

Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard

2002

Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard

2002

in opdracht van	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA
------------------------	---

Uitvoering door	S. Dalloessing; ing. M.B. Jansen; ing. C.M. Keijzers; Dr. J.F. Postma
namens opdrachtgever	de heer J. Oosterbaan

rapportnummer	code opdrachtgever	status
1698	6020475	Eindrapport

autorisatie	naam	paraaf	datum
opgemaakt	ing. C.M. Keijzers		12-08-2002
goedgekeurd	Dr. J.F. Postma		12-08-2002

Citeren als: AquaSense (2004). Ecotoxicologisch onderzoek in de Gamerense Waard 2002. In opdracht van: Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA. Rapportnummer: 1698.

Inhoud

Samenvatting	3
1. Inleiding	5
2. Methode	7
2.1. Bemonstering en voorbehandeling	7
2.2. Fysisch-chemische analyses	8
2.3. Bioassays.....	8
2.3.1. Acute test met <i>Vibrio fischeri</i>	9
2.3.2. Chronische test met <i>Daphnia magna</i>	10
2.3.3. Chronische test met <i>Chironomus riparius</i>	11
2.3.4. Kwaliteitstesten testorganismen	13
2.4. TU-analyses	13
3. Resultaten en discussie	15
3.1. Fysisch-chemische analyses	15
3.1.1. Sedimentkarakterisering	15
3.1.2. Sedimentverontreinigingsgraad	16
3.2. Bioassays.....	16
3.2.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden	16
3.2.2. Resultaten bioassays.....	18
3.2.3. TU-waarden sediment	19
3.3. Beoordeling volgens TRIADE-benadering	20
4. Literatuur.....	22
Bijlagen.....	23

Samenvatting

In opdracht van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) heeft AquaSense de toxiciteit van een aantal sedimenten afkomstig uit de Gamerense Waard bepaald met chemische en ecotoxicologische analyses. De lokaties werden op 15 mei 2002 door Rijkswaterstaat bemonsterd. De sedimenten werden allereerst onderworpen aan enkele fysisch-chemische analyses om het sediment te karakteriseren en de verontreinigingsgraad te bepalen. Tevens werden met behulp van bioassays de mogelijke effecten van de sedimentmonsters op een drietal organismen bestudeerd, namelijk de lichtgevende bacterie *Vibrio fischeri* (acute Microtox[®] test), de watervlo *Daphnia magna* en de muggenlarve *Chironomus riparius* (chronische testen).

De resultaten van het onderzoek zijn samengevat in de onderstaande tabel. Hieruit blijkt dat geen van de sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakte voor de Microtox en de watervlo *D. magna*, terwijl de bioassay met larven van de dansmug *C. riparius* in twee van de vier gevallen een negatief effect liet zien.

Samenvattend blijkt uit de resultaten van de beoordeling (tabel 1), dat de eindbeoordeling matig toxisch is voor het monster O5ZBE, terwijl het sedimentmonster W4NBE ernstig toxische effecten veroorzaakte. Deze negatieve effecten kunnen niet verklaard worden op basis van de resultaten van de zogenaamde Toxic-Unit (TU) analyse.

Tabel 1 Resultaten TRIADE-beoordeling (Maas *et al.*, 1993) voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius*. -: geen toxisch effect, geen overschrijding criterium 1; ±: matig toxisch effect, overschrijding criterium 1; +: ernstig toxisch effect, overschrijding criterium 2; nb: niet bepaalbaar.

Test met:	Microtox	Watervlo chronisch		Muggelarf chronisch		
Testorganisme:	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>		<i>Chironomus riparius</i>		
Testduur:	30 minuten	14-16 dagen		28 dagen		
Effectparameter	EC ₂₀	NOEC _{st}	NOEC _{repr}	Sterfte	Ontwik.	Drooggew.
O5ZBE	-	-	-	±	±	-
O3ZBE	-	-	-	-	-	-
W4NBE	-	-	-	+	+	nb
W2NBE	-	-	-	-	-	-

1. Inleiding

In het kader van een meerjarig onderzoek werd de toxiciteit van een aantal sedimenten afkomstig uit de Gamerense Waard bepaald. Om deze sedimenten te kunnen beoordelen, zijn in opdracht van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) bioassays uitgevoerd met de lichtgevende bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*), de watervlo *Daphnia magna* en larven van de dansmug *Chironomus riparius*. De bioassays zijn uitgevoerd conform de TRIADE-richtlijn (Maas *et al.*, 1993).

Tevens werd van elk sedimentmonster de verontreinigingsgraad vastgesteld door het uitvoeren van verschillende chemische analyses.

Naast een overzicht van de gebruikte methoden worden de resultaten van de bioassays weergegeven en kort bediscussieerd.

2. Methode

2.1. Bemonstering en voorbehandeling

De lokaties werden op 15 mei 2002 bemonsterd door Rijkswaterstaat, Directie Oost-Nederland in samenwerking met het RIZA. Per lokatie werd 40 (slib) of 50 liter (zand) sediment verzameld in kunststof emmers met een inhoud van 10 liter. De monsters werden gekoeld opgeslagen bij Rijkswaterstaat. Nadat de monsters verzameld waren, werden de monsters naar AquaSense getransporteerd. Hier werden de monsters direct na binnenkomst geregistreerd en voorzien van een AquaSense monsternummer (Ecolims-nummer). De emmers van ieder monster werden vervolgens bij elkaar gevoegd, mechanisch geroerd en weer over de emmers verdeeld, waarna één monster ten behoeve van chemische analyses werd genomen. Het bovenstaande water van de slibmonsters werd na 24 uur bezinken verwijderd. Van de zandmonsters werd niet al het bovenstaande water verwijderd, zodat er voldoende poriewater gewonnen kon worden voor het uitvoeren van de chronische test met de watervlo *Daphnia magna*. Tot het moment van gebruik werden de sedimentmonsters in het donker bij 5°C in een koelcel opgeslagen.

In tabel 2.1 worden de monsterdata en de Ecolimsnummers van de sedimentmonsters weergegeven. Voor een uitgebreide beschrijving van de sedimentmonsters wordt verwezen naar bijlage 3. Het bodemtype van de sedimentmonsters werd gekarakteriseerd op basis van fysisch/chemische analyses (zie tabel 3.1).

Tabel 2.1 Bijzonderheden van de sedimentmonsters.

Locatie	Monsterdatum	Ecolimsnr.
O5ZBE	15-05-02	325059
O32ZBE	15-05-02	325060
W4NBE	15-05-02	325061
W2NBE	15-05-02	325062

In bijlage 3 worden de volgende bijzonderheden van de sedimentmonsters weergegeven:

- Monstercode RWS;
- AquaSense Ecolims-nummer;
- Monsterdatum;
- Type sediment;
- Manier van poriewaterwinning;
- Poriewateropbrengst;
- Datum waarop de testen zijn ingezet.

2.2. Fysisch-chemische analyses

Chemie bodem

De fysisch-chemische analyses betroffen de gehalten aan droge stof en organische stof (gloeiverlies), de korrelgrootte verdeling (fracties <2, <16, <63 en <210µm) als mede de concentraties van 8 metalen, 16 PAK's (EPA), 7 PCB's, OCB's, minerale olie, EOX, Kjeldahl-stikstof en totaal fosfaat als P (bijlage 1). Op basis van de analyseresultaten werd de vervuilingsgraad bepaald volgens de 4de Nota Waterhuishouding Water (bijlage 2).

2.3. Bioassays

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 worden op twee verschillende manieren blootgesteld: respectievelijk via een sediment/water-systeem en via geïsoleerd (porie)water. Poriewatertesten zijn in het algemeen goed bruikbaar voor het beoordelen van verontreinigde sedimenten omdat in een evenwichtssituatie de opname van stoffen uit het sediment veelal plaats vindt via de waterfase (Lahr, 1988, geciteerd in Maas *et al.* 1993).

Omdat sedimenten dermate sterk verontreinigd kunnen zijn dat acute toxiciteit kan worden aangetoond, werd conform de TRIADE-benadering ook een (acute) poriewatertest met de luminescerende bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*) uitgevoerd.

In verband met mogelijke effecten van fysische en chemische parameters als zuurgraad, zuurstofgehalte, geleidbaarheid, nitriet en ammoniumgehalte op de organismen werden vlak voor het inzetten van de testen 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 tenminste ook éénmaal per week gedurende de testen, bij het verversen van het medium (*D. magna*) en bij beëindiging van de testen gemeten.

Voor de testen met *V. fischeri*, *D. magna* en *C. riparius* zijn randvoorwaarden gesteld aan deze parameters als kwaliteitsborging. Indien aan deze randvoorwaarden wordt voldaan, worden geen effecten verwacht op de organismen.

Met de resultaten van de chemische analyses werden zogenaamde Toxic Unit (TU) berekeningen uitgevoerd om eventueel waargenomen effecten in de bioassays te verklaren.

Hieronder wordt per bioassay kort de werkwijze beschreven.

2.3.1. Acute test met *Vibrio fischeri*

Poriewater werd door middel van centrifugatie uit de voorbehandelde sedimentmonsters gewonnen. Binnen 4 uur na winnen werd met dit poriewater de acute test met de bacterie *Vibrio fischeri* uitgevoerd volgens ISO 11348-3 (1998) aangevuld met de TRIADE-methodebeschrijving (Maas *et al.*, 1993) en de WSC-notitie (den Besten & Schmidt, 1994).

In de Microtox-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 en de bijbehorende TI-waarde (Toxiciteits Index) werd bepaald. Deze waarden werden bepaald met behulp van de programmatuur 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 TI-waarde wordt vervolgens berekend door 100 te delen door deze EC₂₀-waarde. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC₂₀-waarden, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster aan te geven.

Vlak voor het inzetten van de testen werden in het onverdunde poriewater de volgende fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten:

- Zuurstofgehalte (met gecomb. zuurstof- en temp-electrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Amoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

2.3.2. Chronische test met *Daphnia magna*

De bioassays met *Daphnia magna* zijn uitgevoerd conform de "Methodebeschrijving voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering" (Maas *et al.*, 1993).

Poriewater werd door middel van centrifugeren (slibmonster) of uitpersen (zandmonsters) gewonnen uit de voorbehandelde sedimentmonsters. Dit poriewater werd gefiltreerd over een 0,45 µm filter en tot gebruik hooguit 1 week gekoeld bewaard, in donkere afgesloten glazen potten. Alle gebruikte glasvezel- en membraanfilters werden voorgespoeld met 1 liter milli-Q water.

Door verdunning met Elendt-medium¹ werden de volgende 4 concentraties poriewater aangemaakt: 10, 32, 56 en 100 volume% poriewater. Per concentratie werden 10 testvaatjes gevuld met 30 ml testmedium. Als blanco-testmedium werd Elendt-medium gebruikt. In ieder testvaatje werd één watervlo (leeftijd < 24 uur) ingezet.

De testduur bedroeg 17 dagen. Gedurende de bioassays werd tweemaal per week het testmedium verversen 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 watervlooiën gecontroleerd, eventuele reproductie genoteerd en werd gevoerd met een *Scenedesmus*-suspensie.

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 moment van eerste reproductie (eerste worp) en de aantallen nakomelingen per worp zijn bepalend voor deze parameter. Met een parametrische test (bijv. William's) uit het ToxCalc-pakket (Tidepool, 1995) 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

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 (Begon *et al.*, 1986).

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) rang-som-test. Op basis van deze statistische analyse werd de NOECreproductie-waarde bepaald. Bij niet-gelijke replica's werd de "Bonferoni adjusted T-test" gebruikt uit het TOXCALC-pakket (Tidepool, 1995). De NOECsterfte-waarde werd gelijk gesteld aan die testconcentratie waarbij ≤ 20 % sterfte optrad, mits sprake was van een trend in drie opeenvolgende verdunningen van poriewater (Maas *et al.*, 1993). Indien in hetzij de reproductie (r_m -waarde) hetzij de sterfte geen sprake was van een duidelijke trend in opeenvolgende verdunningen, werd een indicatieve NOEC-waarde vastgesteld aan de hand van de beschikbare informatie over het verloop binnen de geteste concentratiereeks. Tevens werd (indien mogelijk) de poriewater concentratie bepaald die aan het einde van de test 50% sterfte van de watervlooiën gaf (LC_{50}). Indien er voldaan werd aan de ANOVA-criteria werd voor de bepaling van de LC_{50} -waarde een parametrische methode (bijv. maximum likelihood probit) toegepast. Indien er niet voldaan werd aan de ANOVA-criteria werd een niet-parametrische methode (bijv. de getrimde Spearman-Kärber) toegepast.

Gedurende de testen werden in de blanco en het onverdunde testmedium enkele fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten. Deze parameters werden aan het begin en gedurende de test eenmaal per week (vóór en na verversen) bepaald:

- Zuurstofgehalte (met gecomb. zuurstof- en temp-electrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

Indien de randvoorwaarden in de onverdunde poriewatermonsters werden overschreden, werden aanvullende metingen uitgevoerd in het verdunde testmedium.

2.3.3. Chronische test met *Chironomus riparius*

De chronische toxiciteitstest met *Chironomus riparius* werd uitgevoerd volgens de "Methodebeschrijving voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering" (Maas *et al.*, 1993).

³ Voorwaarden voor de uitvoering 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, 1995).

Voor deze test werd het benodigde sediment gezeefd over een 500 µm (slib) of een 1000 µm (zand) zeef. Met dit sediment werd een mengsel aangemaakt bestaande uit 1 volumedeel sediment en 4 volumedelen DSW-medium. Na 24 uur schudden werden 4 testvaatjes gevuld met 50 ml van dit mengsel. Van het mengselrestant werd na drie dagen bezinken het elutriaat gewonnen, waarmee drie testvaatjes tot ca. 100 ml werden gevuld. Per testvaatje met elutriaat werden *ad random* 2 halve eipakketten (≤ 2 dagen oud) van *Chironomus riparius* ingezet. Na 4 dagen werd beoordeeld of beide eipakkethelften waren uitgekomen (met een nauwkeurigheid van circa 10%) 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 gehaald. Per testvaatje met sediment/DSW-mengsel werden 25 van deze larven ingezet. De sediment/DSW-mengsels werden continu belucht en drie maal per week werden de testvaatjes gevoerd met een 2% Trouvit-oplossing. Na 28 dagen werden de larven voorzichtig over een zeef met een maaswijdte van 250 µm uitgespoeld. Het aantal larven werd geteld en van alle 4^e stadium (L4) larven tezamen werd vervolgens het drooggewicht bepaald. Hieruit werd het gemiddelde drooggewicht per L4-larf afgeleid.

Als referentie voor de beoordeling van de sedimentmonsters werd sediment uit de vaargeul van het Drontermeer (slib) en uit een zwemstrandje te Lelystad (zand) getest.

Met behulp van de ANOVA- en de post-hoc Bonferoni T-test werd getoetst of de waarnemingen voor één van de volgende parameters significant ($P \leq 0,05$) verschilde van de referentie:

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

Hierbij werd gebruik gemaakt van het SPSS-softwarepakket (Norusis, 1992). Indien niet aan de voorwaarden voor parametrische testen werd voldaan, werden de gegevens log-getransformeerd. Indien ook na transformatie niet kon worden voldaan aan de randvoorwaarden voor het mogen uitvoeren van parametrische testen, werd gebruik gemaakt van de verdelingsvrije (niet-parametrische) Kruskal-Wallis test.

Gedurende de testen werden enkele fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten in het elutriaat vóór het inzetten van de eipakketten en een week daarna. In het bovenstaande water van het sediment/DSW-mengsel werden deze parameters vóór het inzetten van de larven en daarna éénmaal per week gemeten:

- Zuurstofgehalte (met gecomb. zuurstof- en temp-electrode);
- Zuurgraad (met pH-meter);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter);

2.3.4. Kwaliteitstesten testorganismen

Vibrio fischeri

Ter controle van de gevoeligheid van de bacterie *Vibrio fischeri* is een test uitgevoerd met fenol als referentiestof. In deze test werd de fenolconcentratie bepaald waarbij na 5 minuten blootstelling 20 % afname van de bioluminescentie t.o.v. de blanco kon worden waargenomen.

De resultaten van de kwaliteitscontrole zijn weergegeven in bijlage 4. De gevoeligheid van *V. fischeri* voor fenol viel binnen de gestelde acceptatieranges.

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 kaliumdichromaatconcentratie bepaald waarbij 50% van de watervlooien na 24 uur immobiel is (24u-EC₅₀ volgens ISO 6341, 1989), dan wel de concentratie waarbij 50% van de muggenlarven na 96 uur dood is (96u -LC₅₀ volgens Grootelaar & Mulder, 1991).

De resultaten van de gevoeligheidscontrole van de AquaSense kweken zijn weergegeven in bijlage 4. De gevoeligheid van *D. magna* en *C. riparius* voor kaliumdichromaat viel binnen de gestelde acceptatieranges.

2.4. TU-analyses

Om vast te kunnen stellen welke in het sediment gemeten contaminanten een mogelijke rol bij het tot stand komen van eventueel waargenomen negatieve effecten kunnen hebben gehad, werd gebruik gemaakt van de resultaten van de op het sediment uitgevoerde chemische analyses en van toxiciteitsgegevens van het RIZA (den Besten, 1997 + enkele recente nog niet gepubliceerde data).

De berekeningen zijn uitgevoerd volgens het Toxic Unit (TU)-concept, om zo de totale toxiciteit van groepen verontreinigingen in de sedimentmonsters in te kunnen schatten. De Toxic Units zijn op basis van de chemische analyses uit bijlage 1 berekend (TU_{chemie}). De TU_{chemie}-waarde wordt berekend door de voor standaardbodem gecorrigeerde concentratie van een bepaalde verbinding te delen door de bijbehorende NOEC-waarde. Bij deze standaardisatie wordt niet gebruik gemaakt van de zogenaamde afkapgrenzen⁴. Door van individuele chemische verbindingen met eenzelfde werkingsmechanisme de

⁴ Binnen WABOOS wordt gestandaardiseerd op basis van het org. stof gehalte en het lutumgehalte. Als het org. stof gehalte <2% of >30% wordt echter met deze grenswaarden gerekend. Hetzelfde geldt voor een lutumgehalte <3%. Deze afkapgrenzen zijn niet gebruikt voor de TU-berekening.

bijbehorende TU_{chemie} -waarden voor één specifiek testorganisme op te tellen, wordt een gesommeerde TU-waarde voor deze stoffen in het sedimentmonster verkregen. Indien deze waarde groter is dan 1, bestaat er een matige kans op het waarnemen van effecten. Indien deze waarde groter is dan 3 is deze kans groot.

3. Resultaten en discussie

3.1. Fysisch-chemische analyses

3.1.1. Sedimentkarakterisering

In tabel 3.1 worden de fysisch-chemische analysegegevens weergegeven, waarmee de waterbodems van de onderzochte locaties tot bodemtypen zijn gekarakteriseerd. De ruwe gegevens staan in bijlage 1.

Tabel 3.1 Sedimentkarakterisering op basis van de criteria van Den Besten (1997). O.S.= organische stof; D.S. = droge stof.

Locatie	O.S. (% D.S.)	< 16 µm (% D.S.)	< 63 µm (% D.S.)	> 210 µm (% D.S.)	Vocht (%)	tot. fosfaat (mg/kg)	Kj-N (mg/kg)	Algemene karakterisering
O5ZBE	3,7	18,1	30,0	38,2	36,3	720	1400	Stabiel slib
O32ZBE	1,8	4,1	9,0	51,6	25,8	290	760	Grof zand
W4NBE	0,3	< 0,1	0,4	94,0	19,1	100	100	Grof zand
W2NBE	0,6	1,5	4,4	44,7	25,5	330	430	Zand

3.1.2. Sedimentverontreinigingsgraad

De ruwe resultaten van de chemische analyses van de sedimenten zijn opgenomen in bijlage 1. De resultaten van de chemische analyse en van de toetsing van de gehalten van toxicanten volgens de waterbodem-normering uit de 4de Nota Waterhuishouding zijn weergegeven in tabel 3.2 (zie ook bijlage 2). In deze tabel worden tevens de klasse-bepalende verontreinigingen aangegeven.

Tabel 3.2 Verontreinigingsgraad van het sediment volgens de 4 de Nota Waterhuishouding.

Locatie	Metalen	Chloorbenzenen	PCB's	OCB's	PAK's	Olie	Eind	Klasse bepalende verontreinigingen bij klasse 3 en 4
O5ZBE	2	3	3	2	2	1	3	HCB, PCB
O32ZBE	2	3 ¹	2	≤2	2	≤1	2	
W4NBE	0	≤2	≤2	≤2	0	1	1	
W2NBE	1	2	2	≤2	0	≤1	2	

¹: verontreinigingen vallen in een hogere klasse in vergelijking tot de eindbeoordeling. Dit wordt veroorzaakt doordat bij de eindbeoordeling gebruik wordt gemaakt van een toetsingsregel.

3.2. Bioassays

Het tijdstip van de uitvoering van de bioassays is te vinden in bijlage 3. De ruwe resultaten van de bioassays met *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* worden weergegeven in bijlagen 5-11 en worden in de volgende paragrafen samengevat.

3.2.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden

Geldigheidscriteria

De gehanteerde richtlijnen geven criteria aan voor de geldigheid van de toxiciteitstesten. In tabel 3.3 zijn deze criteria en de geconstateerde waarden per test weergegeven voor de toegepaste bioassays.

Bij de testen met *Vibrio fischeri* (Microtox) en *Chironomus riparius* werd voldaan aan de betreffende geldigheidscriteria. Bij de bioassay met de watervlo *Daphnia magna* werd aan 3 van de 4 gestelde geldigheidscriteria voldaan. Het criterium: geboorte eerste nakomelingen in de blanco ≤ 9 dagen werd net niet gehaald. Schommelingen in de kwaliteit van de dieren werden in dezelfde periode als waarin de testen werden uitgevoerd, ook waargenomen in de kweek. Deze schommelingen zijn niet ongebruikelijk. Aangezien de dieren er visueel goed uitzagen, aan de overige 3 geldigheidscriteria ruim werd voldaan en daarnaast er geen significant negatieve effecten in de sedimentmonsters werden waargenomen zijn er hoogstwaarschijnlijk geen negatieve gevolgen voor de testresultaten.

Tabel 3.3 Geldigheidscriteria voor de toxiciteitstesten.

Parameters	Criterium	Geconstateerde waarden
Microtox (ISO 11348-3, 1998)		
Afname luminescentie in de blanco's (Rt)	$0,6 < Rt < 1,3$	0,8 – 1,0
<i>Daphnia magna</i> (Maas <i>et al.</i> , 1993; OECD 202, 1993)		
sterftepercentage ouderdieren in blanco	≤ 20	10
geboorte eerste nakomelingen in blanco	≤ 9 dagen	9 – 10
gemiddeld aantal nakomelingen per ouderdier in de blanco	≥ 30	60
variatiecoëfficiënt van het gemiddeld aantal geproduceerde jongen in blanco	$\leq 25\%$	9
<i>Chironomus riparius</i> (Maas <i>et al.</i> , 1993)		
sterftepercentage in <u>slibrijk</u> referentiesediment	≤ 10	8
larvale stadium in <u>slibrijk</u> referentiesediment \geq L4	$\geq 80\%$	92
gemiddelde drooggewicht L4-larven in <u>slibrijk</u> referentiesediment (mg)	$\geq 0,3$	0,6
sterftepercentage in <u>zandig</u> referentiesediment	≤ 10	9
larvale stadium in <u>zandig</u> referentiesediment \geq L4	$\geq 80\%$	90
gemiddelde drooggewicht L4-larven in <u>zandig</u> referentiesediment (mg)	$\geq 0,3$	0,6

Randvoorwaarden

De resultaten van de semi-kwantitatieve controle van enkele fysische en chemische parameters (zie §2.3) worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* weergegeven in respectievelijk bijlage 5, 7 en 10.

Door Postma *et al* (2002, in prep) 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 5)

Voor alle monsters kon voor de gemeten parameters worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

Chronische test met *Daphnia magna* (bijlage 7)

Voor alle monsters kon voor de gemeten parameters worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

Chronische test met *Chironomus riparius* (bijlage 10)

In de eerste week van de bioassays worden de eieren en larven van *C. riparius* alleen via de waterfase (elutriaat) blootgesteld. Na deze eerste week worden de larven blootgesteld in sediment/water systemen. De randvoorwaarden worden in dit geval gemeten in het bovenstaande water.

In het elutriaat van monster O32ZBE werd op dag 7 een lichte onderschrijding voor de randvoorwaarde voor het zuurstofgehalte geconstateerd. Uit de testresultaten blijkt dat dit sedimentmonster geen significant negatieve effecten veroorzaakt op de dansmug *Chironomus riparius*. Deze onderschrijding zal dan ook geen negatieve effecten hebben gehad op de testresultaten. Zowel het elutriaat als het bovenstaande water van de sediment/water systemen bleek voor alle overige parameters aan de gestelde randvoorwaarden te voldoen.

3.2.2. Resultaten bioassays

De "ruwe" testresultaten van de bioassays worden voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* weergegeven in respectievelijk bijlage 6, 8, 9 en 11. Deze resultaten zijn beknopt samengevat in de tabel 3.4.

Acute test met *Vibrio fischeri*

Bij de Microtox-test is sprake van een acuut effect indien de EC₂₀-waarde lager is dan 45 volume% (=hoogste test concentratie).

In geen van de vier poriewatermonsters werd een acuut toxisch effect gemeten met de Microtox[®] toets. De EC₂₀-waarde van alle monsters was hoger dan 45 volume-%, hetgeen overeenkomt met een toxiciteitsindex (TI) kleiner dan 2.

Chronische test met *Daphnia magna*

Bij de chronische bioassay met *D. magna* is sprake van een toxisch effect indien de NOEC_{reproductie} en/of de NOEC_{sterfte} kleiner is dan 100 vol%.

Uit de resultaten blijkt dat geen van de vier onderzochte sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakten op de sterfte en/of reproductie van de watervlo *Daphnia magna*. Bij de

monsters O5ZBE en O32ZBE was er sprake van een onduidelijke dosis-effect relatie. Achter de schuine streep wordt de indicatieve waarde weergegeven.

Tabel 3.4. Resultaten van de bioassays (d.w. = drooggewicht). Arceringen geven aan waar (significante) negatieve effecten werden waargenomen. Waar sprake is van een onder- of overschrijding van de randvoorwaarden zijn de gegevens schuingedrukt weergegeven.

organisme testduur effect- parameter	Acuut		Chronisch						
	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Daphnia magna</i>			<i>Chironomus riparius</i>			
	5, 15 en 30 minuten		14-17 dagen			28 dagen			
laagste EC ₂₀ (vol. %)	TI- waarde	NOEC reproductie (vol. %)	NOEC sterfte (vol. %)	LC ₅₀ (vol. %)	sterfte (%)	% larven in stadium L2, L3 of dood	d.w L4-larven (mg)	d.w. % t.o.v. referentie	
Slibref.						8	8	0,57	
Zandref.						9	10	0,59	
O5ZBE	> 45	< 2,2	100	nb/100	> 100	29	32	0,83	45 ¹
O32ZBE	> 45	< 2,2	100	nb/100	> 100	10	10	0,63	6 ²
W4NBE	> 45	< 2,2	100	100	> 100	94	94	?	?
W2NBE	> 45	< 2,2	100	100	> 100	7	9	0,49	-17 ²

nb/x: Onduidelijke dosis-effect relatie. De weergegeven NOEC is indicatief.

?: niet bepaald doordat er weinig tot geen L4-larven werden teruggevonden.

¹: getoetst t.o.v. de slibreferentie

²: getoetst t.o.v. de zandreferentie

Chronische test met *Chironomus riparius*

Bij de chronische bioassay met *C. riparius* is sprake van een toxisch effect indien een statistisch significant verschil voor een van de bepaalde parameters wordt aangetoond in vergelijking met de waarde in het referentiesediment.

Wanneer de resultaten van de sedimentmonsters vergeleken worden met de resultaten van het referentiesediment, dan blijken de sedimentmonsters O5ZBE en W4NBE een significant negatief effect te veroorzaken. Na blootstelling aan deze sedimentmonsters werd een verhoogde sterfte bij de larven van de dansmug geconstateerd. Vooral de sterfte in W4NBE is opvallend hoog.

3.2.3. TU-waarden sediment

Uit de resultaten van de uitgevoerde toxiciteitstesten (tabel 3.4) blijkt dat geen van de sedimentmonsters negatieve effecten veroorzaakte voor de Microtox en de watervlo *D. magna*, terwijl de bioassay met de larven van de dansmug *C. riparius* in twee van de vier gevallen een negatief effect liet zien. Voor de

Microtox komt dit overeen met de resultaten van de TU-analyses (bijlage 16, tabel 3.5). De effecten waargenomen in de bioassay met de dansmug *C. riparius* zijn echter niet aan de hand van de TU-analyse te verklaren. De negatieve effecten zijn wellicht veroorzaakt door stoffen die niet in de TU-analyse zijn opgenomen en waar nog weinig tot geen gegevens van bekend zijn.

Op basis van de resultaten van de TU-analyse werden wel effecten verwacht van sedimentmonster O32ZBE voor de watervlo *D. magna* en dan vooral als gevolg van de concentraties aan PAK's. Hier was de berekende TU-waarde als gevolg van de PAK concentraties boven de 3, de waarde waarboven sterke aanwijzingen bestaan voor het optreden van toxische effecten. Daarnaast werden lichte effecten (Σ TU-waarden > 1) verwacht van sediment O5ZBE voor de watervlo en van sediment O32ZBE voor de dansmug. Bij deze TU-analyse dient gerealiseerd te worden, dat de berekeningen worden uitgevoerd met de laagst aangetroffen NOEC-waarden en niet bijv. geometrisch gemiddelde waarden als er meerdere testresultaten bekend zijn. Dit betekent, dat monsters waarbij de Σ TU-waarden groter is dan 1, terwijl er geen effecten worden aangetroffen, niet onverwacht zijn (er wordt een worst - case benadering gevolgd).

Tabel 3.5. Overzicht van de per testorganisme en sedimentmonster berekende Σ TU_{chemie}-waarden op basis van de geanalyseerde verbindingen. Alle TU's zijn op basis van NOEC-waarden in mg/kg sediment. Σ TU_{chemie}-waarden > 1 zijn onderstreept weergegeven. Σ TU_{chemie}-waarden > 3 zijn onderstreept en vet gedrukt weergegeven. Σ TU_{chemie}-waarden < 0.5 zijn niet weergegeven. Individuele TU-waarden < 0.1 zijn niet in de berekening meegenomen.

Testorganisme:		<i>Vibrio fischeri</i> (acuut)	<i>Daphnia magna</i> (chronisch)	<i>Chironomus riparius</i> (chronisch)
Locatie	Stofgroep			
O5ZBE	Metalen		<u>1,36</u>	0,62
	PAK's	0,50	<u>1,57</u>	0,54
O32ZBE	Metalen		<u>1,07</u>	<u>1,94</u>
	PAK's	0,78	<u>3,86</u>	
W4NBE	Metalen PAK's			
W2NBE	Metalen PAK's		0,60	

3.3. Beoordeling volgens TRIADE-benadering

Voor de organismen *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* zijn de gegevens beoordeeld met de criteria volgens de TRIADE-beoordelingsmethode (tabel 3.6 conform Maas *et al.*, 1993). Deze criteria worden als volgt gehanteerd. Indien criterium 1 niet wordt overschreden is er geen sprake van

een toxisch effect. Er is sprake van een matig toxisch effect, indien criterium 1 wel wordt overschreden, terwijl er sprake is van een ernstig toxisch effect indien criterium 2 wordt overschreden. De resultaten van deze kwalitatieve beoordeling zijn weergegeven in tabel 3.7.

Tabel 3.6. Criteria ter beoordeling van bioassay resultaten voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* volgens de TRIADE-beoordeling (Maas et al., 1993).

Test met:	Microtox	Watervlo chronisch		Muggelarf chronisch		
Testorganisme:	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>		<i>Chironomus riparius</i>		
Testduur:	30 minuten	14-16 dagen		28 dagen		
Effectparameter	EC ₂₀	NOEC _{st}	NOEC _{repr}	Sterfte	Ontwikkeling	Drooggew.
Criterium 1	50 %	100 %	100 %	10 %	10 %	10 %
Criterium 2	10 %	10 %	10 %	50 %	50 %	25 %

Uit de kwalitatieve beoordeling van de resultaten volgens deze criteria (tabel 3.7) blijkt dat de sedimenten niet toxisch waren voor *V. fischeri* en *D. magna*.

Het sediment O5ZBE blijkt op grond van een effect op de sterfte matig toxisch voor *C. riparius* te zijn. Ook het sediment W4NBE veroorzaakt deze negatieve effecten op de larven van de dansmug, maar de effecten in dit sediment worden als ernstig bestempeld.

Tabel 3.7 Resultaten TRIADE-beoordeling (Maas et al., 1993) voor *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en *Chironomus riparius*. -: geen toxisch effect, geen overschrijding criterium 1; ±: matig toxisch effect, overschrijding criterium 1; +: ernstig toxisch effect, overschrijding criterium 2; nb: niet bepaalbaar.

Test met:	Microtox	Watervlo chronisch		Muggelarf chronisch		
Testorganisme:	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>		<i>Chironomus riparius</i>		
Testduur:	30 minuten	14-16 dagen		28 dagen		
Effectparameter	EC ₂₀	NOEC _{st}	NOEC _{repr}	Sterfte	Ontwik.	Drooggew.
O5ZBE	-	-	-	±	±	-
O32ZBE	-	-	-	-	-	-
W4NBE	-	-	-	+	+	nb
W2NBE	-	-	-	-	-	-

4. Literatuur

- Den Besten, P. (1997). Biotisch effectonderzoek Hollandsch Diep en Dordtsche Biesbosch. Nader onderzoek waterbodempkwaliteit. Rapportnr 97.098, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Grootelaar E.E.M. & R. Mulder (1991). Handleiding voor het kweken van de muggelarve *Chironomus riparius*. S.O.P. AOCE/06 uitgave nr 3., Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- ISO 6341 (1989). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocea, Crustacea).
- ISO 11348-3 (1998) Water quality- Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*, Part 3 method with freeze dried bacteria.
- Lahr, J. (1988). De bioaccumulatie van chloorbenzenen in larven van *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) in een kunstmatig sediment/water systeem. Stageverslag, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- 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. Notanr. 93.027, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Ministerie van Verkeer en Waterstaat (1994). Evaluatienota Water. Tweede Kamer, vergaderjaar 1993-1994, 21 250, nrs. 27-28.
- Norusis, M.J. (1992). SPSS® for Windows™. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc., Chicago.
- Postma, J.F., S. de Valk, M. Dubbeldam, J.L. Maas, M. Tonkes, C.A. Schipper and B.J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. In prep.
- RIZA (2001). Waterbodempkwaliteit Beoordeling Ondersteunend Systeem, Waterbodempkwaliteit BOOS, versie 0,8. Gebruikers handleiding. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Tidepool (1995). ToxCalc programme, version 5.0.12N. Tidepool Scientific Software.

Bijlagen