



Jan Baas, Vrije Universiteit Amsterdam

Henk Hoogenboom, Hoogheemraadschap van Delfland

Bas Kooijman, Vrije Universiteit Amsterdam

Sterfte van *Daphnia* in beheergebied Delfland verklaard

Binnen de afdeling theoretische biologie van de Vrije Universiteit van Amsterdam zijn modellen ontwikkeld om voorspellingen te kunnen doen over effecten van mengsels van chemische stoffen. Deze modellen zijn gebruikt om de door Hoogheemraadschap van Delfland gemeten chemische verontreiniging (onder andere PAK, PCB, metalen en pesticiden) te relateren aan de eveneens gemeten sterfte van in situ blootgestelde watervlooien (*Daphnia magna*). De modellen hadden een erg goede voorspellende waarde: in 92 procent van de onderzochte gevallen werd een juiste voorspelling gedaan over het optreden van sterfte onder de watervlooien. In geval van sterfte kon worden aangegeven welke (combinatie van) stof(fen) de waargenomen sterfte veroorzaakt. Verder bleek uit het onderzoek dat het voldoen aan de MTR-waarden niet automatisch betekent dat aan de randvoorwaarden voor een goede ecologische waterkwaliteit zal worden voldaan. Hiervoor zal in de evaluatie van de KRW aandacht moeten worden gevraagd.

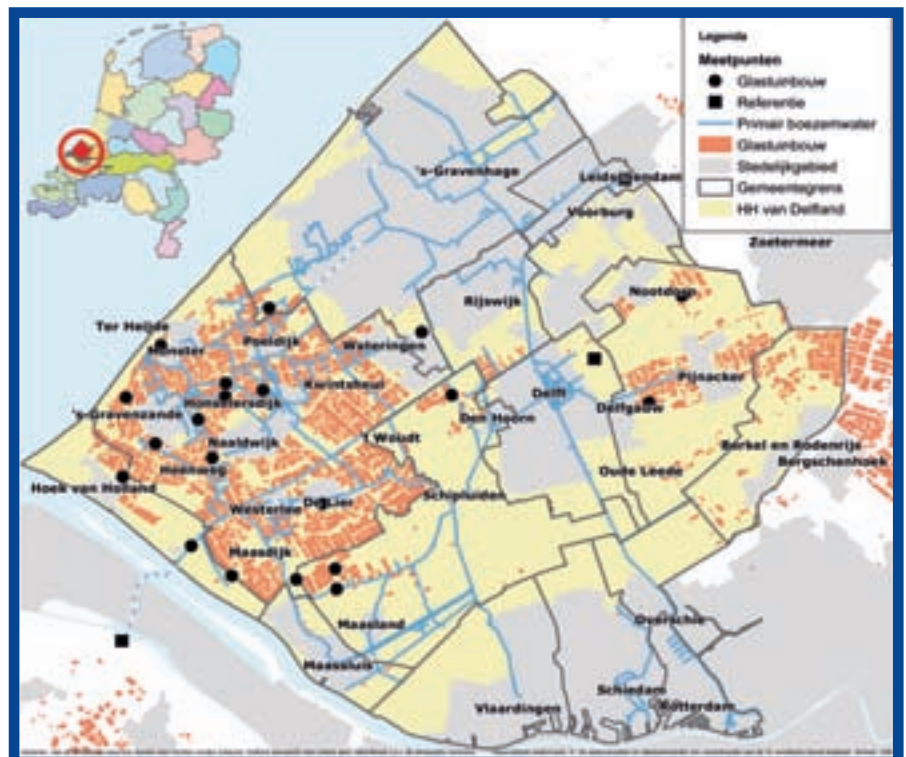
Onderzoeken naar effecten van stoffen en normen zijn vrijwel altijd gebaseerd op blootstelling aan één enkele stof. In natuurlijke ecosystemen echter worden organismen niet blootgesteld aan enkelvoudige stoffen, maar aan mengsels. De laatste jaren groeit daarom de belangstelling voor effecten van stoffen in mengsels en komen er steeds meer aanwijzingen dat in mengsels effecten op kunnen treden in concentratieranges, waarin enkelvoudige stoffen geen effecten laten zien¹⁾. Daar het onmogelijk is om van zelfs maar een fractie van alle voorkomende mengsels effecten experimenteel vast te stellen, wordt binnen de afdeling Theoretische Biologie van de Vrije Universiteit Amsterdam in het kader van het Europese project NoMiracle gewerkt aan mechanistische modellen om effecten van mengsels te kunnen voorspellen. De nadruk ligt daarbij op effecten op overleving. Omdat de aanpak is gebaseerd op de mechanismen achter de toxiciteit, kan - indien er een effect op overleving is - ook worden aangegeven welke stof of stofgroepen bepalend is/zijn voor het waargenomen effect.

Doel van het onderzoek was het toepassen van het mengselmodel op de door het Hoogheemraadschap van Delfland gemeten chemische verontreiniging in combinatie met de overleving van in situ blootgestelde watervlooien (zie voor een uitgebreide beschrijving van het meetnet, de monster-

neming voor de chemische analyse en de wijze waarop de watervlooien worden blootgesteld de rapportage van Delfland²⁾.

Het beheergebied van het Hoogheemraadschap van Delfland omvat circa 3.700 hectare glastuinbouw (zie afbeelding 1).

Afb. 1: Het beheergebied van het Hoogheemraadschap van Delfland, met daarin aangegeven de monster-nemingspunten.



Een deel van de gebruikte gewasbeschermingsmiddelen, de afbraakproducten van deze middelen en meststoffen komt in het oppervlaktewater terecht. Daarnaast wordt het oppervlaktewater belast met zware metalen door afspoeling van regenwater via de zinken dakgoten van de kassen. Ook historische belastingen vanuit de industrie (PCB), de glastuinbouw (organochloorverbindingen) en door uitloggen en verrotten van verduurzaamd hout uit de waterbouw (PAK en zware metalen) beïnvloeden de ecologische kwaliteit van vooral de waterbodembodem nog steeds negatief.

Sinds 1990 onderzoekt het Hoogheemraadschap van Delfland het effect van verontreinigingen in het oppervlaktewater op de overleving van in situ blootgestelde watervlooiën. Het onderzoek begon op 14 locaties in het glastuinbouwgebied en op drie referentielocaties waar de invloed van de glastuinbouw verwaarloosbaar werd geacht. In 1994, 2000 en 2006 vonden herzieningen van het meetnet plaats. Op ieder meetpunt werd de overleving van de watervlooiën maandelijks in de periode mei tot en met oktober uitgevoerd. De chemische analyses vonden in de regel maandelijks jaarrond plaats.

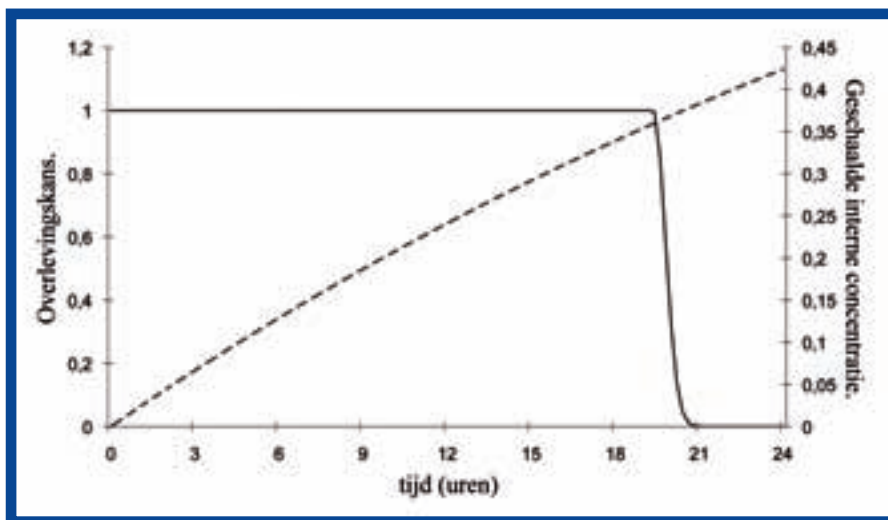
De *Daphnia* werden blootgesteld in een glazen pot met een glazen deksel. Deze pot werd op locatie voor driekwart gevuld met oppervlaktewater. Vervolgens werden tien watervlooiën van tien dagen oud met een pipet in de glazen pot overgeheveld. De pot werd met een steen aan een touw verzwaard op zijn kop in het water opgehangen. Na een week blootstelling werden de nog levende watervlooiën geteld.

Naast het uitzetten van veldkooien met *Daphnia* werd een scala aan verontreinigende componenten gemeten: 36 bestrijdingsmiddelen, 10 nutriënten en zouten, 14 PAKs, 13 PCBs, 10 zware metalen en in totaal 22 algemene parameters als stroming, pH, zuurstof en elektrisch geleidend vermogen in het oppervlaktewater. Deze metingen vonden altijd in de directe omgeving plaats in de week volgende op de datum dat de watervlooiën werden uitgezet.

Conceptuele beschrijving modelleerwerk

Het effect van het mengsel wordt opgebouwd uit de effecten van de individuele stoffen. Daarom moeten per stof de parameters die hun effect kunnen beschrijven, worden bepaald. Vervolgens wordt dit doorgerekend naar het effect van de combinatie van stoffen zoals die is gemeten.

De belangrijkste parameter is de zogeheten No Effect Concentratie voor overleving (of NEC). De NEC is de concentratie in het milieu waaronder geen effecten optreden op overleving van de *Daphnia*. Daarnaast zijn twee andere parameters nodig die worden gebruikt om te bepalen hoe snel en hoe sterk het effect van de verontreiniging doorwerkt op de *Daphnia* zodra de NEC wordt overschreden.



Afb. 2: Voorbeeld van het effect van de gemeten concentratie diazinon op de overleving van watervlooiën. De concentratie diazinon in de watervlooi neemt toe in de tijd (stippellijn), totdat een drempelwaarde wordt overschreden, op ongeveer 19 uur na de start van de blootstelling. De kans om dan te overleven neemt daarna sterk af en na circa 21 uur zijn de uitgezette watervlooiën allemaal dood (getrokken lijn)

In essentie neemt de uitgezette watervlooi de stoffen op en zodra er een drempelconcentratie wordt overschreden (welke correspondeert met de NEC zoals die in het milieu voorkomt) neemt de kans om dood te gaan toe, afhankelijk van hoe snel een stof wordt opgenomen en de stoffeïenschappen. In afbeelding 2 is een voorbeeld gegeven voor het effect van diazinon op de sterfte van de watervlooiën. De gemeten concentratie bedroeg 4.1 nM en de NEC bedroeg 1.1 nM. De stippellijn laat de toename van de interne concentratie zien en de onderbroken lijn de sterftekans. Zodra de interne drempelwaarde wordt overschreden is in dit geval de watervlooi populatie binnen enkele uren daarna uitgestorven. In totaal duurt dat in dit geval ca 21 uur. Bij voorkeur worden de parameters van een stof bepaald uit meetgegevens van het verloop van effecten in de tijd. Voor de meeste stoffen zijn dit

soort gegevens echter niet beschikbaar en zijn de parameters bepaald uit het verloop van tenminste drie gerapporteerde concentraties waarbij de helft van de blootgestelde organismen sterft (de LC50) in de tijd. Hiervoor is gebruik gemaakt van openbaar beschikbare data³⁾.

Om het effect van het mengsel te bepalen, zijn stoffen uit dezelfde chemische groep (bijvoorbeeld de organofosfor-pesticiden) samen genomen. Deze stoffen delen de zogeheten no effect-concentratie, waardoor in de mengsels in veel lagere concentraties effecten op kunnen treden dan bij blootstelling aan enkelvoudige stoffen. Zo ontstaat voor iedere stof of stofgroep een NEC. Als een NEC wordt overschreden, kunnen we met deze aanpak uitrekenen wat het effect is op overleving van *Daphnia* en is direct het verband met de stof of stofgroep

Toegelaten maximumconcentraties in oppervlaktewater, vergeleken met de NEC voor effecten op overleving van *Daphnia magna*.

	MTR (opgelost) µM	NEC µM	NEC/MTR
PAK			
fenanthreen	1.68 E-3	1.3	770
anthraceen	0.39 E-3	1.3	3300
fluorantheen	1.48 E-3	0.46	310
benz-a-pyreen	0.20 E-3	0.032	160
metalen			
koper	2.3E-2	6.8E-1	29
cadmium	3.6E-3*	8.9E-3	2.5
zink	1.4E-1	3.1E 0	21
chromium	0.2E-1	3.1E+2	1839
nikkel	8.7E-2	4.3E 0	49
pesticiden			
diazinon	1.2E-4	1.12E-3	9
dichloorvos	3.2E-6	2.83E-1	89335
mevinos	8.9E-6	4.46E-3	500
parathion-ethyl	6.9E-6	1.13E-3	165

* Deze norm wordt herzien.



Joep de Koning van het Hoogheemraadschap van Delfland tijdens het uitzetten van de watervlooien

die het effect bepaalt, gelegd. Als geen van de NECs wordt overschreden, is er geen effect op overleving. Het afleiden van de NECs voor de verschillende stoffen geeft ook de mogelijkheid om een vergelijking te maken tussen de NECs en de bestaande maximum toelaatbaar risico (MTR)-concentraties.

Resultaten

Ten tijde van de data-analyse waren experimentele resultaten beschikbaar van 1990 tot en met 2007. Gaande van 1990 naar 2007 neemt de sterfte onder de uitgezette *Daphnia* af, maar neemt het aantal gemeten componenten toe. Er is voor gekozen om het jaar 2000 als basisjaar te nemen. In totaal waren 104 datasets beschikbaar uit dat jaar: 31 datasets met volledige overleving, 38 met een partieel effect en 35 zonder overleving.

Uit een analyse van de beschikbare gegevens blijkt dat alleen de data waar er een volledig effect is (ofwel geen overleving ofwel volledige overleving), goed gedefinieerd zijn. Daarom is alleen naar deze data gekeken. Verder zijn alleen die datasets gebruikt waar een volledige meting van chemische verontreiniging beschikbaar is. Hierdoor bleven uiteindelijk 37 datasets over, waarvan 20 zonder effect en 17 met totale sterfte onder de watervlooien.

Van de 20 datasets zonder sterfte wordt dit in 19 gevallen ook juist voorspeld: geen van de NECs wordt overschreden. Van de 17 datasets waarbij sterfte wordt gemeten, is dit in 15 gevallen ook voorspeld. In één geval wordt de NEC van zink net overschreden, maar wordt toch geen sterfte waargenomen. In het tweede geval wordt de NEC en de 48 hr LC50 voor pirimifos-methyl overschreden, maar treedt toch geen sterfte op. Waarschijnlijk is de gemeten concentratie niet representatief geweest voor de hele blootstellingsperiode.

Discussie

Het concept van de 'geen effect'-concentratie blijkt een krachtige benadering voor het voorspellen van effecten na blootstelling aan complexe mengsels. Ondanks de vaak slechte uitgangsparameters, vaak liggen in de literatuur gerapporteerde LC50-waarden meer dan een orde van grootte uiteen, blijkt de voorspelling over het al dan niet optreden van sterfte onder de watervlooien in 92 procent van de gevallen juist.

In geval van sterfte is het ook mogelijk om aan te geven welke stof of combinatie van stoffen de sterfte veroorzaakt. In op één na alle gevallen wordt de waargenomen sterfte veroorzaakt door een hoge concentratie van een enkele stof. Van de bestrijdingsmiddelen is vooral pirimifos-methyl een stof die vaak sterfte veroorzaakt (drie maal). Daarnaast hebben diazinon en parathion beiden éénmaal de sterfte veroorzaakt. Verder zijn een te hoge pH of een te laag zuurstofgehalte beiden drie maal en een te hoog chloridegehalte éénmaal verantwoordelijk voor de waargenomen sterfte. In één geval werd de NEC voor een individuele stof niet overschreden, maar wel voor het mengsel van de pesticiden. Dit is een mooi voorbeeld van een effect van een mengsel; alle individuele stoffen afzonderlijk leiden niet tot een effect, maar tezamen wel.

Een vraag die vaak wordt gesteld, is hoe erg het is als een norm wordt overschreden. Deze vraag is niet eenvoudig te beantwoorden, maar een vergelijking van de NECs met de gegeven MTR-waarden voor de verschillende stoffen⁴⁾ geeft wel enig inzicht. In de tabel is een overzicht gegeven.

Het is goed te realiseren dat de vergelijking alleen een indicatie geeft. De MTR-waarde is bedoeld om het ecosysteem te beschermen en accepteert dat vijf procent van de blootgestelde soorten schade ondervindt. De gegeven NEC heeft betrekking op overleving

van *Daphnia* voor blootstelling aan alleen die stof. Voor reproductie of groei zullen naar verwachting op een veel lager concentratieniveau effecten optreden. Maar ook in de mengsels komen effecten op een lager concentratieniveau dan de gegeven NEC voor, zoals de metingen bevestigen.

De twee meest in het oog springende zaken in de tabel zijn de relatief hoge MTR-waarden van de metalen en voor diazinon. Voor diazinon geldt net als voor veel andere nieuwere bestrijdingsmiddelen een uniforme ad hoc norm van 2 ng/l. Vooral voor de potentere insecticiden biedt deze norm nauwelijks bescherming. Voor koper, cadmium en zink biedt de MTR nauwelijks enige bescherming voor watervlooien. Een betrekkelijk kleine overschrijding van de norm kan al direct tot sterfte leiden bij blootstelling aan de enkelvoudige stof. In mengsels kan afhankelijk van de concentraties van de overige aanwezige metalen al op het concentratieniveau van de MTR sterfte optreden. Als er op dit niveau sterfte wordt verwacht onder watervlooien, is het redelijk om aan te nemen dat het uitgangspunt van de MTR - bescherming van 95 procent van de soorten - niet wordt gehaald.

Conclusies

We hebben succesvol een fundamenteel verband kunnen leggen tussen een gegeven chemische verontreiniging en de overleving van watervlooien. Het blijkt mogelijk om het optreden van effecten op overleving van watervlooien te voorspellen. Als effecten optreden, kunnen we aangeven welke stof of stofgroep dat effect veroorzaakt. De sterfte wordt vooral veroorzaakt door uitschieters in concentraties van enkele stoffen, maar ook een hoge pH of een lage zuurstofconcentratie veroorzaken sterfte onder de watervlooien. Het belangrijkste dat dit onderzoek echter laat zien, is dat het voldoen aan de MTR-waarden niet automatisch betekent dat aan de randvoorwaarden voor een goede ecologische waterkwaliteit zal worden voldaan. Hiervoor zal in de evaluatie van de KRW aandacht moeten worden gevraagd.

LITERATUUR

- 1) Baas J., J. Willems, T. Jager, M. Kraak, T. Vanderbrouck en S. Kooijman (2009). Prediction of survival after in situ exposure to complex mixtures. Environmental Science and Technology. In voorbereiding.
- 2) Hoogheemraadschap van Delfland (2005). Delfland in breedbeeld. Een breed beeld van het watersysteemonderzoek t/m 2004.
- 3) Kegley S., B. Hill, S. Orme en A. Choi (2008). PAN pesticide database. Pesticide Action Network, San Francisco.
- 4) Commissie Integraal Waterbeheer (2000). Normen voor het waterbeheer. Achtergronddocument NW4.