



DE TOEPASBAARHEID VAN TOXICITY IDENTIFICATION EVALUATION OP AFVALWATER- EN WATERBODEMMONSTERS

Als Sherlock Holmes op zoek naar oorzaken van toxiciteit

ING. S. ROTTEVEEL, RIZA
DRS. R. BERBEE, RIZA
DR. P. DEN BESTEN, RIZA
DRS. M. TONKES, RIZA

Een methode om de toxiciteit van afvalwater te kunnen verklaren is door de US-EPA ontwikkeld¹⁻³⁾. Deze methode heet Toxicity Identification Evaluation (TIE) en bestaat uit relatief simpele fractioneringstechnieken in combinatie met bioassays. Het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) heeft onderzocht in hoeverre deze techniek toepasbaar is in de Nederlandse situatie⁴⁾. Hierbij is niet alleen gekeken naar de bruikbaarheid bij het beoordelen van afvalwater, maar ook naar de mogelijkheden om deze methode in te zetten bij het onderzoek aan verontreinigde waterbodems. Uit dit onderzoek is duidelijk geworden dat de basisprincipes van de EPA-methode ook in Nederland kansen bieden.

In het waterkwaliteitsbeheer wordt steeds meer gebruik gemaakt van de parameter toxiciteit bij de beoordeling van afvalwater op milieubezwaarlijkheid. Een voorbeeld hiervan is de Totaal Effluent Beoordelingsmethodiek. Deze methodiek stelt een lozer of beherende instantie in staat de kwaliteit van complexe effluënten te beoordelen aan de hand van een reeks van effectgerichte parameters⁵⁾. Verontreinigde waterbodems worden beoordeeld op toxiciteit met behulp van de TRIADE-benadering⁶⁾.

Bij geconstateerde toxiciteit van een afvalwater of een waterbodem ontstaat meestal de behoefte om te weten welke stoffen voor het effect verantwoordelijk zijn. Met deze kennis ontstaat immers de mogelijkheid om gericht iets aan de toxiciteit te kunnen doen. Zo kan inzicht in de oorzaak van de toxiciteit van een waterbodem helpen bij het beoordelen van het nut van een herstel ingreep.

Identificatie-methodiek (TIE)

De methode bestaat uit drie fasen waarin stap voor stap de oorzaak van de gemeten toxiciteit achterhaald kan worden. Het principe in de eerste fase berust op het behandelen of fractioneren van een monster (afvalwater of poriewater uit een waterbodemonster), waarbij toxicanten afhankelijk van hun fysisch-chemische eigenschappen wel of niet in een fractie achterblijven. De toxiciteit van deze fracties wordt vergeleken met die van het onbehandelde monster. In tabel 1 staat weergegeven

welke fractioneringstechnieken in fase 1 worden toegepast en op welke stofgroepen de bewerking van invloed is. Op basis van de informatie uit fase 1 worden in fase 2 technieken en analysemethoden geselecteerd om de toxicant(en) in het monster te identificeren. Nadat de toxicant(en) zijn geïdentificeerd kan in fase 3 bevestigd worden dat de juiste toxicant(en) zijn geïdentificeerd.

Bioassays

Voor een TIE moet een bioassay regelmatig worden herhaald. Daarom is het van groot belang dat de gebruikte bioassay niet alleen effect geeft, maar ook snel en gemakkelijk uitvoerbaar is. De Microtox voldoet aan deze eisen. In deze test wordt gebruik gemaakt van bacteriën (*Vibrio fischeri*) die licht uitzenden

als gevolg van hun stofwisseling. Toxische stoffen kunnen deze stofwisselingsreactiviteit negatief beïnvloeden. Het gevolg is een verlaging van de hoeveelheid licht die wordt uitgezonden. Door de bacteriën bloot te stellen aan een monster en vervolgens de lichtremming te meten wordt een maat voor de toxiciteit verkregen. Deze wordt weergegeven als de effect concentratie waarbij 20 procent of 50 procent lichtremming optreedt (EC₂₀ of EC₅₀) na een bepaalde blootstellingsperiode (5, 15 of 30 minuten).

Er is ook gebruik gemaakt van de Thamnotoxkit F. In deze bioassay wordt gebruik gemaakt van een kreeftachtige (*Thamnocephalus platyurus*). Aan een verdunningsreeks van het monster worden de organismen gedurende 24 uur blootgesteld. Na deze blootstelling wordt de sterfte per testconcentratie geteld. Uit deze resultaten kan een LC₅₀ waarde (concentratie met 50 procent sterfte) berekend worden.

Toepassingsvoorbeelden Afvalwatermonster

Een aantal fase 1 bewerkingen is toegepast op een complex industrieel afvalwatermonster dat toxisch was voor de Microtox. Het monster is genomen na de fysisch-chemische zuiveringsinstallatie van een bedrijf dat onder meer organotinverbindingen produceert. Alvorens geloosd wordt op oppervlaktewater, wordt dit afvalwater nog nagezuiverd in een biologische zuiveringsinstallatie. De resultaten zeggen daarom alleen iets over de toxiciteit van deze deelstroom. Naast het volgen van de toxiciteitsveranderingen als gevolg van de fase 1 bewerkingen is een aantal bewerkingen ook fysisch-chemisch gecontroleerd.

Waterbodemonsters

Op acuut toxisch poriewater van twee waterbodems zijn de meest zinvolle bewerkin-

Tabel 1: Type toxicanten waarvoor fase 1 bewerkingen specifiek zijn¹⁾.

TIE-bewerking	Type toxicant waarvoor de bewerking specifiek is:
Beluchten (met perslucht)	De toxicant is oxydeerbaar of vluchtig
Filtreren	De toxische stoffen zijn geassocieerd met gesuspendeerd materiaal of met deeltjes.
EDTA-chelatie	Metalen
Extraheren (C18-kolom)	De toxicant is een (apolaire) organische stof
Reduceren (met natriumthiosulfaat)	De toxicanten zijn oxydanten. Ook de toxiciteit van een aantal metalen kan verlaagd worden
pH-aanpassing	De toxiciteit is afhankelijk van de pH, bijvoorbeeld ammonia

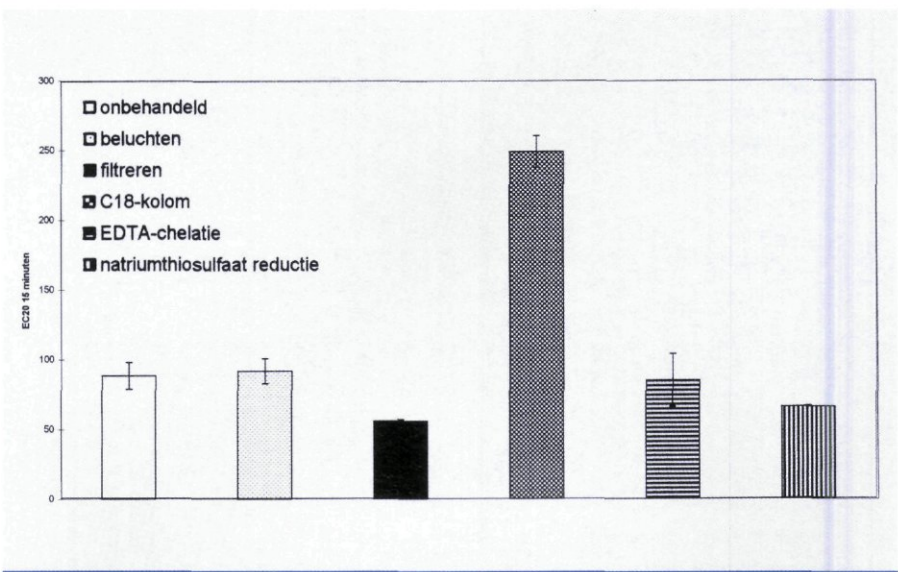
gen uit tabel I toegepast (zie afbeelding 2 en 3). Eén monster is onderzocht met de Thamnotoxkit, terwijl voor het andere monster de Microtox test is gebruikt. Veranderingen in de chemische samenstelling van de monsters als gevolg van de fractioneringen zijn bij deze monsters ook gevolgd.

Resultaten

Afvalwatermonster

In afbeelding 1 staan de resultaten van de toepassing op het afvalwatermonster uit de fysische-chemische zuivering. In het oorspronkelijke TIE-monster was sprake van een EC₂₀-waarde van ongeveer 80 ml/l (dat wil zeggen dat bij een verdunning van ongeveer 1 op 13 20 procent lichtremming optreedt). Uit de resultaten blijkt dat de toxiciteit sterk afneemt door C18-kolom-extractie (toename EC₂₀-waarde). Vooral organische verbindingen lijken dus verantwoordelijk voor de gemeten toxiciteit.

Zowel het onbehandelde monster als de op de C18 kolom geadsorbeerde stoffen zijn geanalyseerd met GC/MS. Ook organotinverbindingen zijn bepaald. Een aantal organische oplosmiddelen en diverse organotinverbindingen werden in de monsters aangetroffen. In de literatuur zijn voor de verschillende stoffen vervolgens toxiciteitsgegevens opgezocht. Voor lang niet alle stoffen bleken die aanwezig. Op basis van expert judgement zijn in die gevallen schattingen gemaakt. Met de fysisch-chemisch gemeten gehalten en toxiciteitsgegevens zijn vervolgens TU's (toxic units) berekend (tabel 2). Een TU voor een stof is gedefinieerd als de gemeten concentratie gedeeld door de effectconcentratie van die stof. Door de per stof berekende TU's op te tellen kan de totale toxiciteit van een monster voorspeld worden (onder de aanname dat de toxiciteit van de verbindingen additief is^[8]).



Afb. 1 Resultaten TIE fase 1 toepassing op het afvalwatermonster.

Tabel 2 laat zien dat er een behoorlijke overeenkomst bestaat tussen de totaal voorspelde (TU = 3,8) en daadwerkelijk gemeten toxiciteit (TU = 3,9) in het onbehandelde monster. De bijdrage van organotinverbindingen aan de toxiciteit van het monster lijkt relatief onbelangrijk. Na passage van de C18-kolom blijkt de voorspelde (TU = 1,1) en echt gemeten toxiciteit (TU = 2,5) aanmerkelijk gedaald. Dit komt gezien de aard van de stoffen overeen met de verwachting. In tabel 2 valt op dat de relatief vluchtige stoffen xyleen en tetrahydrofuran een behoorlijk aandeel van de gemeten TU's voor hun rekening nemen. Ook voor en na beluchting zijn deze stoffen in het afvalwatermonster geanalyseerd. Op grond van deze analyses en TU berekeningen werd na beluchten een forse reductie in toxiciteit verwacht. De toxiciteit bleek echter vergelijkbaar met die van het onbehandelde monster. Het lijkt er dus op dat toch andere verbindingen bijdragen aan de toxiciteit van het

monster. Deze stoffen zijn nog niet als zodanig geïdentificeerd. Eén en ander maakt ook duidelijk dat heel voorzichtig moet worden omgegaan met dergelijke TU-vergelijkingen.

Waterbodemmonsters

De toxiciteit van poriewater van waterbodemmonster 1 is gemeten met de Thamnotoxkit F. Door het toevoegen van EDTA en in mindere mate door natriumthiosulfaat, werd de toxiciteit van het monster verlaagd. De C18-kolom extractie had geen of nauwelijks invloed op de toxiciteit van het monster (zie afbeelding 2). Dit resultaat wijst op toxiciteit veroorzaakt door metalen. Uit een TU-benadering bleek dat zink en chroom de toxiciteit konden verklaren. De concentratie organische microverontreinigen in het poriewater was zeer laag (beneden de detectiegrenzen). De toxiciteit van het monster lijkt daarom niet door deze groep van verbindingen veroorzaakt te worden. Dit blijkt ook uit het niet veranderen van de toxiciteit als gevolg van de C18-kolom extractie.

Tabel 2: Vergelijking tussen 'gemeten' en voorspelde TU's op basis van geanalyseerde stoffen¹.

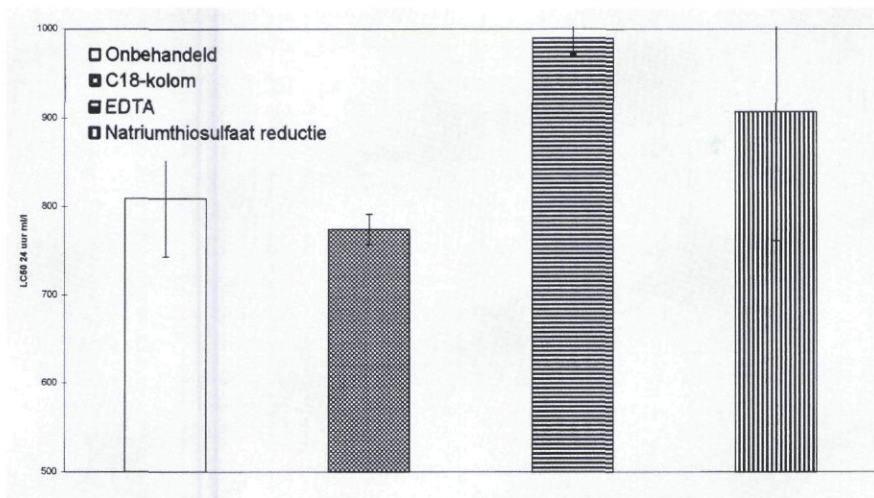
Stof	voorspelde TU's onbehandelde monster	voorspelde TU's na C18-kolom extractie
butyltin verbindingen	0.258	0.011
fenyltin verbindingen	0.002	0.00009
tolueen	0.002	0.0015
xyleen	0.625	0.565
2-ethylhexanol	1.725	0.565
n-butanol	< 0.001	< 0.001
tetrahydrofuran	1.143	niet geanalyseerd
totaal voorspeld	3.8	1.1
'gemeten' TU in monster ²	3.9	2.5

¹ De TU's in deze tabel zijn gebaseerd op Microtox EC₅₀ 15 min.

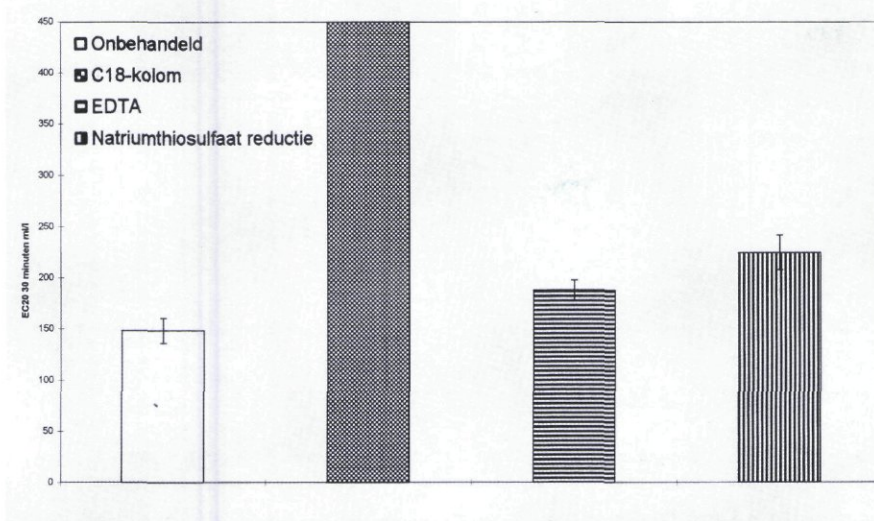
² TU gemeten = 100/EC₅₀-15 min.

Met de Microtox is de toxiciteit van poriewater van waterbodem 2 gemeten. Door het monster te extraheren met een C18-kolom werd de toxiciteit van het monster volledig verwijderd. De overige bewerkingen hadden nauwelijks of geen invloed op de toxiciteit van het monster (zie afbeelding 3). De toxiciteit lijkt daarom veroorzaakt te worden door organische verbindingen. Uit een analyse blijkt ook dat er zeer veel organische microverontreinigen in dit sediment voorkomen (klasse 4 voor PAK en olie).

Voor het tot op stofniveau verklaren van organische toxiciteit is een diepgaande fase 2 identificatiemethodiek beschikbaar². Het principe van deze methodiek bestaat uit het



Afb. 2: Resultaten TIE fase 1 toepassing op poriewater van waterbodemmonster 1.



Afb. 3: Resultaten TIE fase 1 toepassing op poriewater van waterbodemmonster 2.

verdergaand fractioneren van op de C18-kolom gebonden stoffen met behulp van een HPLC. De HPLC-fracties worden daarna op toxiciteit getest met bioassays en vervolgens kunnen in toxische fracties de toxicanten geïdentificeerd worden. Deze methodiek wordt door het RIZA op dit moment getest op een industrieel afvalwater en waterbodemmonster 2. Uit de eerste resultaten blijkt dat de routinematig gemeten EPA-PAK gehalten in het sediment van waterbodemmonster 2 hoogstwaarschijnlijk niet verantwoordelijk zijn voor de gemeten toxiciteit. In de toxische HPLC-fracties van het monster konden namelijk geen EPA-PAK's aangetoond worden (deze PAK's bleken juist in de niet toxische fracties aanwezig te zijn). Een niet te identificeren aroma (mw168) bleek wel in een aantal toxische fracties en het oorspronkelijke poriewater in een relatief hoge concentratie (30 µg/l) aanwezig te zijn.

Er bestaan nog een aantal onderzoekstechnische problemen. De acute toxiciteit van poriewater uit veel waterbodemmonsters is laag. Meestal beperkt de toxiciteit van water-

bodems zich tot chronische effecten. Deze op zich positieve constatering beperkt de toepassing van de identificatiemethode tot de zeer sterk verontreinigde locaties. Door de toepassing van chronische bioassays zal de methode op meer locaties toepasbaar zijn. Omdat chronische testen bewerkelijk zijn, wordt de methode dan wel erg kostbaar. Er is dus behoefte aan kortdurende testen die gevoeliger zijn dan de huidige bioassays.

Ook is duidelijk geworden dat toepassing van elementen uit de identificatiemethode van de EPA vooral op zijn plaats lijkt indien de toxiciteit veroorzaakt wordt door organische verbindingen. Metalen zijn immers vrij eenvoudig en goedkoop te analyseren en toxiciteitsgegevens zijn veelal voorhanden. Wel is nog steeds informatie noodzakelijk over de vorm waarin de metalen voorkomen en eventuele combinatiewerking. Organische stoffen zijn veel moeilijker te analyseren en deze analyses zijn soms kostbaar. Daarnaast is essentiële informatie over de toxiciteit van veel aangetoonde organische verbindingen onbekend. De fase 2 fractionering is technisch

gezien uitvoerbaar, maar wel tijdrovend. Er kan nog geen garantie worden gegeven dat de toxicant(en) werkelijk geïdentificeerd worden. De uiteindelijke identificatie van de toxische verbinding hangt sterk af van de beschikbare analysemethoden om de identiteit van verbindingen vast te stellen.

Concluderend kan gesteld worden dat de identificatie methode van de EPA een goede systematische benadering in zich bergt. De methode geeft inzicht in de oorzaken achter waargenomen toxiciteit. Tegelijkertijd kunnen de resultaten ook richtinggevend zijn bij het vinden van oplossingen om de toxiciteit van effluënten effectief te reduceren of kunnen saneringsbeslissingen beter worden onderbouwd.

LITERATUUR

- 1) Norberg-King, T., D.I. Mount, J. Amato, D. Jensen en J. Thompson, Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase 1 Toxicity characterization procedures (second Edition), 1992. EPA/600/6-91/003.
- 2) Mount D. & L. Anderson-Carnahan, Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II Toxicity identification procedures, 1989. EPA/600/3-88/035.
- 3) Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase III Toxicity confirmation procedures, 1989. EPA/600/3-88/036.
- 4) Rotteveel, S. Besten. P. en Tonkes. M. 1998. De toepasbaarheid van de Toxicity identification evaluation op waterbodem en effluentmonsters. RIZA-werkdocument 97.106X.
- 5) Tonkes, M., H. Pols, H. Warmer en V. Bakker. 1998. Totaal effluent beoordeling. Discussienotitie (en voorstel voor ontwikkelings- en introductieprogramma). RIZA-rapport 98.034.
- 6) Maas, J., C. van de Guchte en F. Kerkum, Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering: methodebeschrijvingen voor enkele bioassays, bioaccumulatiemetingen en veldstudies. Lelystad, 1993. RIZA-rapport 93.027.
- 7) Tonkes, M. en J. Botterweg, 1994. Totaal effluent milieubezwaarlijkheid: Beoordelingsmethodiek milieubezwaarlijkheid van afvalwater. Literatuur- en gegevensvaluatie. RIZA-rapport 94.020.
- 8) Botterweg J., Handboek toxicologie en lozingsvergunningen, RIZA-rapport 96.045.