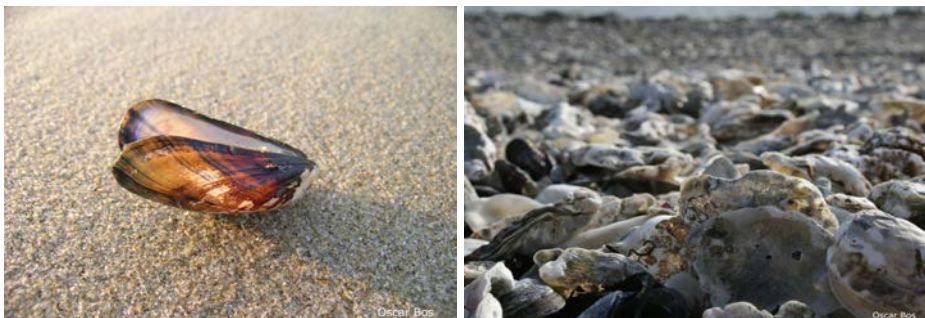


**Variatie gehalte zware metalen op  
locatie Zeelandbrug en toxiciteit  
molybdeen – data rapport.**

S.T. Glorius, M.J. van den Heuvel-Greve en  
E.M. Foekema.  
Rapport C105/13



# IMARES Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever:

RWS Zeeland / Waterdienst  
Poelendaelesingel 18  
4335 JA Middelburg

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van  
Rijkswaterstaat

Publicatiedatum:

24 juli 2013

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

© 2013 IMARES Wageningen UR

IMARES, onderdeel van Stichting DLO.  
KvK nr. 09098104,  
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16.  
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U  
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

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-V13

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	3
Inleiding.....	4
1. Methoden.....	5
1.1 Bemonstering biota.....	5
1.2 Analysemethode.....	5
1.3 Berekening Pollution Load Index.....	6
1.4 Data analyse.....	6
1.5 Toxiciteitstesten.....	7
2. Resultaten.....	8
2.1 Variatie metaalgehalten mosselen en Japanse oesters.....	8
2.2 Toxiciteit molybdeen.....	11
3. Discussie en conclusie.....	12
3.1 Variatie en trend in metaalconcentratie.....	12
3.2 Screening toxiciteit molybdeen.....	12
4. Kwaliteitsborging.....	13
Referenties.....	14
Verantwoording.....	15
Bijlage A. Methoden toxiciteitstesten.....	16
Bijlage B. Variatie in metaalconcentratie.....	21
Bijlage C. Temporele trend in metaalconcentratie.....	23

## Inleiding

De stromingen in de Ooster- en Westerschelde zorgen lokaal voor erosie van de oevers en geulwanden. Om dat proces tegen te gaan, is er in 2008 (pilot) en 2009 (structureel) begonnen om op die locaties waar deze erosie de stabiliteit van de waterkering in gevaar brengt of de reeds bestaande oeverwerken ondermijnt, 'bestortingen' uit te voeren om de oevers te beschermen. Deze bestortingen werden uitgevoerd met staalslakken en breukstenen. Dergelijke materialen kunnen volgens de Regeling Bodemkwaliteit, met in acht neming van diverse normen, worden toegepast als bouwstof. Om met zekerheid vast te kunnen stellen dat er geen negatieve effecten optreden op het mariene milieu n.a.v. de oeververdediging is door Rijkswaterstaat besloten om een monitoringsprogramma op te zetten en uit te voeren.

In 2009 is het monitoringsprogramma gestart. In dat jaar is de T0-situatie (referentiepunt voor het monitoringprogramma) bepaald. Voorafgaand aan de werkzaamheden is in 2009 een biota bemonstering uitgevoerd door Stichting Zeeschelp. Eén van de onderdelen van deze T0 monitoring betrof de bepaling van gehalten van zware metalen in verschillende dominant aanwezige epifaunasoorten op de locatie vóór het storten van de staalslakken en breukstenen, beschreven in Heuvel-Greve e.a. (2009). Om de T1-situatie vast te stellen heeft, één jaar na het bestorten van de oevers met staalslakken en breukstenen, in 2010 wederom een biota bemonstering plaatsgevonden. De ontwikkeling van zowel de epi- als infaunagemeenschap als de accumulatie van zware metalen is beschreven in Heuvel-Greve e.a. (2010). In 2011 heeft de T2 plaatsgevonden. Daarin is de successie van epi- en infaunasoorten op de nieuwe ondergrond is onderzocht evenals accumulatie van zware metalen in een aantal biota (blaaswier *Fucus vesiculosus*, de mossel *Mytilus edulis*, de Japanse oester *Crassostrea gigas*, de zakpijpsorten *Ciona intestinalis* en *Styela clava* en de geweispons *Haliclona oculata*). In het rapport Heuvel-Greve e.a. (2012) worden de resultaten van dit onderzoek beschreven.

In 2011 is de accumulatie als gevolg van de (nieuwe) ondergrond van staalslakken en breukstenen onderzocht door verschillen in metaalconcentraties in de zakpijpen *Ciona intestinalis* en *Styela clava* voor en na plaatsing van de nieuwe ondergrond te toetsen. De gemiddelde molybdeenconcentratie in de zakpijp *Ciona intestinalis* bleek op staalslakken en breukstenen (hoewel niet significant) hoger te liggen op T1 en T2 vergeleken met T0 (factor 4.6 en 10.9). Hiermee vormt molybdeen in potentie een probleemstof. Door afwezigheid van biota normen voor molybdeen en nagenoeg afwezigheid van kennis over de toxische eigenschappen van molybdeen in een zoute (aquatische) omgeving in de literatuur is in 2012 besloten toxiciteitstesten voor molybdeen uit te voeren onder laboratoriumcondities.

Vanwege kostenoverwegingen zijn monitoringsactiviteiten in 2012 ingeperkt. Wel zijn op de Zeelandbrug (Oosterschelde) mosselen (*Mytilus edulis*) en Japanse oesters (*Crassostrea gigas*) bemonsterd om inzicht te verkrijgen in gehalten aan zware metalen tweeënehalf tot drie jaar na het aanbrengen van de vooroeververdediging op de Cluster I locaties. Naast toxiciteitstesten en analyse van zware metalen zijn in 2012 ook epi- en infauna bestandsopname uitgevoerd op zowel hard als zacht substraat. De resultaten van deze bestandsopnamen zijn elders beschreven; De Kluiver e.a. (2013) en in Van den Brink e.a. (2013).

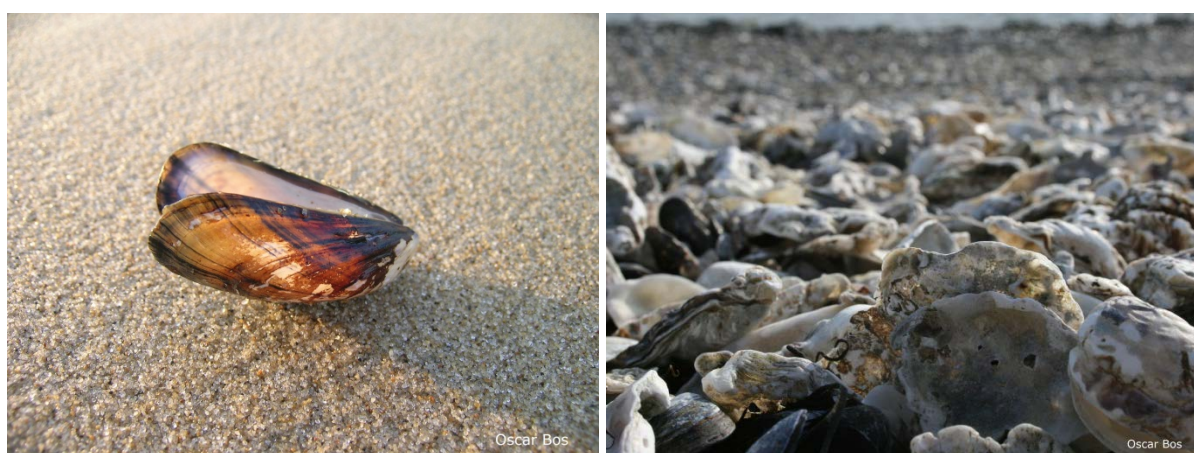
Dit rapport beschrijft het resultaat van de verschillende toxiciteitstesten die uitgevoerd zijn in het laboratorium van IMARES Den Helder. Daarnaast worden de resultaten van de metaalanalyses in mosselen en oesters bemonsterd op de Zeelandbrug besproken waarbij ingegaan wordt op de jaarlijkse variatie in metaalconcentratie een mogelijke trend in de tijd. Resultaten van deze studie dienen als input voor een samenvattende rapportage, Heuvel-Greve e.a. (2013), waarin de verschillende onderdelen in onderling perspectief geplaatst worden evenals implicaties voor toekomstige monitoractiviteiten.

## 1. Methoden

### 1.1 Bemonstering biota

In 2012 is in opdracht alleen gemeten in mosselen (*Mytilus edulis*) en Japanse oesters (*Crassostrea gigas*) bij de Zeelandbrug om gehalten aan metalen nabij de vooroeververdediging te kunnen blijven volgen. Mosselen en oesters zijn door Stichting Zeeschelp bemonsterd. De oesters en mosselen zijn op de pijlers van de Zeelandbrug verzameld. Voor een kaart met de verschillende bestorting en bemonsteringslocaties wordt verwezen naar het samenvattend eindrapport, Heuvel-Greve e.a. (2013).

Van beide soorten zijn per monster meerdere individuen (minstens een tiental tot tientallen stuks) samengenomen voor een mengmonster. Uitsluitend mosselvlees is geanalyseerd. De monsters zijn in triplo verzameld.



Figuur 1: De mossel *Mytilus edulis* (links) en Japanse oester *Crassostrea gigas* (rechts). Foto's: IMARES/Oscar Bos.

Na bemonstering zijn de monsters getransporteerd en gesorteerd opgeslagen in kunststofmaterialen (PP, PE en PVC). De pincetten die gebruikt zijn tijdens deze handeling zijn eveneens van kunststof. De monsters zijn opgeslagen bij  $-26^{\circ}\text{C}$ , in gewassen, zuur- en demi-gespoelde glazen flessen, afgedicht met Idpe-inlegstop en PP-schroefdeksel. Van de verzamelde biota zijn uitsluitend de schelpdieren voor de duur van een nacht verwaterd voordat ze in de vriezer zijn opgeslagen. Verwatering vond plaats in een kunststofaquarium van ongeveer 500 liter welke continue doorstroomd werd met gefilterd zeewater afkomstig uit de Oosterschelde (Jacobahaven).

### 1.2 Analysemethode

De keuze van de te analyseren metalen is gebaseerd op de lijst van zware metalen die in het Besluit Bodemkwaliteit staan. Het betreft de volgende stoffen: As (arseen), Ba (barium), Cd (cadmium), Co (kobalt), Cr (chrom), Cu (koper), Hg (kwik), Mo (molybdeen), Ni (nikkel), Pb (lood), Sb (antimoon), Se (seleen), Sn (tin), V (vanadium) en Zn (zink). Additioneel op deze stoffenlijst zijn ook Al (aluminium), Fe (ijzer) en Mn (mangaan) geanalyseerd, omdat deze metalen uit staalslakken kunnen logen (Jonkers 1987). Dezelfde set is in 2009 (T0), 2010 (T1) en 2012 (T2) geanalyseerd.

De metaalanalyses zijn uitgevoerd door TNO Zeist. Na homogenisatie is een deel van het monster in duplo ontsloten met salpeterzuur en waterstofperoxide, volgens TNO voorschrift LSP/072. In de verkregen oplossing is het gehalte bepaald m.b.v. ICP-MS, volgens TNO voorschrift LSP/055. De kwantificering vindt plaats aan de hand van externe kalibratiestandaarden en om te corrigeren voor

fluctuaties in de apparatuur wordt gebruik gemaakt van een interne standaard (rhodium). Concentraties zijn teruggerekend naar eenheden per droogstofgewicht.

Voor het bepalen van het droge stofgehalte wordt het gewogen monster gedroogd in een stoof ( $103 \pm 3^\circ\text{C}$ ) tot constant gewicht en na afkoelen in een exsiccator terug gewogen.

### 1.3 Berekening Pollution Load Index

Om vast te stellen wat het effect is van variatie in individuele metaalgehalten op de totale belasting aan zware metalen is de Pollution Load Index (PLI) berekend. De index is een maat voor de totale metaalvervuiling en wordt beschreven in Tomlinson et al., 1980. De formule om de PLI te berekenen wordt gegeven in vergelijking 1 en is in feite het geometrisch gemiddelde.

$$PLI = \sqrt[n]{CF_1 \times CF_2 \times \dots \times CF_n}$$

Vergelijking 1.

$CF_1$  = concentratie metaal nr. 1.

$CF_2$  = concentratie metaal nr. 2.

$CF_n$  = etc.

n = aantal metalen opgenomen in de index.

Aangezien de metalen antimoon (Sb), seleen (Se) en tin (Sn), regelmatig onder de detectielimiet liggen, zijn deze metalen niet meegenomen in de berekening van de PLI. De overige geanalyseerde metalen (15 stuks) zijn meegenomen in de PLI berekening.

### 1.4 Data analyse

Om inzicht te krijgen in de variatie van de metaalconcentratie is de standaarddeviatie (standaardafwijking) berekend voor een steekproef (n-1) als maat voor deze spreiding. Hoe groter deze maat hoe groter de verschillen tussen de verschillende waarnemingen. Om de variatie tussen metalen te kunnen vergelijken is hiernaast het procentuele aandeel van de standaarddeviatie op het gemiddelde berekend (ook wel bekend als 100% maal de variatiecoëfficiënt). De formule voor de standaarddeviatie (sd) wordt weergegeven in vergelijking 2.

$$sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Vergelijking 2.

sd = standaarddeviatie

n = het aantal waarnemingen

$x_i$  = waarde van een waarneming

$\bar{x}$  = gemiddelde

Trends in metaalconcentratie zijn onderzocht aan de hand van lineaire regressie waarbij metaalconcentratie afhankelijk is van het jaartal en niet verklaarde variatie, error term ( $\epsilon$ ).

Metaalconcentratie  $\sim$  jaar +  $\epsilon$

Significantie van deze trend is onderzocht door een ANOVA toets. Berekening van de lineaire trendlijn, significantie van deze trend, standaarddeviatie zijn uitgevoerd in R (R Development Core Team (2012)).

## 1.5 Toxiciteitstesten

Toxiciteit van molybdeen is onderzocht door drie testorganismen van verschillende trofische niveaus bloot te stellen aan molybdeen opgelost in zeewater. De gebruikte organismen zijn: bacteriën (*Vibrio fisheri*), algen (*Phaeodactylum tricornutum*) en kreeftachtigen (*Acartia tonsa*). Deze blootstellings-experimenten zijn uitgevoerd volgens standaard testprotocollen welke in Bijlage A beschreven zijn.

Het principe van de testen is dat de organismen worden blootgesteld aan een concentratiereeks van molybdeen in zeewater. De respons van de blootgestelde individuen wordt vergeleken met die van individuen die niet aan molybdeen zijn blootgesteld. Indien er voldoende respons optreedt, kan een dosis-effect relatie worden vastgesteld waaruit de EC50 kan worden berekend. De EC50 is de concentratie waarbij 50% van de organismen een effect laat zien, en vormt de standaardwijze waarop de giftigheid van een stof voor een soort wordt uitgedrukt. Hoe hoger de EC50, hoe lager de giftigheid (met andere woorden: er is in dat geval meer van het metaal nodig om ook 50% effect te bereiken).

De tijdsduur en eindpunten van de testen zijn specifiek voor de gebruikte testorganismen. Bij de bacterietest wordt na 30 minuten blootstelling de afname van de bioluminescentie activiteit bepaald, in de algentest wordt na 72 uur blootstelling de remming van de groeisnelheid bepaald en in de kreeftachtigen test wordt na 48 uur de mobiliteit, als maat voor overlevingskans, van de organismen bepaald.

Het molybdeen is in verschillende vormen toegediend Molybdeenchloride, Ammoniummolybdaat en Natriummolybdaat. Molybdeenchloride is zeer reactief en oxideert snel, waarbij naar verwachting snel molybdaat gevormd wordt. Ammonium- en natriummolybdaat zijn stabiel.

## 2. Resultaten

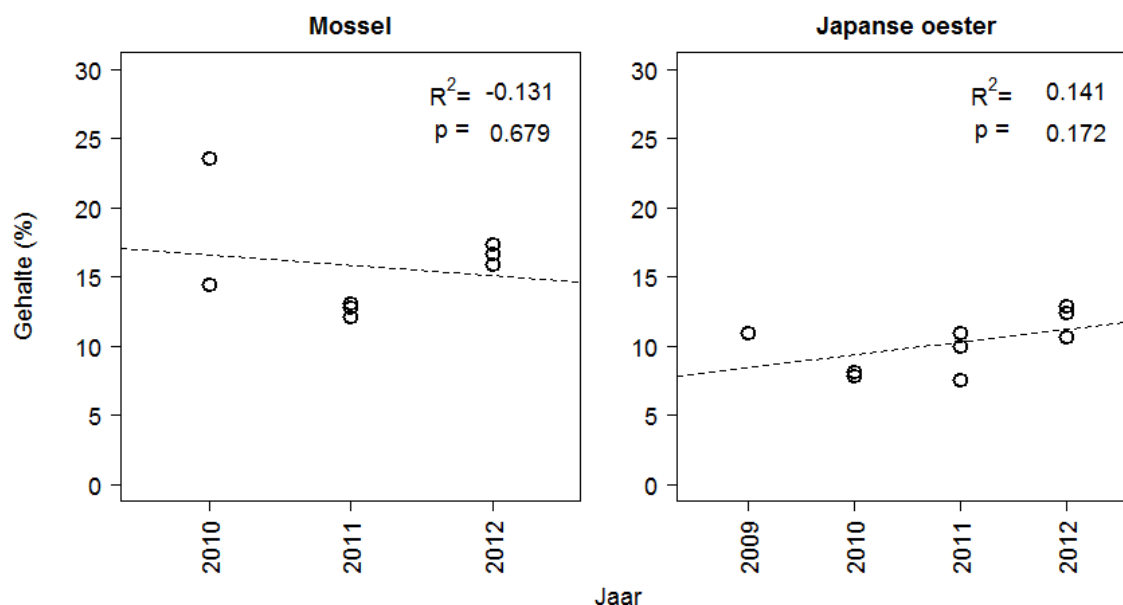
### 2.1 Variatie metaalgehalten mosselen en Japanse oesters

In Tabel 1 worden het aantal bemonsterde soorten op Zeelandbrug ten behoeve van metaalanalyses voor de verschillende jaren weergegeven. Zoals uit Tabel 1 blijkt is de Japanse oester ieder jaar bemonsterd. Er zijn in 2009 geen mosselen bemonsterd. Het aantal replica's neemt toe, in 2011 en 2012 werden bemonsteringen en metaalanalyses in zowel Japanse oesters als mosselen in drievoud uitgevoerd.

Tabel 1. Biota die bemonsterd zijn op locatie Zeelandbrug ten behoeve van metaalanalyses binnen het monitorprogramma. Met de cijfers worden het aantal replica's weergegeven.

Species	2009	2010	2011	2012
Doorzichtige zakpijp		2	3	
Geweispons	1			
Japanse oester	1	2	3	3
Japanse zakpijp		2	3	
Mossel		2	3	3
Mosselzaad	1			
Ruwe zakpijp			3	
Zeester	1			

Het gehalte droge stof ligt in mosselen hoger ( $15.8 \pm 3.7$ ) dan in de Japanse oester ( $10.2 \pm 1.9$ ), zie figuur 2. Het gehalte droge stof is niet toe- of afgenomen over de tijd ( $F=2.99$ ,  $p=0.14$ ).



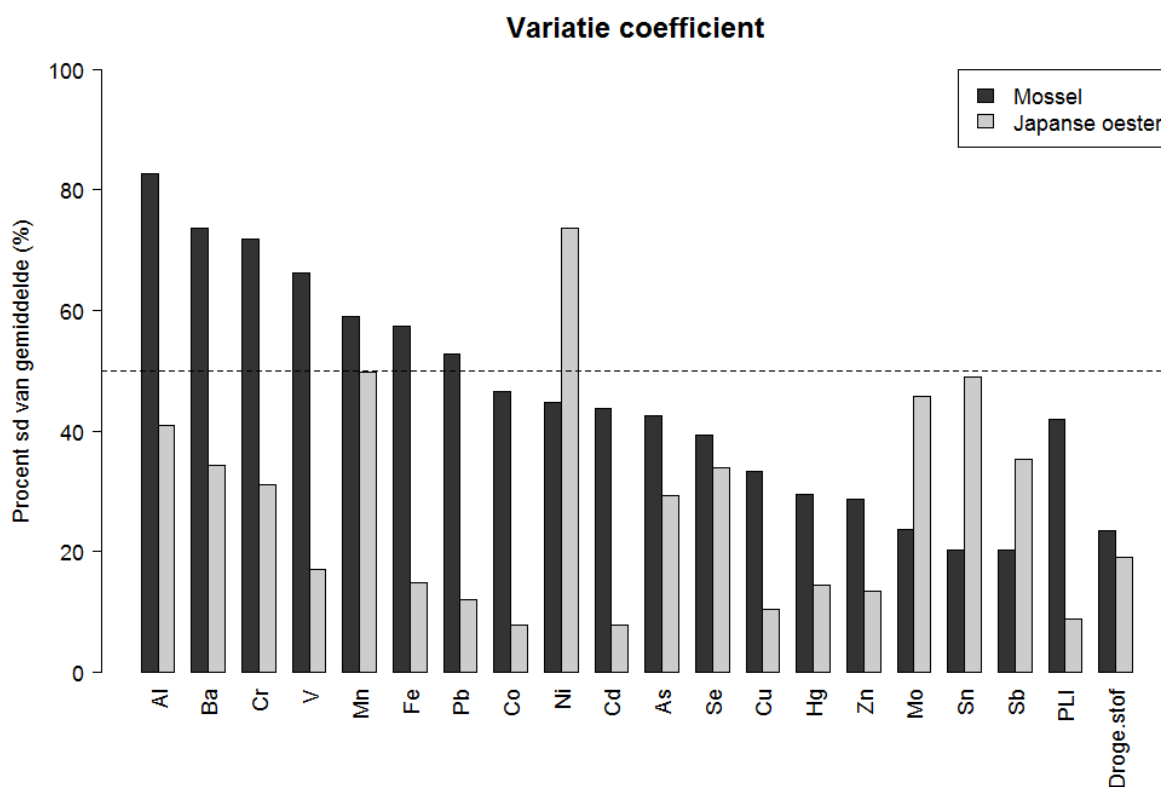
Figuur 2: Gehalte droge stof in mosselen (links) en Japanse oester (rechts).



Tabel 2 geeft een overzicht van gemiddelde metaalconcentraties, de standaardafwijking (sd) en of er een significante trend over de tijd is waargenomen. Er bestaat grote variatie in gemiddelde metaalconcentratie tussen de verschillende metalen en tussen mosselen en Japanse oesters. Om verschillen tussen metalen en matrix (mosselen / Japanse oesters) inzichtelijk te maken is het aandeel van de standaardafwijking op de gemiddelde concentratie berekend. Het resultaat hiervan wordt weergegeven in Figuur 3.

*Tabel 2. Gemiddelde metaalconcentratie, spreiding en trend in mosselen en Japanse oesters bemonsterd op Zeelandbrug. Voor de in rood afgedrukte waarden lag een of meerdere metingen onder de detectielimiet. In dat geval is de concentratie gelijk aan de detectiegrens gebruikt in de berekening van het gemiddelde, standaarddeviatie en trend. Gem. = gemiddelde, SD = standaarddeviatie, p = significantie trend.*

Parameter	Eenheid	Mosselen				Japanse oester			
		Gem.	SD	p	Trend	Gem.	SD	p	Trend
Droge stof	%	15.8	3.70	0.679	-	10.2	1.94	0.172	-
Al	mg/kg ds	96.8	80.0	0.270	-	27.3	11.2	0.462	-
As	mg/kg ds	9.67	4.12	0.515	-	16.7	4.89	0.979	-
Ba	mg/kg ds	0.73	0.53	0.279	-	0.506	0.174	0.013	afname
Cd	mg/kg ds	0.39	0.17	0.497	-	0.992	0.078	0.252	-
Co	mg/kg ds	0.60	0.28	0.889	-	0.292	0.023	0.656	-
Cr	mg/kg ds	1.36	0.98	0.399	-	0.482	0.150	0.725	-
Cu	mg/kg ds	6.99	2.32	0.383	-	112.1	11.7	0.718	-
Fe	mg/kg ds	225	129	0.289	-	177.0	26.4	0.033	toename
Hg	mg/kg ds	0.153	0.045	0.385	-	0.221	0.032	0.163	-
Mn	mg/kg ds	21.7	12.8	0.671	-	30.6	15.2	0.926	-
Mo	mg/kg ds	3.54	0.83	0.012	toename	2.03	0.93	0.017	afname
Ni	mg/kg ds	1.98	0.89	0.204	-	0.69	0.51	0.260	-
Pb	mg/kg ds	1.18	0.63	0.957	-	0.60	0.07	0.494	-
Sb	mg/kg ds	0.132	0.027	0.999	-	0.19	0.07	0.624	-
Se	mg/kg ds	2.88	1.13	0.335	-	3.19	1.08	0.039	toename
Sn	mg/kg ds	0.13	0.03	0.999	-	0.24	0.12	0.005	afname
V	mg/kg ds	1.06	0.70	0.651	-	0.68	0.12	0.032	toename
Zn	mg/kg ds	85.7	24.5	0.875	-	2186	295	0.890	-
PLI	(-)	2.57	1.08	0.678	-	2.47	0.22	0.401	-



Figuur 3. Procentueel aandeel van de standaarddeviatie op de gemiddelde metaalconcentratie, droge stof en PLI. Met de horizontale stippellijn wordt de (arbitraire) grens van een sd van 50% van het gemiddelde weergegeven.

Over het algemeen is de variatie in metaalconcentratie tussen jaren groter dan in de replica's binnen de jaren, zie figuren in Bijlage C. In deze figuren valt ook op dat de koper- en zinkconcentratie in Japanse oesters een stuk hoger liggen dan in mosselen.

Uit Figuur 3 is te zien dat de variatie in metaalconcentratie ten opzichte van de gemiddelde concentratie verschillend is voor zowel matrix als metaalsoort. In mosselen wordt, van de geanalyseerde metalen, voor zeven metalen een standaarddeviatie groter dan 50% van het gemiddelde aangetroffen (aluminium (Al), barium (Ba), chroom (Cr), ijzer (Fe), mangaan (Mn), lood (Pb) en vanadium (V)). Voor Japanse oesters is dit het geval voor nikkel (Ni), maar dit wordt m.n. veroorzaakt door twee datapunten gemeten onder de detectielimiet. In Japanse oesters is de variatie in mangaan (Mn), tin (Sn) en molybdeen (Mo) relatief groot (>45% van het gemiddelde) (hierbij dient opgemerkt te worden dat alle tinmetingen in Japanse oesters onder de detectielimiet lagen). De variatie in metaalconcentratie is over het algemeen groter in mosselen dan in Japanse oesters. De RSD voor mosselen is voor de geanalyseerde metalen gemiddeld 46.5%, voor Japanse oesters is deze 28.9 %.

Voor veruit de meeste metalen is geen significante toe- of afname in de tijd geconstateerd, zie Tabel 2 en figuren in Bijlage C. In mosselen wordt alleen voor molybdeen een significant toenemende trend geconstateerd. Deze trend wordt m.n. veroorzaakt door de lage molybdeengehalten gemeten in 2010, zie figuur in Bijlage C. De concentratie gemeten in 2011 is niet significant verschillend met die van 2012 (t.toets,  $t = -1.279$ ,  $p = 0.2941$ ).

In de Japanse oesters neemt de molybdeenconcentratie juist significant af. Ook voor de Japanse oesters geldt dat dit met name veroorzaakt wordt door verschil in concentratie in 2009 en 2010 ten opzichte van metingen uitgevoerd in 2011 en 2012. De bariumconcentratie is niet significant verschillend tussen 2011

en 2012 (t.toets,  $t = -1.3413$ ,  $p = 0.3014$ ). IJzer- en vanadiumconcentratie nemen significant toe, zie Tabel 2 en figuren in Bijlage C. De significante trend gevonden voor seleen (Se) en barium (Ba) zijn mede gebaseerd op enkele metingen onder de detectielimiet, voor tin (Sn) zelfs in zijn geheel op metingen onder de detectielimiet. De significantie van deze trend is daarom onbetrouwbaar.

## 2.2 Toxiciteit molybdeen

In Tabel 3 worden de resultaten, als de berekende EC50 waarden van de toxiciteitstesten weergegeven. De bacterietest is met alle drie molybdeen/molybdaatzouten uitgevoerd. Hieruit komt de relatief hoge giftigheid van molybdeenchloride (range EC50 2.2 tot 7.2 mg Mo/L) duidelijk tot uiting in vergelijking met de zouten waar het molybdeen als molybdate aanwezig is.

De bacterietest is driemaal met tussenposen van een dag uitgevoerd (testen 1, 2 en 3) waarbij de toxiciteit van het molybdeenchloride afnam. Dit is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van oxidatie van het molybdeen na opening van de verpakking. Omdat het vanwege dit instabiele karakter lastig is om met deze stof een betrouwbare test uit te voeren volgens de standaard testprocedure en het bovendien zeer onwaarschijnlijk dat molybdeen in deze vorm in de natuur voor zal komen, is een volgende test uitgevoerd met het stabiele ammoniummolybdaat. De EC50 die hierbij voor de bacteriën werd gevonden is 28.7 mg Mo/L. Het is echter niet uit te sluiten dat (een deel van) de respons van de bacteriën door niet door molybdaat maar door het ammonium wordt veroorzaakt. Omdat vooral de kreeftachtigen erg gevoelig zijn voor ammonium is uiteindelijk voor Natrium molybdaat gekozen om testen met alle testorganismen uit te voeren. Natriummolybdaat bleek bij de geteste concentraties nauwelijks tot geen respons te veroorzaken. De hoogst geteste concentraties, 35 mg Mo/L voor de bacteriën en rond 300 mg Mo/L voor algen en kreeftachtigen veroorzaakten geen significante respons. Omdat deze gehalten voor een natuurlijke (uitloog) situatie onwaarschijnlijk hoog worden geacht zijn geen testen uitgevoerd met nog hogere concentraties.

Tabel 3. Resultaten toxiciteitstesten in mg Molybdeen per liter.

Uitgedrukt in mg Mo/L		EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>
teststof		Bacteriën (30 min)	algen (72h)	Copepoden (48 h)
Molybdeenchloride	Test 1	2.2		
Molybdeenchloride	Test 2	5.1		
Molybdeenchloride	Test 3	7.2		
Ammoniumheptamolybdaat(4 H <sub>2</sub> O)		28.7		
Natrium molybdaat(2 H <sub>2</sub> O)		>35	>304	>317

### **3. Discussie en conclusie**

#### **3.1 Variatie en trend in metaalconcentratie**

De variatie in metaalconcentratie is tussen jaren over het algemeen groter dan in replica's binnen jaren. Daarnaast is de variatie in metaalconcentratie in mosselen voor de meeste metalen groter dan in oesters.

In de beoordeling of er een (lineaire) trend aanwezig is over de tijd is, naast de significantiewaarden, ook van belang hoe de datapunten van de individuele jaren verdeelt zijn langs de trendlijn. Daarnaast is het van belang dat analysewaarden boven de detectielimiet liggen om een eventuele trend betrouwbaar vast te kunnen stellen.

De temporele variatie in molybdeenconcentratie levert geen eenduidig beeld op voor de onderzochte soorten. De molybdeenconcentratie in mosselen is toegenomen terwijl deze juist afgenomen is in weefsel van Japanse oesters. Deze toenamen dan wel afnamen wordt m.n. veroorzaakt door verandering in gehalten gemeten tussen 2010 en 2011. Wellicht is er gelijk na het storten van de slakken en nieuw evenwicht ingesteld voor de molybdeenconcentraties. De variatie in molybdeenconcentratie tussen de jaren is groot, en een lange meetreeks van opeenvolgende jaren is nodig om vast te stellen of er een geleidelijke trend dan wel een verschuiving plaatst vindt/heeft gevonden. De ijzer- en vanadiumconcentraties in Japanse oesters lijken toe te nemen.

Gegevens over metaalconcentratie in water-, sediment en droge stof uit de MWTL monitoring zouden gebruikt kunnen worden voor het vaststellen van een eventueel meerjarige trend als aanvulling op gehalten gemeten in biota. Opgemerkt dient te worden dat molybdeen geen onderdeel uitmaakt van deze monitoring.

#### **3.2 Screening toxiciteit molybdeen**

Uit de toxiciteitscreening lijkt vooral het vrije molybdeen ion, dat vrijkomt als molybdeenchloride wordt opgelost voor toxische effecten te zorgen. De geoxideerde vorm (molybdaat) is weinig toxisch. Voor het inschatten van het milieurisico van de slakken is het daarom van belang om te weten in welke vorm het molybdeen uitloopt. Als dit als vrij ion is, zal het effect mede worden bepaald door de duur waarop het in deze vrije vorm aanwezig blijft.

Dit kan in aanvullend onderzoek eenvoudig worden vastgesteld door te testen hoe/of de toxiciteit van met molybdeenchloride gedoseerd water in de tijd verandert, bijvoorbeeld als gevolg van oxidatie van het molybdeen.

De definitieve vaststelling van de (afwezigheid van) effecten van uitlopende stoffen zou bestaan uit een langduriger studie waarbij in gesloten experimentele ecosystemen (mesocosms) de invloed van de slakken op de levensgemeenschap en de chemie kan worden vastgesteld, ten opzichte van een controle zonder slakken.

#### **4. Kwaliteitsborging**

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 124296-2012-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2015. 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 Vis 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.

## Referenties

- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14(9): 1--42.
- Heuvel-Greve, M.J. van den (2009). T0 monitoring vooroeververdediging Oosterschelde; cluster 1 – 2009. IMARES Wageningen UR, rapport C137/09.
- Heuvel-Greve, M. van den, A. van den Brink, S. Glorius, C. Schipper, M. de Kluijver, M. Dubbeldam (2011). Monitoring vooroeververdediging Oosterschelde 2010: T1 Cluster 1/T0 Cluster 2. IMARES Wageningen UR, rapport C029/11.
- Heuvel-Greve, M. van den, A. van den Brink, S. Glorius, C. Schipper, A. Gittenberger, M.J. de Kluijver, M. Dubbeldam (2012). Monitoring vooroeververdediging Oosterschelde en Westerschelde 2011: T2 Cluster 2. IMARES Wageningen UR, rapport C081/12.
- Heuvel-Greve, M. van den, A. van den Brink, S. Glorius, M.J. de Kluijver, en M. Dubbeldam (2013). Monitoring vooroeververdediging Oosterschelde 2012: T3 Cluster 1. IMARES Wageningen UR, rapport 102/13.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Tomlinson, D. L., Wilson, J. G., Harris, C. R., en Jeffrey, D. W. (1980). Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index, *Helgoland Marine Research* (33), pp 566 – 575.

## Verantwoording

Rapport C105/13

Projectnummer: 430.310.1403 – 2012 Vooroever OS

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: P. de Vries  
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 24 juli 2013

Akkoord: M. de Wit  
Afdelingshoofd Experimentele Ecologie

Handtekening:



Datum: 24 juli 2013

## Bijlage A. Methoden toxiciteitstesten

### 1. Mariene algengroeiremmingstest met *Phaeodactylum tricornutum*

#### Beschrijving test

De groeiremming van algen door blootstelling aan de monsterconcentraten is bepaald met de zgn. algen groeiremmingstest volgens ISO 10253 (2006) procedures. Een bekende hoeveelheid algen uit een exponentieel groeiende cultuur wordt blootgesteld aan een verdunningsreeks van het monster. Na 24, 48 en 72 uur wordt de groei van de algen fluorometrisch bepaald, waarna een exponentiële groeicurve bepaald kan worden. Een aanpassing van de standaard testprocedure betreft een reductie van het gebruikte volume gebaseerd op Blaise & Vasseur (2005), Peterson et al. (2005) en SCA (2009). De test wordt uitgevoerd in 96 well-microtiter platen, waarbij elke concentratie in achtvoud wordt ingezet met in elke well een totaal volume van 0,25 ml. Algen worden toegevoegd in een startconcentratie van ca. 10.000 cellen/ml (geteld onder een microscoop) en vervolgens doorgemeten met de fluorometer. Daarnaast werden een aantal wells gevuld zonder algen waardoor correctie voor achtergrondwaarden en kleur mogelijk is. Als effectparameter geldt de percentuele remming van de algengroei ten opzichte van een niet blootgestelde controlegroep.

#### Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de algen wordt bepaald door deze bloot te stellen aan een stof waarvan de toxiciteit bekend is (kaliumdichromaat). Daarnaast wordt de groeisnelheid van de algen in de controlegroep gecontroleerd en vergeleken met de voorwaarden zoals beschreven in de normen.

#### Karakteristieken

Testorganisme	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (exponentieel groeiende cultuur)
Testduur	72 uur
Testvolume	0,25 ml
Aantal replica's	8
Testkamer	96 wells microtiter plaat
Temperatuur	20±2°C
Verdunningswater	Algenmedium F2
Test protocol	ISO 10253 (aangepast voor klein volume)
Referentie toxicant	Kaliumdichromaat
Groeisnelheid controle	Factor 19 $\mu_c > 0,9 \text{ r}^{-1}$
Toxicologische observaties	Inhibitie van groei
Toxicologische parameters	$E_r C_{50}$ (48, 72h), NOEC, LOEC

#### Statistiek

Voor de berekeningen van de  $EC_{50}$  (Effect Concentratie voor 50% groei-inhibitie) zijn eerst de individuele groeisnelheden van de algen bepaald aan de hand van de kleinste kwadraten methode volgens Weisstein (2008a). De groeisnelheden van de controles werden getoetst aan de randvoorwaarde. De procentuele inhibitie van de concentraties is berekend met behulp van de volgende formule:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100\% \quad (1)$$

Waarin:  $I_{\mu i}$  = procentuele inhibitie voor elke test concentratie  $i$  (%)  
 $\mu_i$  = groeisnelheid van elke test concentratie  $i$  ( $\text{r}^{-1}$ )  
 $\mu_c$  = gemiddelde groeisnelheid van de controle ( $\text{r}^{-1}$ )



De EC<sub>50</sub> en de betrouwbaarheidsintervallen werden berekend door gebruik te maken van een 'sigmodal dose response curve' met een variabele helling (ISO-TS 20281, 2006). Hierbij werd uitgegaan van een maximale inhibitie van 100% (correctie negatieve groei: sterfte) en een minimale inhibitie van 0% (gemiddelde blanco). Voor de berekening van de EC<sub>50</sub> is gebruik gemaakt van de volgende formule:

$$y = \frac{100}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) * Hillslope}} \quad (2)$$

Waarin: EC<sub>50</sub> = Concentratie waarbij 50% effect is gevonden (v/v%)  
x = Concentratie van de verdunning (v/v%)  
y = Specifieke procentuele inhibitie μ (%)  
Hillslope = slope van de logistische curve (-)

Zowel de EC<sub>50</sub> als de Hillslope zijn onbekende waarden in deze formule en werden bepaald met behulp van de Gauss-Newton algoritme voor niet lineaire regressie. In de Gauss-Newton algoritme werden de onbekende waarden iteratief geschat door gebruik te maken van de Jacobiaan matrix zoals beschreven door Weisstein (2008b).

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de LOEC niet hoger is dan 20% (ECB, 2003).

#### Referenties

- Blaise C. & P. Vasseur (2005): Algal microplate toxicity test. In: C. Blaise & J.-F. Féraud (eds.), Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Vol. 1. pp. 137-179.
- European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.
- ISO 10253 (2006): Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.
- ISO (2006): International Standard. Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. First edition 2006-04-01. ISO/TS 20281:2006(E).
- Peterson H.G., N. Nyholm & N. Ruecker (2005): Algal microplate toxicity test suitable for heavy metals. In: C. Blaise & J.-F. Féraud (eds.), Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Vol. 1. pp. 243-270.
- SCA (2009): The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the *Skeletonema costatum* marine algal growth inhibition test. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. Standing Committee of Analysts. Environment Agency (National Laboratory Service). Rothley Leicestershire, UK.
- Weisstein, E.W. (2008a): "Least Squares Fitting--Exponential." From MathWorld - A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html> (Aug 5th, 2008)
- Weisstein, E.W. (2008b): "Jacobian." From MathWorld - A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/Jacobian.html> (Aug 13th, 2008)

## 2. Mariene acute toxiciteitstest met de crustacean *Acartia tonsa*

### Beschrijving

De acute *Acartia* mortaliteitstest is gebaseerd op ISO 14669 (1999). De testen worden uitgevoerd in viervoud waarbij elke concentratie een volume heeft van 25 ml. In elk testsysteem worden 5 volwassen kreeftachtigen gedurende 48 uur blootgesteld aan een concentratiereeks van het monster. Na 24 en 48 uur wordt het aantal levende en dode individuen gescoord.

### Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de kreeftachtigen wordt bepaald door deze bloot te stellen aan een stof waarvan de toxiciteit bekend is (dichlorofenol). Tevens wordt getoetst of aan het eind van de test >90% van de kreeftachtigen in de blanco's nog levend was.

### Karakteristieken

Testorganisme	<i>Acartia tonsa</i>
Saliniteitrange	29-35 ‰
Testduur	48 uur
Testvolume	25 ml
Aantal test organismen/replica	5
Aantal replica's	4
Temperatuur	20±2°C
Verdunningswater	Gefilterd zeewater
Test protocol	ISO 14669
Referentie toxicant	dichloorfenol
Toxicologische observaties	Sterfte
Toxicologische parameters	LC50 (24, 48h), NOEC, LOEC

### Statistiek

De LC50 en de betrouwbaarheidsintervallen zijn berekend door gebruik te maken van een 'sigmodal dose response curve' met een variabele helling (ISO-TS 20281, 2006) ingebouwd in het software programma GraphPad Prism (versie 4.03). Hierbij is uitgegaan van een maximaal effect van 100% en een minimaal effect tussen 0 en 10% (randvoorwaarde blanco). GraphPad Prism maakt gebruik van de volgende formule:

$$y = \text{Bottom} + \frac{100 - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log LC50 - x) * \text{Hillslope}}} \quad (3)$$

Waarin:

LC50 = Concentratie waarbij 50% effect is gevonden op letaliteit (v/v%)

x = Concentratie van de verdunning (v/v%)

y = Specifieke procentuele effect (%)

Bottom = Minimum procentuele effect (0-10%)

Hillslope = slope van de logistische curve (-)

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de LOEC niet hoger is dan 20% (ECB, 2003).

### Referenties

European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.

ISO 14469 (1999): Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO 14669:1999(E).

ISO (2006): International Standard. Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. First edition 2006-04-01. ISO/TS 20281:2006(E).

### 3. Bacterie luminescentieremmingstest met *Vibrio fischeri* (Microtox®)

#### Beschrijving

De bacterie luminescentieremmingstest die is toegepast, is bekend onder de merknaam Microtox® Basic test. De test is gebaseerd op blootstelling van de bioluminescerende (lichtproducerende) mariene bacterie *Vibrio fischeri* aan een waterige oplossing. De mate van acute toxiciteit, uitgedrukt als EC<sub>50</sub> van een monster, wordt bepaald aan de hand van de remming van de luminescentie geproduceerd door *Vibrio fischeri* blootgesteld aan een concentratiereeks van de teststof.

De gevolgde procedure betreft een breed toegepaste standaard methode die is gebaseerd op Azur Environmental (1998) waarbij gevriesdroogde bacteriën vlak voor blootstelling aan het monster weer worden gereconstitueerd. Een monster wordt ingezet in een verdunningsreeks, na respectievelijk 5, 15 en 30 minuten wordt de lichtemissie gemeten.

#### Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de gebruikte batch bacteriën is gecontroleerd door de gevoeligheid te testen voor de chemische stof fenol, waarvan de toxiciteit bekend is.

#### Karakteristieken

Testorganisme	<i>Vibrio fischeri</i>
Testduur	30 minuten
Testvolume	1 ml
Aantal replica's	1
Temperatuur	15±2°C
Verdunningswater	Diluent (2%-NaCl)
Test protocol	AZUR Environmental Basic Test (1998)
Referentie toxicant	Fenol
Toxicologische observaties	Remming van luminescentie
Toxicologische parameters	EC <sub>50</sub> (5, 15, 30 minuten), NOEC, LOEC

#### Statistiek

Voor de bepaling van de EC<sub>50</sub> en de 95% betrouwbaarheidsintervallen is gebruik gemaakt van de MicrotoxOmni software (versie 1.18) bijgeleverd bij de meetapparatuur.

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de LOEC niet hoger is dan 20% (ECB, 2003).

#### Referenties

AZUR Environmental (1998): Microtox Basic test procedure. Templateid3.pdf

European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.

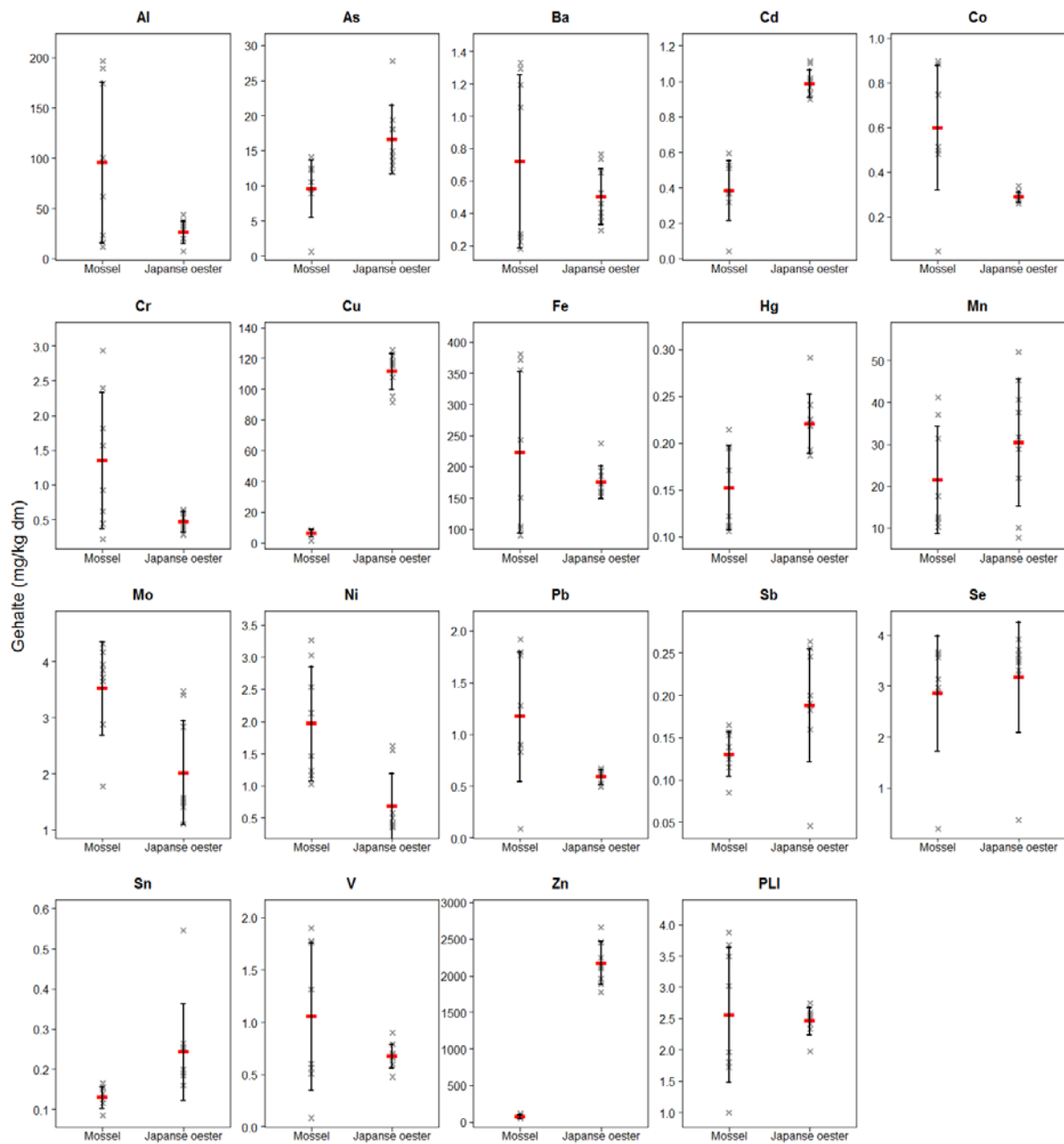
ISO (2007): International Standard. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Second edition 2007-12-01. ISO 11348-3:2007(E).

## Bijlage B. Variatie in metaalconcentratie.

Tabel 4. Gemiddelde, variatie en significantie trend metaalconcentratie mosselen en oesters.

Parameter	Eenheid	Mosselen					Japanse oester				
		Gem.	Var.	SD	R <sup>2</sup>	p	Gem.	Var.	SD	R <sup>2</sup>	p
Droge stof	%	15.8	13.7	3.70	0.131	0.679	10.2	3.77	1.94	0.141	0.172
Al	mg/kg dm	96.8	6403	80.0	0.064	0.270	27.3	124.3	11.2	-0.052	0.462
As	mg/kg dm	9.67	16.9	4.12	0.081	0.515	16.7	23.9	4.89	-0.143	0.979
Ba	mg/kg dm	0.73	0.29	0.53	0.056	0.279	0.506	0.030	0.174	0.553	<b>0.013</b>
Cd	mg/kg dm	0.39	0.03	0.17	0.073	0.497	0.992	0.006	0.078	0.065	0.252
Co	mg/kg dm	0.60	0.08	0.28	0.163	0.889	0.292	0.001	0.023	0.109	0.656
Cr	mg/kg dm	1.36	0.96	0.98	0.026	0.399	<i>0.482</i>	<i>0.023</i>	<i>0.150</i>	<i>-0.121</i>	<i>0.725</i>
Cu	mg/kg dm	6.99	5.40	2.32	0.017	0.383	112.1	137.7	11.7	-0.120	0.718
Fe	mg/kg dm	225	16652	129	0.048	0.289	177.0	696	26.4	0.431	<b>0.033</b>
Hg	mg/kg dm	0.153	0.002	0.045	0.018	0.385	0.221	0.001	0.032	0.152	0.163
Mn	mg/kg dm	21.7	163.2	12.8	0.129	0.671	30.6	232	15.2	-0.141	0.926
Mo	mg/kg dm	3.54	0.70	0.83	0.627	<b>0.012</b>	2.03	0.86	0.93	0.521	<b>0.017</b>
Ni	mg/kg dm	1.98	0.79	0.89	0.129	0.204	0.69	0.26	0.51	0.059	0.260
Pb	mg/kg dm	1.18	0.39	0.63	0.166	0.957	0.60	0.01	0.07	-0.064	0.494
Sb	mg/kg dm	<i>0.132</i>	<i>0.001</i>	<i>0.027</i>	<i>0.167</i>	<i>0.999</i>	<i>0.19</i>	<i>0.00</i>	<i>0.07</i>	<i>0.102</i>	<i>0.624</i>
Se	mg/kg dm	2.88	1.28	1.13	0.014	0.335	3.19	1.17	1.08	0.404	<b>0.039</b>
Sn	mg/kg dm	<i>0.13</i>	<i>0.00</i>	<i>0.03</i>	<i>0.167</i>	<i>0.999</i>	<i>0.24</i>	<i>0.01</i>	<i>0.12</i>	<i>0.647</i>	<b>0.005</b>
V	mg/kg dm	1.06	0.50	0.70	0.124	0.651	0.68	0.01	0.12	0.433	<b>0.032</b>
Zn	mg/kg dm	85.7	601.2	24.5	0.161	0.875	2186	87197	295	0.140	0.890
PLI	(-)	2.57	1.16	1.08	0.131	0.678	2.47	0.05	0.22	0.026	0.401

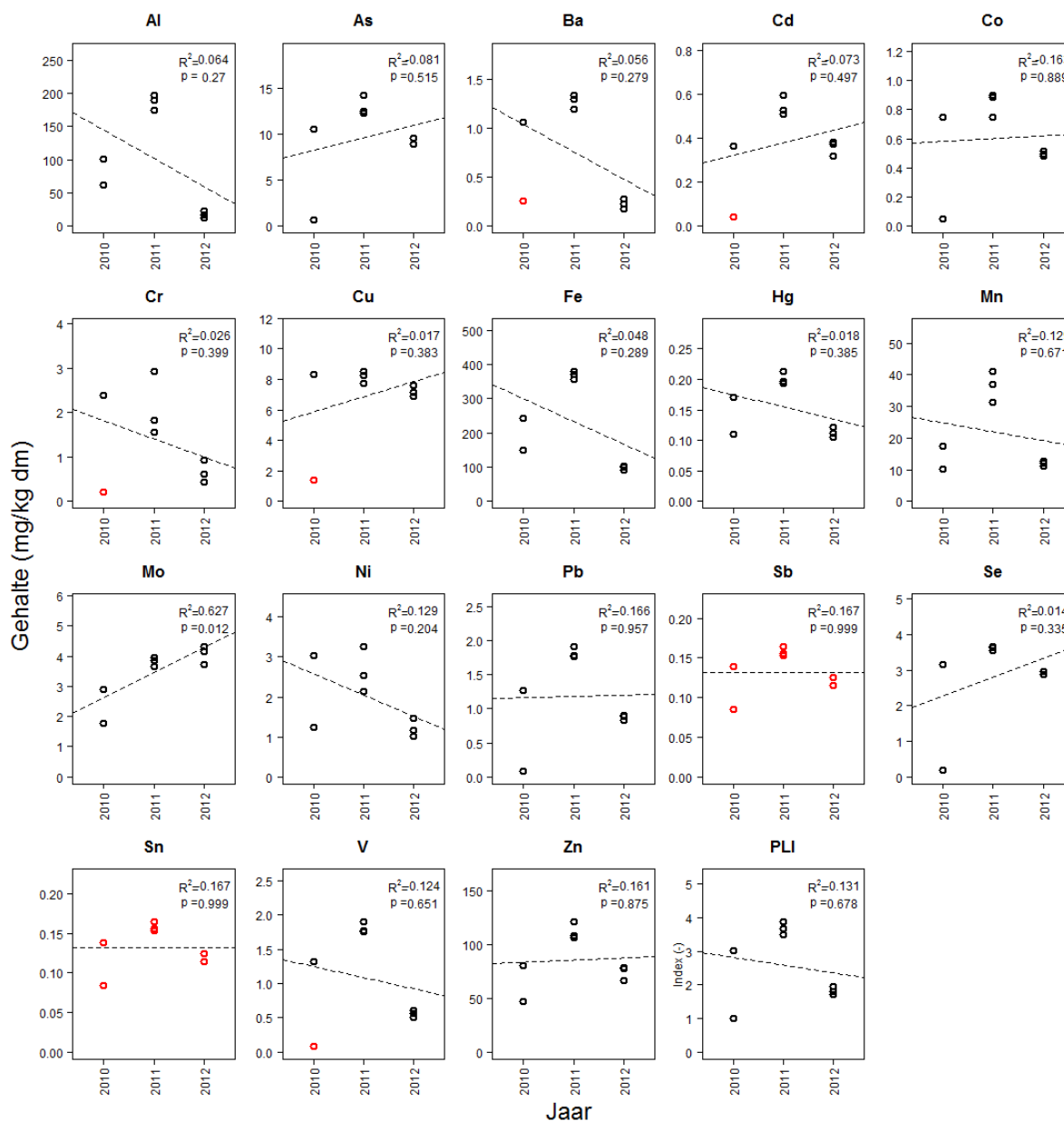
## Variatie metaalgehalte



Figuur 4: Spreiding metaalconcentraties in mosselen en Japanse oester in de periode 2009 tot en met 2012. Met grijze sterren worden individuele metingen weergegeven. Met de rode horizontale lijnen wordt het gemiddelde weergegeven, errorbars geven 2 x standaardafwijking weer en zijn in zwarte verticale lijnen afgedrukt.

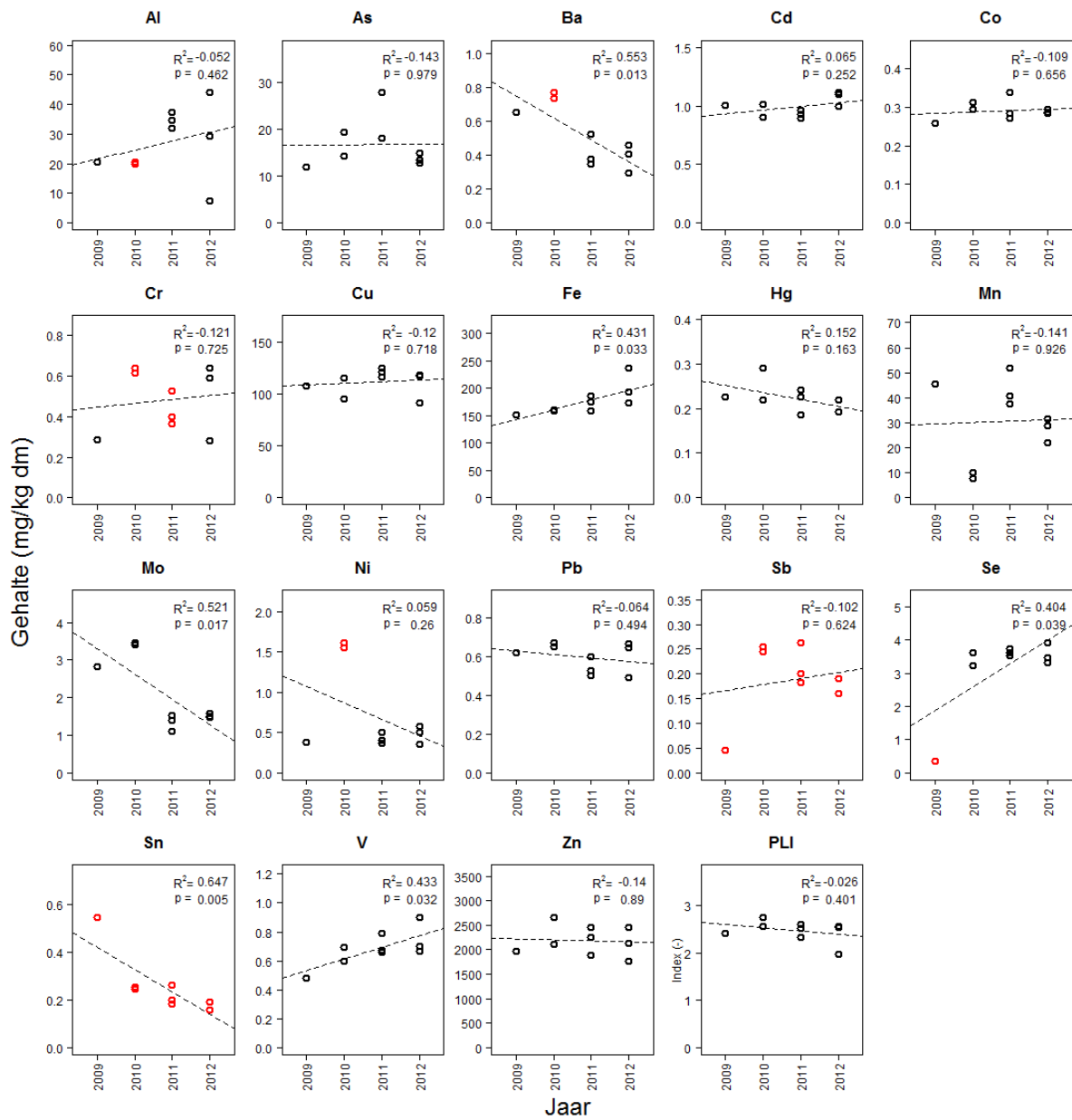
## Bijlage C. Temporele trend in metaalconcentratie.

### Concentratie metalen in mosselweefsel - Zeelandbrug de Pijler



Figuur 5: Trend in metaalconcentratie gemeten in mosselen. Rode datapunten betreffen waarden < detectielimiet. Met de stippellijn wordt de lineaire trendlijn weergegeven.

## Concentratie metalen in weefsel Japanse oester - Zeelandbrug de Pijler



Figuur 6: Trend in metaalconcentratie gemeten in Japanse oesters. Rode datapunten betreffen waarden < detectielimiet. Met de stippellijn wordt de lineaire trendlijn weergegeven.