargenomen. Met de natgemaakte droge bodem van W3N werd alleen een matig effect op *Daphnia magna* geconstateerd. In het sediment van W4N en O5Z was het effect op *D. magna* ernstig. Hierbij kwam, dat beide sedimenten een matig effect hadden op de bacterie *Vibrio fischeri* en dat O5Z tevens een matig effect veroorzaakte op de ontwikkeling van de muggenlarve *Chironomus riparius*. Het effect van O5Z op *D. magna* is mogelijk (mede) te verklaren door te lage zuurstofgehalten die veroorzaakt kunnen zijn door biologische afbraak van organische stof. De chemische analyses van dit sediment zouden deze interpretatie kunnen bevestigen. W3Z veroorzaakte geen eenduidige effecten.

De bioaccumulatie in oligochaeten was in alle vier de monsters het sterkst voor de metalen arseen, lood en nikkel. Ook minerale olie en EOX namen na blootstelling aan de vier sedimenten toe. Het (blanco) uitgangsmateriaal voor deze test bevatte reeds verhoogde concentraties koper, zink, PAK's en PCB's. Tijdens de test namen PAK's echter nog toe in de oligochaeten die werden blootgesteld aan het sediment van W3N en W4N. PCB's namen toe voor het monster O5Z.

Samenvattende beoordeling van de locaties op basis van de resultaten van bioassays (TRIADE-methode; Maas *et al.*, 1993). -: geen tot weinig effect/blootstelling; ±: matig effect/blootstelling; +: ernstig effect/hoge blootstelling.

Monster	Toxiciteit			Bioaccumulatie	Eindoordeel
	<i>V. fischeri</i>	<i>C. riparius</i>	<i>D. magna</i> *	oligochaeten	
W3Z (S)	-	-	-	+	+
W3N (S)	-	-	±	+	+
W4N (S/Z)	±	-	+	+	+
O5Z (S)	±	±	(+)**	+	+

* gebaseerd op de indicatieve resultaten (zie tabel 3.1 en tekst)

** oordeel “+” mogelijk (mede) veroorzaakt door lage zuurstofgehalten

1. Inleiding

In de Gamerense Waard is circa 1 jaar geleden een nevengeul gegraven. Op afzienbare termijn zal er nog een tweede geul worden aangelegd. Het in dit rapport beschreven biotische onderzoek werd uitgevoerd om inzicht te krijgen in de mogelijke effecten van toxische stoffen in de huidige en toekomstige waterbodems in het gebied.

Hiertoe werden 4 sublocaties bemonsterd. De toegepaste bioassays betreffen:

- acute toxiciteit van poriewater (afname bioluminescentie) bij de bacterie *Vibrio fischeri* (Microtox[®]),
- overleving en reproductie in een chronische test met poriewater en de watervlo *Daphnia magna*,
- ontwikkeling, groei en overleving van de muggenlarve *Chironomus riparius* in het onverdunde sediment, en
- een bioaccumulatie test met oligochaeten.

De uitkomsten van het in dit rapport beschreven onderzoek worden, voor zover mogelijk, beoordeeld volgens de TRIADE richtlijn (Maas *et al.*, 1993).

2. Methoden

2.1. Bemonstering en monstervoorbehandeling

Op 18 en 19 mei 1998 werden door Rijkswaterstaat 4 locaties in de Gamerense Waard bemonsterd zoals weergegeven in tabel 2.1.

Tabel 2.1 Bemonstering van het sediment in de Gamerense Waard.

monsterlocatie	ecolims-nummer	monster-datum	sediment-karakterisering (visueel)
W3Z	303700	19/05/'98	slib*
W3N	303701	19/05/'98	slib*
W4N	303702	19/05/'98	zand/slib
O5Z	303706	18/05/'98	zanderig slib

* vanwege laag vochtgehalte mogelijk beter te omschrijven als klei, maar, aangezien hiervoor geen referentiesediment bestaat, in dit rapport verder beschouwd en omschreven als slib.

De sedimentmonsters werden aangeleverd in een hoeveelheid van 40 of 50 liter in 10 liter polypropyleen emmers. Na binnenkomst werden de monsters geregistreerd, voorzien van een AquaSense monsternummer (ECOLIMSnummer) en tot gebruik gekoeld (4 °C) en donker opgeslagen.

2.2. Toxiciteitstesten

Volgens de TRIADE-benadering werden **chronische** bioassays met de muggenlarve *Chironomus riparius* en de watervlo (kreeftachtige) *Daphnia magna* uitgevoerd. De eerste soort betreft een sedimentbewonend (benthisch) organisme; de tweede soort een organisme dat in de waterkolom erboven leeft (pelagisch). Deze soorten werden op twee verschillende manieren blootgesteld: resp. via een sediment/water-systeem en via geïsoleerd poriewater. Poriewatertesten zijn in het algemeen goed bruikbaar voor het beoordelen van verontreinigde sedimenten omdat aangenomen wordt dat organismen in het sediment aan toxische stoffen worden blootgesteld via het poriewater.

Omdat sedimenten dermate verontreinigd kunnen zijn dat ook **acute** toxiciteit kan worden aangetroffen, werd conform de TRIADE-benadering ook een (acute) poriewatertest met de luminescerende bacterie *Vibrio fischeri* (Microtox[®]) uitgevoerd.

Voor gebruik in de bioassays werden de sedimentmonsters voorbehandeld. Het bovenstaande water werd verwijderd. De 4-5 emmers van ieder sedimentmonster werden vervolgens bij elkaar gevoegd, mechanisch geroerd met behulp van een mengapparaat en weer over de emmers verdeeld. Het monster van locatie W3N betrof een droge bodem. Om deze toch in de natte toestand te kunnen beoordelen is hieraan 2 delen “Dutch Standard Water” (DSW) per 1 deel droge bodem toegevoegd. Hierna is dit mengsel gedurende 24 op een rollerbank gehomogeniseerd. Dit leverde een kunstmatig (nat) sediment op, dat verder op dezelfde wijze is behandeld als de overige monsters.

Vlak voor het inzetten van de testen werden in het blanco- en het onverdunde testmedium (poriewater of boven het sediment staande water) de volgende fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten:

- zuurgraad (met pH-meter);
- zuurstofgehalte (met zuurstofelectrode);
- nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

In de chronische testen (*D. magna* en *C. riparius*) werden deze parameters ook éénmaal per week gedurende de testen gemeten.

Hieronder wordt per bioassay de werkwijze beschreven.

2.2.1. Acute test met de bacterie *Vibrio fischeri*

Door middel van centrifugeren werd poriewater gewonnen uit de voorbehandelde sedimentmonsters. Binnen 4 uur na winnen werd met dit poriewater de acute test met de bacterie *Vibrio fischeri* uitgevoerd

volgens NVN 6516 (1993) aangevuld met de TRIADE-methodebeschrijving (Maas *et al.*, 1993). In deze test werd met een lichtmeter (Microtox[®]) de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan de 4 volgende concentraties testmedium: 45, 22.5, 11.25 en 5.625 volume %. De test- en incubatietemperatuur bedroeg 15°C. De analyses werden in duplo uitgevoerd, waarna per blootstellingsduur één gemiddelde EC₂₀-waarde werd bepaald. De EC₂₀-waarden werden bepaald met behulp van de programmatuur en software behorende bij het Microtox-teststelsel.

De EC₂₀-waarde (Effect Concentratie) is gedefinieerd als de concentratie testmedium, waarbij na een gegeven blootstellingsduur een afname van 20% van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (= verdunningsmedium) kan worden waargenomen. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC₂₀-waarden, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster aan te geven.

2.2.2. Chronische test met de watervlo *Daphnia magna*

Door middel van centrifugeren werd poriewater gewonnen uit de voorbehandelde sedimentmonsters. Dit poriewater werd gefiltreerd over een 0,45 µm filter en tot gebruik hooguit 1 week gekoeld in het donker bewaard in afgesloten glazen potten. Het poriewater werd alleen belucht indien het zuurstofgehalte vlak voor gebruik lager was dan 3 mg/l (Maas *et al.*, 1993). Na beluchting werd nogmaals gemeten of voldaan werd aan dit criterium. Door verdunning met Elendt-medium¹ werden de volgende 4 concentraties poriewater aangemaakt: 10, 32, 56 en 100 volume %. Per concentratie werden 10 testvatjes gevuld met 50 ml testmedium. Als blanco-testmedium werd Elendt-medium gebruikt. In ieder testvatje werd daarna één watervlo (leeftijd < 24 uur) ingezet.

Gedurende de bioassay werd tweemaal per week het testmedium verversd, en werd het aantal geproduceerde jongen geteld en verwijderd. Het tellen en verwijderen van de jongen werd tevens éénmaal per week tussen de beide verversingen uitgevoerd. Dagelijks werd de overleving van de ingezette watervloien gecontroleerd, eventuele reproductie genoteerd en werd gevoerd met een *Scenedesmus*-algensuspensie. De testduur bedroeg minimaal 14 dagen en werd afgebroken op het moment dat in het blanco testmedium minimaal 3 broedsels waren voltooid.

Als maat voor de reproductiecapaciteit werd uit de "cohort life-table"² per poriewaterconcentratie de gemiddelde intrinsieke populatiegroeisnelheid (r_m) berekend (Maas *et al.*, 1993). Met name het

¹ Standaardmedium bestaande uit gedemineraliseerd water waaraan enkele zouten en vitaminen toegevoegd zijn. Dit medium wordt gebruikt bij het kweken van *D. magna*.

² Tabel met daarin het aantal nakomelingen per ingezet vrouwtje gedurende de test (zie tekst bij bijlage 7).

moment van eerste reproductie (eerste worp) en de aantallen nakomelingen per worp zijn bepalend voor deze parameter. Met het ToxCalc -pakket (Tidepool, 1993) werd getoetst of de verschillen in de gemiddelde r_m -waarden per concentratie significant waren ten opzichte van de bij die serie behorende blanco. Indien zelfs na transformatie van de r_m -waarden niet kon worden voldaan aan de randvoorwaarden voor het mogen uitvoeren van de Williams-test³, werd gebruik gemaakt van een verdelingsvrije (niet-parametrische) rangsom-test. Op basis van deze statistische analyse werd de NOECreproductie-waarde bepaald.

De NOECsterfte-waarde werd gelijk gesteld aan die testconcentratie waarbij ≤ 20 % sterfte optrad, indien sprake was van een trend in drie opeenvolgende verdunningen van poriewater (Maas *et al.*, 1993). Indien geen sprake was van een duidelijke trend in opeenvolgende verdunningen, werd de NOECsterfte vastgesteld aan de hand van de beschikbare informatie over het sterfteverloop binnen de geteste concentratiereeks. Tevens werd (indien mogelijk) de poriewaterconcentratie bepaald die 50% sterfte van de watervlooien gaf aan het einde van de test (LC50). Deze bepaling werd uitgevoerd met behulp van het LC50-programma van het RIZA gebaseerd op de parametrische methode van Kooijman (1981).

2.2.3. Chronische test met de muggenlarve *Chironomus riparius*

Voor deze test werd het benodigde sediment gezeefd over een 1 mm zeef. Met dit sediment werd een mengsel gemaakt bestaande uit 1 volumedeel sediment en 4 volumedelen DSW-medium ("Dutch Standard Water"). Na 24 uur schudden werden 4 testvatjes gevuld met 50 ml van dit mengsel. Van het mengselrestant werd na drie dagen bezinken het elutriaat gewonnen, waarmee drie testvatjes tot ca. 100 ml werden gevuld. Per testvatje met elutriaat werden ad random 2 halve eipakketten (maximaal 7 dagen oud) van *Chironomus riparius* ingezet. Na 4 dagen werd beoordeeld of beide eipakkethelften waren uitgekomen en werden de uitgekomen larven gevoerd met een 2% Trouvit-oplossing. Na 7 dagen werden uit het elutriaat individuen van het 2^e larvale stadium van *C. riparius* gehaald en werd geschat of meer dan 50% van de eieren was uitgekomen. Per testvatje met sediment/DSW-mengsel werden 25 van deze larven ingezet. Drie maal per week werden de testvatjes belucht en werd gevoerd met een 2% Trouvit-oplossing. Na 28 dagen werden de larven voorzichtig over een 250 μ m roestvrij stalen zeef uitgespoeld. Het aantal larven werd geteld en van de 4^e stadium (L4) larven werd vervolgens het gemiddelde drooggewicht bepaald.

³ Voorwaarden voor het mogen uitvoeren van deze test zijn: normaal verdeelde waarnemingen en homogeniteit van varianties. Normaliteit en homogeniteit worden met Toxcalc getest met behulp van respectievelijk de Shapiro-Wilk's en de Bartlett's test (Tidepool, 1993) uit het SPSS-softwarepakket (Norusis, 1992).

Als referentie voor de beoordeling van de sedimentmonsters werden zowel sedimenten uit het Drontermeer (slib) als uit het Veluwemeer (zand) getest. Bij gebrek aan gegevens over de korrelgrootteverdeling is de visuele karakterisering (tabel 2.1) gebruikt om het juiste referentie-sediment te selecteren. In geval van slib of zanderig slib werd getoetst t.o.v. de slibreferentie (S). Bij zand of slibachtig zand werd de zandreferentie gebruikt. De resultaten met sedimenten die als “zand/slib” werden gekarakteriseerd, zijn t.o.v. beide referentie-sedimenten getoetst.

Met behulp van een ANOVA-test werd getoetst of de waarnemingen voor een van de volgende parameters significant ($P \leq 0,05$) verschilde van de referentie:

- gemiddelde sterfte;
- gemiddelde larvale ontwikkeling;
- gemiddeld drooggewicht van de L4-larven.

Voor uitvoering van deze test werd gebruik gemaakt van het SPSS-softwarepakket (Norusis, 1992).

2.2.4. Kwaliteitstesten testorganismen toxiciteitstesten

Vibrio fischeri

Ter controle van de gevoeligheid van de bacterie *Vibrio fischeri* wordt regelmatig een test uitgevoerd met fenol als referentiestof. In deze test wordt de fenolconcentratie bepaald waarbij na 5 minuten blootstelling 20 % afname van de bioluminescentie t.o.v. de blanco kon worden waargenomen (5 min-EC₂₀ volgens NVN 6516, 1993).

De resultaten van de kwaliteitscontrole zijn weergegeven in tabel 2.2. De gevoeligheid van *V. fischeri* voor fenol viel binnen de gestelde acceptatieranges.

Tabel 2.2. Resultaten van de kwaliteitstest met *Vibrio fischeri* uitgevoerd met fenol als referentiestof.

	EC ₂₀ , 5 min. (mg fenol/l)
acceptatierange NVN 6516	3 - 10
testresultaat (26 mei 1998)	4,5

Daphnia magna en *Chironomus riparius*

De laboratoriumkweken van *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* van AquaSense worden periodiek onderworpen aan een gevoeligheidstest. In deze test wordt de kaliumdichromaat concentratie bepaald waarbij 50% van de watervlooien na 24 uur immobiel zijn (24u-EC₅₀ volgens ISO 6341, 1989), dan wel de concentratie waarbij 50% van de muggenlarven na 96 uur dood zijn (96u -LC₅₀) volgens Grootelaar & Mulder (1991).

De resultaten van de gevoeligheidscontrole van de AquaSense kweken zijn weergegeven in tabel 2.3. De gevoeligheden van *D. magna* en *C. riparius* voor kaliumdichromaat viel binnen de gestelde acceptatieranges.

Tabel 2.3. Resultaten van de kwaliteitstesten met *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* uitgevoerd m.b.v. kaliumdichromaat als referentiestof.

	<i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ , 24 uur (mg/l)		<i>Chironomus riparius</i> LC ₅₀ , 96 uur (mg/l)	
	K ₂ Cr ₂ O ₇	datum test	K ₂ Cr ₂ O ₇	datum test
acceptatie range ISO 6341	0,6 - 1,7	-	-	-
acceptatie range RIZA	-	-	20,0 - 75,0	-
testresultaat	1,41	8 juli 1998	42,7	29 juli 1998

2.3. Bioaccumulatietest met oligochaeten

De bioaccumulatietest is uitgevoerd volgens de RIZA-methode (Maas *et al.*, 1993). Per sedimentmonster werden twee sediment-watersystemen aangemaakt. Voor elk sediment-watersystemen werd hiertoe 1 liter nat sediment (gezeefd over 500µm) met 4 liter DSW gemengd. De sediment-watersystemen werden gedurende 24 uur geschud. Vervolgens is het mengsel gekoeld weggezet. Twee dagen voor de start van de bioaccumulatie-experimenten werd het mengsel uitgeschonken in aquaria, waarna het sediment bij 20°C kon bezinken. Tijdens het bezinken werd matig belucht.

De oligochaeten werden via de aquariumhandel verkregen. Voor het inzetten van de testen werd het levende materiaal gedurende 1 week in het laboratorium gespoeld onder een zacht lopende kraan met leidingwater. Gedurende deze periode werden de oligochaeten twee maal gevoerd met een 10% Trouvit-suspensie (%gewicht/volume, aangemaakt in milli-Q water) met een dosis van 10 mL suspensie per 150 gram natgewicht aan oligochaeten.

De tests zijn in duplo ingezet met ongeveer 20 gram natgewicht aan oligochaeten. De oligochaeten groeven zich vervolgens in het sediment in en zijn aldus blootgesteld aan de aanwezige verontreinigingen. De experimenten werden in afgedekte aquaria in het donker uitgevoerd bij een temperatuur van 20 ± 2°C. De aquaria werden permanent belucht. De verdampende hoeveelheid water werd twee maal per week met milli-Q water aangevuld. De oligochaeten zijn gedurende het experiment 3 keer per week gevoerd, waarbij per bak 1 ml van een 10% Trouvit-suspensie werd toegevoegd.

Gedurende de testen werden wekelijks de zuurgraad (pH), de temperatuur, het zuurstofgehalte, het nitriet- en ammoniumgehalte (met behulp van Merck-testkits) en de geleidbaarheid (met behulp van een

geleidbaarheidsmeter) (semi)-kwantitatief gemeten in het bovenstaande water.

De bioaccumulatie-experimenten werden na een blootstelling van 28 dagen beëindigd. De inhoud van de testsystemen werd met behulp van leidingwater kort over een 300 μm en vervolgens over een 500 μm zeef (met de 300 μm zeef eronder) gespoeld. De oligochaeten werden vervolgens op een 250 μm zeef gebracht, die was ondergedompeld in bovenstaand water afkomstig van het sediment-watersysteem. Dit systeem bleef vervolgens gedurende 24 uur staan, tijdens welke de oligochaeten door de zeef kropen en de laatste sediment resten op de zeef achterbleven. Het water werd hierbij belucht om sterfte van de oligochaeten te voorkomen. Na deze verwatering werd de natte opbrengst van alle duplo's gewogen. Vervolgens werd het biotisch materiaal uit de duplo's samengevoegd en gedurende 24 uur gevriesdroogd onder een hoog vacuüm bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Voor de chemische analyses werd het oligochaeten materiaal verdeeld over een glazen en een kunststof potje in de verhouding 3:2. De ingevroren oligochaetenmonsters zijn vervolgens aan OMEGAM te Amsterdam geleverd ten behoeve van chemische analyses.

De interne gehalten van een aantal stoffen werden vergeleken met de criteria uit de TRIADE-handleiding die zijn gebaseerd op de grens- en signaleringswaarden voor sedimenten en op BCF-waarden (Maas *et al.*, 1993). Wanneer deze criteria worden overschreden, dan bestaat er voor de betreffende stof een matig of hoog doorvergiftigingsrisico voor predatoren. De gegevens uit deze publicatie zijn inmiddels echter verouderd en dienen derhalve als niet meer dan een eerste indicatie te worden beschouwd.

3. Resultaten en discussie

3.1. Bioassays

3.1.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden

Geldigheidscriteria

De gehanteerde richtlijnen geven criteria aan voor de **geldigheid** van de bioassays. In bijlage 1 zijn deze criteria en de geconstateerde waarden per test weergegeven.

Bij de bioassays met *Vibrio fischeri* en *Chironimus riparius* werd voldaan aan alle betreffende geldigheidscriteria. Voor een van de twee blanco series met *D. magna* werd het criterium voor de variatiecoëfficiënt tussen het aantal geproduceerde jongen in de verschillende buizen overschreden. Dit was gemiddeld 34% i.p.v. <25% (gemiddelde van 2 series van 10 buizen). Deze blanco's zijn gebruikt voor W3Z, W3N en W4N.

Fysisch-chemische randvoorwaarden

Een overzicht van de resultaten van de semi-kwantitatieve controle van enkele fysische en chemische parameters (zie 2.2) worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius*, en de oligochaeten weergegeven in respectievelijk bijlage 2, 3, 4 en 5.

Door het RIZA (Maas *et al.*, 1993) zijn criteria (**randvoorwaarden**) voor deze parameters opgesteld. Wanneer gedurende de bioassays wordt voldaan aan deze randvoorwaarden, worden géén negatieve effecten van deze parameters verwacht. De randvoorwaarden voor deze parameters worden eveneens vermeld in de genoemde bijlagen.

Acute test met *Vibrio fischeri* (bijlage 2)

Voor alle monsters kon worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

Chronische test met *Daphnia magna* (bijlage 3)

Uit de resultaten blijkt dat vlak voor verversing in het oude testmedium van twee monsters de randvoorwaarde (>34,3%) voor zuurstof enkele malen niet werd gehaald. Voor W4N gebeurde dit op dag 3 in de twee hoogste concentraties en was er slechts sprake van een klein verschil met het criterium. In de verdunningsserie van O5Z werden regelmatig te lage zuurstofgehalten waargenomen. Eventueel waargenomen negatieve effecten op de watervlooiën kunnen vooral bij dit laatste monster mogelijk (mede) veroorzaakt zijn door een te laag zuurstofgehalte.

Aan de randvoorwaarden die zijn gesteld voor de andere parameters, werd door alle monsters gedurende de gehele test voldaan.

Chronische test met *Chironomus riparius* (bijlage 4)

Voor alle monsters kon worden voldaan aan de voor het elutriaat en het bovenstaande water gestelde randvoorwaarden.

Bioaccumulatie-experiment met oligochaeten (bijlage 5)

Voor alle monsters kon worden voldaan aan de voor het bovenstaande water gestelde randvoorwaarden.

3.1.2. Resultaten bioassays

De "ruwe" testresultaten van de bioassays worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* weergegeven in respectievelijk bijlage 6, 7 en 8.

De resultaten zijn beknopt samengevat in tabel 3.1.

Acute test met *Vibrio fischeri*

Voor W4N en O5Z werd een negatief effect ($EC_{20} < \text{hoogste testconcentratie}$) op *V. fischeri* waargenomen. Het sterkste effect (laagste EC_{20} -waarde = grootste remming van de bioluminescentie) werd gevonden na 5 minuten blootstelling.

Tabel 3.1. Resultaten van de bioassays (d.w. = drooggewicht; n.v.t. = niet van toepassing). Grijsze arceringen geven aan waar (significante) negatieve effecten worden waargenomen. Waar sprake is van een ernstige overschrijding van de randvoorwaarden zijn de gegevens cursief weergegeven.

	Acuut		Chronisch						
organisme	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Daphnia magna</i>			<i>Chironomus riparius</i>			
testduur	5, 15 en 30 minuten		14-17 dagen			28 dagen			
effect-parameter	laagste EC ₂₀ (vol. %)	na ... minuten	NOEC reproductie (vol. %)	NOEC sterfte (vol. %)	LC ₅₀ (vol. %)	sterfte (%)	% larven in stadium L2, L3 of dood	d.w L4-larven (mg)	% t.o.v. referentie
slib-referentie	n.v.t.		n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	3	19	0,34	n.v.t.
zand-referentie	n.v.t.		n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	10	20	0,45	n.v.t.
W3Z (S)	>45	-	n.b./100	n.b./100	>100	4	35	0,40	+19,4(S)
W3N (S)	>45	-	n.b./100	n.b./56	90 (83-98)	3	21	0,32	-3,7(S)
W4N (S/Z)	20,0	5	n.b./100	<10	7 (3-15)	2	23	0,40	+18,3(S) -11,1(Z)
O5Z (S)	19,3	5	10	32	97 (82-114)	3	46	0,30	-10,8(S)

n.b./x: niet bepaalbaar vanwege een onduidelijke dosis-effect relatie; achter de schuine streep wordt de indicatieve waarde gegeven

S slib

Z zand

Chronische test met *Daphnia magna*

De resultaten voor de monsters W3Z, W3N en W4N werden getoetst ten opzichte van twee blanco testen, waarvoor de variatiecoëfficiënt van het gemiddeld aantal geproduceerde jongen werd overschreden (paragraaf 3.1.1, bijlage 1, bijlage 7). Dit betekent dat een significant effect op de r_m in de verdunningen van het poriewater van de monsters iets minder snel aantoonbaar is (de statistische toets wordt conservatiever). De blanco voor O5Z voldeed aan alle criteria.

In het poriewater van alle monsters werden bij een of meerdere concentraties (significante) negatieve effecten op de overleving en/of reproductie van *D. magna* waargenomen. In de meeste gevallen werd echter geen duidelijke dosis-effect relatie waargenomen en is de meest waarschijnlijke waarde voor de NOEC's hoger dan wanneer de TRIADE-methodiek zonder nadere beschouwing ter beoordeling zou

worden gebruikt. In de overzichtstabel van de bioassays (tabel 3.1) wordt in dat geval een meer realistische (indicatieve) waarde gegeven die gebaseerd is op een nadere beschouwing van de r_m -gegevens.

Bij W3Z trad een verhoogde sterfte op in de 10, 32 en 56% v/v. Het onverdunde poriewater had echter geen effect, noch op de overleving, noch op de reproductie. Het lijkt daarom onwaarschijnlijk dat de geobserveerde effecten door toxiciteit van stoffen zijn veroorzaakt. Dit wordt bevestigd door een LC_{50} groter dan 100% v/v. De NOEC's zijn daarom op 100% v/v gesteld.

Bij W3N trad een verhoogde sterfte op in de 10%-verdunding waardoor er tevens een significant effect op de r_m werd geconstateerd. De 32%- en 56%-verdundingen veroorzaakten echter geen effecten, terwijl in de 100% weer wél sterfte optrad. Om deze reden is het aannemelijk dat de NOECsterfte 56% v/v bedraagt. Dit wordt min of meer bevestigd door een LC_{50} gelijk aan 90%. Het onverdunde poriewater had echter geen significant effect op de r_m doordat de sterfte pas na de reproductie optrad.

Bij W4N was sprake van verhoogde sterfte in alle 4 verdundingen. De NOEC voor de sterfte is dus lager dan 10% v/v. Het effect op de reproductie was echter alleen significant voor de 32%-verdunding. De NOECreproductie is dus 10% v/v. Er was echter geen significant effect op de reproductie bij 56% en 100% v/v en ook geen duidelijke dosis-effect relatie. Om deze reden is het waarschijnlijker dat de NOECreproductie 100% v/v bedraagt. In principe zou een te laag zuurstofgehalte in dit monster (mede) de oorzaak kunnen zijn geweest van de waargenomen effecten. Dit werd echter slechts op één enkel tijdstip vlak voor verversing geconstateerd, waardoor niet aannemelijk is dat er een substantieel gebrek aan zuurstof was gedurende de test. Hier komt bij dat ook in de 10% en 32% v/v verhoogde sterfte werd waargenomen, terwijl het zuurstofgehalte was. Het kan dus nagenoeg worden uitgesloten dat de effecten in dit monster te wijten zijn aan zuurstofgebrek tijdens de test.

O5Z was het enige monster waarvoor een duidelijke relatie werd waargenomen tussen de verdunding en het effect. De NOECsterfte is 32% v/v. Significante effecten op de r_m traden op vanaf 32% poriewater en de NOECreproductie was dus 10%. Het is niet duidelijk of de geobserveerde effecten in het poriewater van dit monster geheel door toxiciteit veroorzaakt zijn. In het sediment waren waarschijnlijk zoveel afbreekbare organische verbindingen aanwezig, dat er vanaf dag 10 regelmatig een te laag zuurstofgehalte optrad (bijlage 3). Dit kwam meer voor bij de hoogste concentraties. Mogelijk is dit (mede) de verklaring voor de waargenomen effecten. Aan de andere kant speelt er zeker toxiciteit mee, want verhoogde sterfte werd al voor dag 10 geconstateerd (bijlage 7).

Chronische test met *Chironomus riparius*

In een monster werd een significant effect bij *C. riparius* larven vastgesteld. Dit betrof een verhoogd percentage dode en/of L2/L3-larven aan het einde van de test met het monster O5Z.

3.2. Bioaccumulatie

Het natgewicht van de oligochaeten aan het einde van het bioaccumulatie-experiment varieerde van 72 tot 91% van de ingezette hoeveelheid materiaal (zie bijlage 9). Deze opbrengsten duiden op geen of weinig toxiciteit van de vier monsters voor oligochaeten. Het vetgehalte van de dieren liep terug tijdens de duur van de testen (bijlage 10), maar dit is niet onverwacht, gegeven het voorgeschreven voerregime.

De gehalten van sommige verontreinigingen in het uitgangsmateriaal (blanco, t=0) waren soms hoger dan na blootstelling aan de sedimentmonsters. Dit betrof vooral het kopergehalte en in mindere mate PAK's, PCB's en DDT-derivaten (bijlage 10). Arseen, lood en nikkel namen bij alle vier sediment-monsters aanzienlijk toe. Cadmium, chroom en kwik waren na blootstelling meetbaar in de oligochaeten, terwijl het niveau in de blanco beneden de detectiegrens lag. Minerale olie en EOX waren meer dan verdubbeld na blootstelling aan alle vier de monsters. PAK's namen af in W3Z en O5Z, maar namen toe in W3N en W4N. PCB's namen af in W3Z en W3N, varieerden in W4N en namen toe in O5Z. Hexachloorbenzeen en de (meetbare) organochloorbestrijdingsmiddelen namen af in W3Z en W3N, maar namen toe in W4N en O5Z.

3.3. Beoordeling volgens criteria TRIADE-benadering

Wanneer de bioassays beoordeeld worden volgens de criteria uit de TRIADE-richtlijn (tabel 3.2), dan blijkt dat er geen effecten optraden bij monster W3Z, matige effecten bij W3N (*D. magna*) en ernstige effecten bij W4N en O5Z (vooral in de watervlo-test).

Tabel 3.2. Criteria ter beoordeling van bioassay resultaten voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* volgens de TRIADE-beoordeling (Maas *et al.*, 1993).

Testorganisme:	<i>V. fischeri</i>	<i>D. magna</i>		<i>C. riparius</i>		
Testduur:	30 minuten	14-16 dagen		28 dagen		
Effectparameter:	EC ₂₀	NOEC _{st}	NOEC _{repr}	Sterfte	Ontwikkeling	Drooggewicht
Criterium 1	50 %	100 %	100 %	10 %	10 %	10 %
Criterium 2	10 %	10 %	10 %	50 %	50 %	25 %

Tabel 3.3. Beoordeling van de locaties op basis van de resultaten van bioassays (TRIADÉ-methode; Maas *et al.*, 1993). -: geen tot weinig effect; ±: matig effect; +: ernstig effect.

Monster	Bioassays			eindoordeel
	<i>V. fischeri</i>	<i>C. riparius</i>	<i>D. magna</i> *	
W3Z (S)	-	-	-	-
W3N (S)	-	-	±	±
W4N (S/Z)	±	-	+	+
O5Z (S)	±	±	(+)	(+)/±**

* gebaseerd op de indicatieve resultaten (zie tabel 3.1 en tekst)

** eindoordeel “+” mogelijk (mede) veroorzaakt door lage zuurstofgehalten in *D. magna* test; is in ieder geval “±”

De criteriumgrenzen voor de gehalten van sommige organische koolwaterstoffen en zware metalen in oligochaeten in de TRIADÉ-bioaccumulatie-test worden gegeven in tabel 4 en 5 in Maas *et al.* (1993). De op deze grenzen gebaseerde beoordeling van de vier monsters wordt gepresenteerd in tabel 3.4.

Uit de tabel blijkt nogmaals dat de via de aquariumhandel verkregen oligochaeten relatief hoge gehalten PAK's, PCB's, koper en zink bevatten. Het is dus niet mogelijk om over de bioaccumulatie van deze stoffen een goed oordeel te vellen. Lood accumuleerde echter sterk bij alle vier de sedimenten, terwijl het gehalte in het blanco materiaal onder de detectielimiet lag. Alleen al op basis van de loodgehalten zou het eindoordeel voor bioaccumulatie voor alle vier de monsters “+” luiden (hoge blootstelling).

De gehalten in de oligochaeten werden eveneens getoetst aan meer recente criteria die zijn gebaseerd op het Maximaal Toelaatbaar Risico (MTR) voor doorvergiftiging in vogels (den Besten, in voorbereiding). Deze gegevens staan ook in bijlage 10. Uit deze gegevens bleek dat er voor alle vier de monsters uit de Gamerense Waard een doorvergiftigingsrisico van cadmium uit het sediment via wormen naar vogels bestond. Voor W4N en O5Z gold dit ook voor kwik. Een doorvergiftigingsrisico voor OCB's werd niet gevonden. Voor de overige metalen en PAK's geeft den Besten (in voorb.) geen MTR-waarden.

Tabel 3.4. Beoordeling van de locaties op basis van de resultaten van bioaccumulatie (TRIADÉ-methode; Maas *et al.*, 1993). -:weinig tot geen blootstelling; ±: matige blootstelling; +: hoge blootstelling.

Toetsstof	Monster	Blanco	W3Z	W3N	W4N	O5Z
Benzo(a)anthraceen		+	+	+	+	+
Benzo(ghi)peryleen		+	+	+	+	+
Benzo(a)pyreen		+	+	+	+	+
Fenantreen		+	+	+	+	+
Indeno(123cd)pyreen		+	≤+	+	+	+
Pyreen		+	+	+	+	+
Dibenzo(ah)anthraceen		+	≤±	+	+	±
Anthraceen		+	+	+	+	+
Benzo(b)fluorantheen		+	+	+	+	+
Benzo(k)fluorantheen		+	±	+	+	+
Chryseen		+	+	+	+	+
Fluorantheen		+	+	+	+	+
Hexachloorbenzeen		-	-	-	±	±
PCB 28		±	-	-	-	-
PCB 52		±	+	±	±	±
PCB 101		±	+	±	±	±
PCB 118		±	+	±	±	±
PCB 138		±	≤±	±	±	±
PCB 153		±	+	±	±	±
PCB 180		±	+	±	±	±
Aldrin + Dieldrin		-	-	-	-	-
Endrin		-	-	-	-	-
DDT + derivaten		±	-	-	±	±
gamma-HCH		-	-	-	-	-
alfa-Endosulfan + -sulfaat		-	-	-	-	-
Heptachloor + -epoxide		-	-	-	-	-
Cadmium		-	±	±	±	±
Kwik		<±	±	±	±	±
Koper		+	+	+	+	+
Lood		-	+	+	+	+
Zink		+	+	+	+	+
Eindoordeel		+	+	+	+	+

4. Conclusies

Het doel van het onderhavige onderzoek in de Gamerense Waard was om via analyse van biologische gegevens volgens de TRIADE-benadering te komen tot een beoordeling van de onderzochte lokaties. Wanneer de resultaten van het onderzoek worden beoordeeld, dan blijkt het volgende. Er werden diverse biologische effecten in bioassays waargenomen in de monsters. W3Z veroorzaakte geen eenduidige effecten. Met de natgemaakte droge bodem van W3N werd alleen een matig effect op *Daphnia magna* geconstateerd. In het sediment van W4N en O5Z was het effect op *D. magna* ernstig. Hierbij kwam dat beide sedimenten een matig effect hadden op de bacterie *Vibrio fischeri* en dat O5Z tevens een matig effect veroorzaakte op de ontwikkeling van de muggenlarve *Chironomus riparius*. Het effect van O5Z op *D. magna* is mogelijk (mede) te verklaren door te lage zuurstofgehalten die veroorzaakt kunnen zijn door biologische afbraak van organische stof. De chemische analyses van dit sediment kunnen deze interpretatie mogelijk bevestigen.

Bioaccumulatie in oligochaeten was in alle vier de monsters het sterkst voor de metalen arseen, lood en nikkel. Ook minerale olie en EOX namen toe. Het (blanco) uitgangsmateriaal voor deze test bevatte reeds verhoogde concentraties koper, zink, PAK's en PCB's. Tijdens de test namen PAK's echter nog toe in de oligochaeten die werden blootgesteld aan het sediment van W3N en W4N. PCB's namen toe voor het monster O5Z. Vergelijking van de gemeten gehalten met die van de chemische analyses in het sediment kan uitwijzen of eventueel sprake is van verhoogde of verlaagde biologische beschikbaarheid van (groepen) verbindingen.

5. Literatuur

- Besten, P. den (in voorbereiding).
Biotisch effectonderzoek Hollandsch Diep en Dordtsche Biesbosch.
RIZA, Lelystad
- Grootelaar E.E.M. & R. Mulder (1991). Handleiding voor het kweken van de muggelarf *Chironomus riparius*. S.O.P., RIZA Lelystad, AOCE/06 uitgave nr 3.
- ISO 6341 (1989). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)
- Kooijman, S.A.L.M. (1981) Parametric analysis of mortality rates in bioassays.
Water Res 15:107-119
- Maas, J.L., C. van de Guchte & F.C.M. Kerkum (1993).
Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE-benadering.
Methodebeschrijvingen voor enkele bioassays,
bioaccumulatiemetingen en veldstudies. RIZA notanr. 93.027,
juli, 1993.
- NVN 6516 (1993). Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Vibrio fischeri*. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, augustus 1993.
- Norusis, M.J. (1992). SPSS® for Windows™. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc. Chicago).
- Tidepool (1993). ToxCalc user's guide. Comprehensive toxicity data analysis and database software. Version 4.0 for microsoft Excel under Windows 3.1 or Apple Macintosh. Tidepool Scientific Software.

Bijlagen