



Toetsingskader voor bioassays in het waterkwaliteitsbeheer

ALICE STRAETMANS, ROYAL HASKONING
HANNIE MAAS, RIZA
ERIK VAN DE PLASSCHE, ROYAL HASKONING
DICK VETHAAK, RIKZ

De mogelijkheden in het waterkwaliteitsbeheer om de kwaliteitsbeoordeling alléén op chemische stofanalyses te baseren, raken uitgeput. Het aantal stoffen dat gemeten kan worden is beperkt, milieukwaliteitsnormen ontbreken voor de meeste stoffen en effecten op ecosystemen laten zich niet aflezen uit gemeten concentraties. Bioassays vormen dan ook een nuttige aanvulling op het meet-instrumentarium dat door de waterkwaliteitsbeheerder kan worden ingezet. Maar wat betekenen de resultaten van deze biotesten in termen van een goede of slechte waterkwaliteit? Met andere woorden: langs welke maatlat kunnen de resultaten gelegd worden en hoe kan normstelling plaatsvinden? In een gezamenlijk project ontwikkelden RIZA en RIKZ een voorstel voor zo'n maatlat. In dit artikel wordt een toelichting gegeven op deze maatlat, op het kader waarin de maatlat toegepast kan worden en op de stappen die nog gezet moeten worden voordat toepassing van de maatlat op termijn mogelijk is.

De maatlat¹⁾ is door RIZA en RIKZ gezamenlijk ontwikkeld op basis van de uitkomsten uit de discussies, die de afgelopen jaren vooral in wetenschappelijke kring over het onderwerp zijn gevoerd. De besluiten van een drietal workshops hebben ten grondslag gelegen aan het hier gepresenteerde voorstel. Aan de workshops werd deelgenomen door een groot aantal instanties, zoals de Commissie Integraal Waterbeheer, STOWA, RIVM, Alterra, TNO en de ministeries van Milieu, Waterstaat en Natuurbeheer. Het project werd getrokken door een kerngroep vanuit RIKZ en RIZA. De uitvoering lag in handen van Royal Haskoning.

Het kader

In Nederland wordt een tweesporenbeleid gevolgd om tot een verbetering van de kwaliteit van watersystemen te komen. Dit beleid kent enerzijds de preventieve aanpak, waarbij de aanpak van bronnen als effluënten en bag-gerspecie centraal staat (het emissiespoor), anderzijds de curatieve aanpak, waarin het gaat om de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewater, grondwater en sediment (het immissiespoor). In beide sporen worden de laatste jaren, naast de chemische stofanalyses, bioassays ingezet om meer zicht te krijgen op de werkelijke biologische effecten.

De maatlat voor bioassays heeft betrekking op de inzet ervan in het immissiespoor: de ecotoxicologische beoordeling van de kwaliteit van zoet en zout oppervlaktewater en zoete en zoute waterbodem. Effecten in bioassays in het emissiespoor en in landbodem kunnen met de voorgestelde maatlat niet worden beoordeeld, al zal hetzelfde principe wellicht wel toepasbaar blijken. Het ligt voor de hand dat in de toekomst de kwaliteitsbeoordeling met behulp van bioassays voor de verschillende milieucompartmenten op elkaar zal moeten worden afgestemd, maar zover is het nog niet.

De aanleiding

De kwaliteitsbeoordeling van water, bodem en lucht in Nederland is overwegend gericht op een stofgerichte aanpak. Dat wil zeggen dat de mate van verontreiniging vooral aan de hand van individuele stoffen wordt beoordeeld. Hierbij worden slechts 100 à 200 bekende chemische stoffen gemeten, terwijl duizenden stoffen voorkomen in het milieu. Veel van deze stoffen zijn steeds moeilijker chemisch te detecteren. En al zou dat wel mogelijk zijn, dan nog is het ondoenlijk om voor al deze stoffen normen af te leiden vanwege het ontbreken van ecotoxicologische gegevens. Daar komt nog bij dat de aanwezigheid van stoffen en de gehalten waarin

die stoffen in het milieu voorkomen op zichzelf niets zeggen over het gecombineerd effect van die stoffen op het ecosysteem.

Ook in het beleid, zoals in de Vierde Nota Waterhuishouding²⁾, wordt opgemerkt dat de traditionele chemische beoordeling van de waterkwaliteit te kort schiet. In de 'Tussendoelennotitie' van de regering³⁾ wordt gesteld dat uiterlijk in 2006, in aanvulling op de bestaande stofnormen, een effectgerichte beoordeling van de waterkwaliteit in de normering opgenomen dient te zijn. Hiertoe ontwikkelen RIZA en RIKZ een chemisch-biologisch instrumentarium (CBI), dat zich richt op de inzet van bioassays naast het klassieke meetinstrumentarium. Ook in het emissiespoor worden bioassays toegepast om de biologische effecten van lozingen en daarmee de milieubezwaarlijkheid, vast te stellen. De methodiek voor deze totaal-effluentbeoordeling (TEB)⁴⁾ zal eveneens in 2006 in de praktijk geïmplementeerd worden.

Bioassays kunnen de effecten van stoffen die niet gemeten worden maar wel in het milieu aanwezig zijn, van onbekende stoffen en omzettingen producten of van combinaties van stoffen wel zichtbaar maken. Daarmee hebben bioassays een belangrijke toegevoegde waarde ten opzichte van het enkel meten van gehalten van afzonderlijke stoffen. Maar, als van de waterkwaliteitsbeheerder na 2006 verlangd wordt dat hij een ruimer gebruik van bioassays gaat maken bij de kwaliteitsbeoordeling, dan moet wel duidelijk zijn wat de gevonden biologische effecten zeggen in termen van een goede of slechte waterkwaliteit. Hoe ver is de actuele waterkwaliteit nog verwijderd van een 'goede toestand' en welke inspanningsverplichting wordt dus van de waterkwaliteitsbeheerder gevraagd? Doelstelling van het gezamenlijke RIZA/RIKZ-traject was om in eerste instantie op wetenschappelijke gronden een maatlat te ontwikkelen, waarmee die gevonden effecten in bioassays beoordeeld kunnen worden. Na dit wetenschappelijke traject moet de maatlat in beleid en beheer een plaats gaan krijgen.

Bioassays

Wat zijn bioassays? In een bioassay worden organismen of delen van organismen (weefsels of cellen) op gestandaardiseerde wijze blootgesteld aan milieumonsters, zodat biologische effecten van giftige verontreinigende stoffen zichtbaar gemaakt kunnen worden. De voor de test gebruikte organismen kunnen afkomstig zijn uit laboratoriumkweek of uit het veld en de test kan zowel in het laboratorium als in een veldsituatie worden uitgevoerd. Beoordeeld worden effecten als groei, reproductie, activiteit en sterfte.

Gewoonlijk worden twee typen assays onderscheiden: *in vivo* en *in vitro* assays. *In vivo* bioassays zijn testen waarbij het intacte organisme aan het milieumonster wordt blootgesteld. Daarbij wordt onderscheid gemaakt in acute testen en chronische testen. In acute testen vindt een kortdurende blootstelling aan relatief hoge concentraties van verontreinigende stoffen plaats. Met chronische testen wordt meer de werkelijke situatie benaderd: een langduriger blootstelling aan lagere concentraties. Chronische testen zijn over het algemeen gevoeliger, maar ook duurder en uitvoering ervan is complexer dan bij de acute testen. Bij *in vitro* bioassays worden geprepareerde cellen of subcellulaire fracties gebruikt, die geïsoleerd zijn uit organismen of afkomstig van gemodificeerde bacteriën. Deze testen zijn kortdurend (van enkele minuten tot dagen), snel uitvoerbaar en kleinschalig.

De *in vivo* bioassay is over het algemeen een breedspectrum assay, wat wil zeggen dat de test reageert op een scala van stoffen en daarmee op een scala van typen toxiciteit. *In vitro* assays zijn meestal werkingsspecifiek, wat aangeeft dat er een reactie is op slechts één type toxiciteit. In het maatlat-project is zowel voor *in vivo* bioassays als voor *in vitro* bioassays een voorstel ontwikkeld: beide typen assays lijken voor wat betreft de toepassing in het waterkwaliteitsbeheer veelbelovend. Een maatlat kan een stimulans betekenen voor een verdere ontwikkeling van de inzet van de assay.

Huidige toepassing in het immissiespoor

De eisen die gesteld worden aan bioassays voordat ze opgenomen kunnen worden in een biologisch meetinstrumentarium betreffen bijvoorbeeld aspecten als relevantie voor vertaling van de effecten naar ecosystemen en voor het afdekken van bepaalde toxische mechanismen, representativiteit voor organismen en hun plaats in het betreffende ecosysteem, betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid. Sommige testen zijn al voldoende ontwikkeld om aan alle of een groot deel van de gestelde eisen tegemoet te komen, andere testen moeten nog verder ontwikkeld worden.

In zowel de zoete als de zoute rijkswateren vormen verschillende typen bioassays al lange tijd een vast onderdeel in het instrumentarium voor monitoring en kwaliteitsbeheer. In de regionale wateren is dat op dit moment nog slechts beperkt het geval. Testen met diverse organismen worden uitgevoerd met het 'as is' monster (dit is het oorspronkelijke monster) of met bewerkte monsters (concentraten en/of verdunningen). Zowel chronische als acute effecten worden gemeten⁵.

Bij de kwaliteitsbeoordeling van waterbodems en bij de monitoring van ingrepen (saneringen) wordt op dit moment ook al gebruik gemaakt van bioassays. Verschillende testen zijn hiervoor nog in ontwikkeling. Testen kunnen uitgevoerd worden met poriewater en met 'whole sediment'. Ook hier

kunnen chronische en acute effecten gemeten worden⁶.

In vitro bioassays worden nog niet in reguliere programma's toegepast. Alleen in de rijkswateren is inmiddels praktische ervaring opgedaan met testen die reageren op stoffen met

Maatlat voor *in vivo* bioassays voor oppervlaktewater

Methode 1 (preliminary effect assessment): maatlat toe te passen bij drie chronische of acute testen uit verschillende taxonomische groepen.

chronische testen

VE (Verwaarloosbaar Effect):	in drie chronische testen effect = 0, Cf* = 10
MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect):	in drie chronische testen effect = 0, Cf = 1
EE (Ernstig Effect):	in één chronische test effect $\geq$ EC ₅₀ , Cf = 1 of in twee chronische testen NOEC < effect < EC ₅₀ , Cf = 1

acute testen

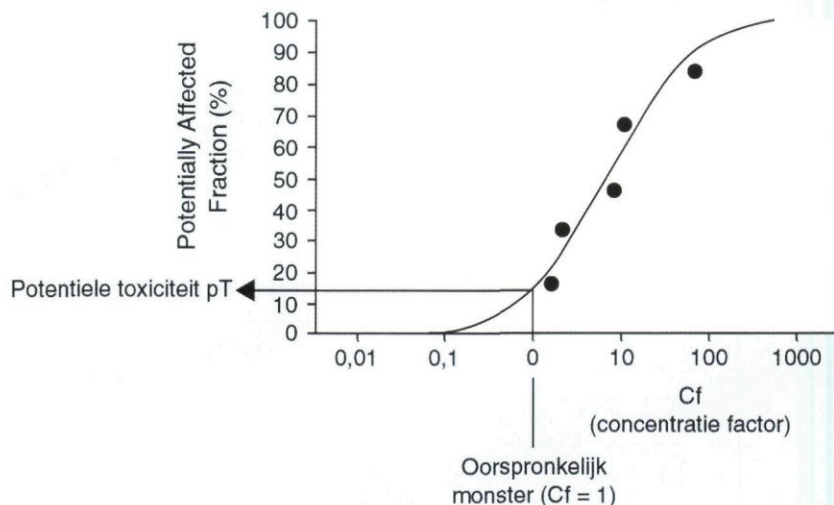
VE (Verwaarloosbaar Effect):	in drie acute testen effect = 0, Cf = 100
MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect):	in drie acute testen effect = 0, Cf = 10
EE (Ernstig Effect):	in één acute test effect $\geq$ EC ₅₀ , Cf = 10 of in twee acute testen EC ₂₀ < effect < EC ₅₀ , Cf = 10

Cf = de concentratiefactor waarmee het monster geconcentreerd wordt ten opzichte van het 'as is' monster (deze factor kan gezien worden als de 'assessment factor')

Methode 2 (refined effect assessment): maatlat toe te passen bij minimaal vier chronische of acute testen uit verschillende taxonomische groepen: de PAF-benadering.

Deze methode werkt als volgt:

- Acute en chronische bioassays kunnen gebruikt worden;
- Resultaten van acute testen worden uitgedrukt als de factor waarmee het oorspronkelijke monster geconcentreerd moet worden voor het bereiken van 50 procent effect in de bioassay. Deze resultaten worden vervolgens omgerekend naar een chronische waarde door toepassing van een acuut-chronische ratio (ACR) van 10%;
- Met de chronische waarden wordt een gevoeligheidsverdeling geschat volgens een log-logistische verdeling¹⁰ (zie grafiek);
- Bepaald wordt in welke mate de PAF₅ (voor het MTE) en PAF₅₀ (voor het EE) overschreden worden bij het ongeconcentreerde, onverdunde ofwel het 'as is' monster;
- Voor het VE wordt de Cf, behorend bij het MTE (PAF₅), afgelezen en gedeeld door tien. Dit geeft de concentratiefactor aan waarbij het VE optreedt. Vervolgens wordt dit resultaat vergeleken met de resultaten van het onbehandelde monster om te bepalen of dit aan het MTE of het VE voldoet.



een hormoonverstorende werking en op stoffen met een dioxineachtige toxiciteit⁷⁾. In Nederland bestaat op dit moment, in het emissiespoor, één beleidstoepassing van in vitro bioassays: het gebruik van de DR-CALUX (een test die specifiek reageert op dioxines en dioxineachtige stoffen als PCB's) in het beoordelingsstelsel voor de verspreiding van zoute bagerspecie op zee, de chemie-toxiciteit-toets⁸⁾ (CTT).

Bioassays spelen in toenemende mate een rol in het internationale waterkwaliteitsbeheer, met name in het 'Coordinated Integrated Monitoring Program' (CEMP) van OSPAR en op verschillende EU-niveaus. Zo worden in Nederland de mogelijkheden verkend om een effectgerichte beoordeling in te passen in de Kaderrichtlijn Water en vindt voor waterbodems uitwerking plaats in een Europees sediment netwerk (EU-SEDNET).

De maatlat

In het immissiespoor wordt de kwaliteit van het watersysteem getoetst aan de algemene milieukwaliteitsnormen voor individuele stoffen: het MTR (Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau), het VR (Verwaarloosbaar Risiconiveau) en het ER (Ernstig Risiconiveau). Het MTR is de korte termijn-doelstelling van het algemene milieukwaliteitsbeleid; het VR moet op de langere termijn bereikt worden. Het ER ligt ten grondslag aan de interventiewaarde. Dit is de waarde die aangeeft vanaf welke concentratie van een stof een ernstig risico bestaat. Het ER- en MTR-niveau zijn op risico's gebaseerd; het VR-niveau wordt gedefinieerd als 1/100 van het MTR. Dezelfde systematiek en afleiding van de risiconiveaus liggen ten grondslag aan de afleiding van de maatlat voor in vivo bioassays voor water en waterbodem. Voor in vitro bioassays is ook geprobeerd om aansluiting bij dit algemene concept te vinden, maar dat blijkt wat ingewikkelder.

Eén en ander wordt hieronder verder toegelicht.

In vivo bioassays met oppervlaktewater

Uitgangspunt is de veronderstelling dat het ecosysteem beschermd wordt door bescherming van 'trigger-soorten' uit minimaal drie taxonomische groepen. Dit wil zeggen dat een 'streepje op de maatlat' pas gezet kan worden als met het milieumonster minimaal drie bioassays zijn uitgevoerd. Bij twee bioassays kan geen uitspraak over de kwaliteit van water of waterbodem gedaan worden; bij drie bioassays wordt een voorlopige inschatting van de effecten gemaakt en vanaf vier bioassays wordt een uitspraak gedaan over de 'potentieel aangetaste fractie' (de PAF) van het aantal soorten in het betreffende ecosysteem.

Maatlat voor in vivo bioassays voor sediment

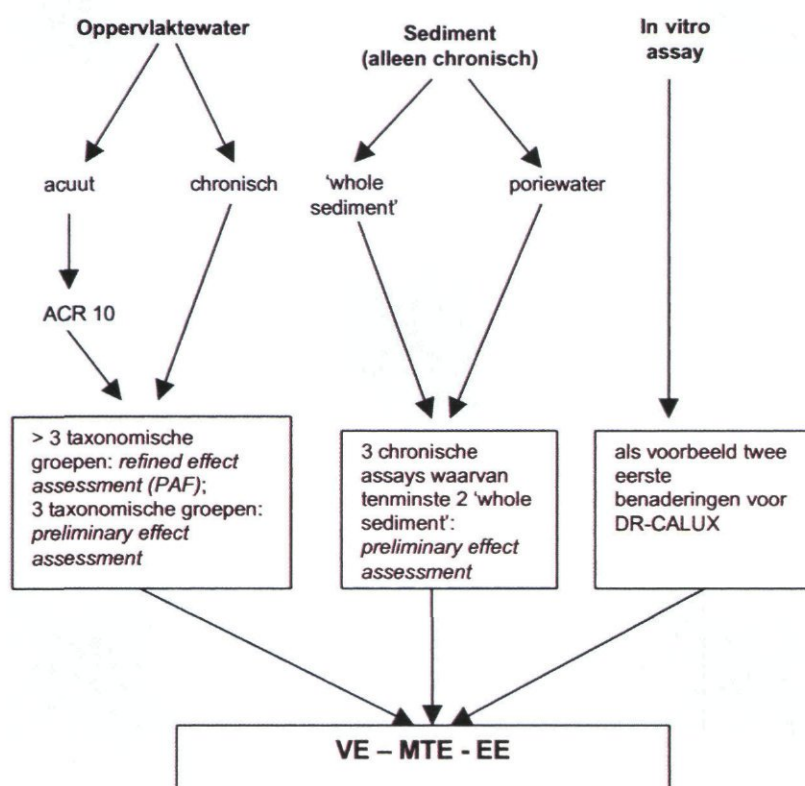
De maatlat ziet er als volgt uit:

- Alleen een MTE- en een EE-niveau wordt afgeleid en geen VE-niveau. Voor het VE heeft dit te maken met de praktische bezwaren die kleven aan het concentreren van sediment;
- Voor het vaststellen van het MTE dienen drie chronische testen beschikbaar te zijn, waarvan tenminste twee 'whole-sediment' testen;
- Het MTE is net als bij oppervlaktewater gelijk aan: in drie chronische testen effect = 0. Als in tenminste één van de drie chronische testen een negatief effect wordt gemeten, dan is sprake van overschrijding van het MTE;
- Het EE-niveau wordt bereikt wanneer in één chronische test ('as is' monster) een effect gemeten wordt $\geq EC_{50}$ of in twee chronische testen een effect dat zich bevindt tussen NOEC en EC_{50} .

De nieuwe maatlat staat samengevat in het kader. Het centrale punt op de voorgestelde maatlat is het Maximaal Toelaatbaar Effect-niveau (MTE). Dit niveau wordt gedefinieerd als het 'geen effect-niveau' van drie chronische in vivo bioassays met het 'as is' monster. Dit betekent dat als in minimaal drie chronische in vivo bioassays met testorganismen uit verschillende taxonomische groepen, géén effecten gemeten worden, de kwaliteit van het milieumonster op het MTE-niveau ligt. Het VE-niveau (Verwaarloosbaar Effectniveau) bevindt zich, anders dan het VR-niveau voor individuele stoffen, op 1/10 van dit MTE-niveau. De factor 1/10 (en niet 1/100) komt voort uit de overweging dat in bioassays com-

binatietoxiciteit reeds in het effect tot uitdrukking komt, waardoor in de afleiding van het VE hier niet apart rekening mee hoeft te worden gehouden. De factor 10 van MTE naar VE zit in de concentratiestap die wordt toegepast op het 'as is' monster: als in drie chronische bioassays, tien maal geconcentreerd ten opzichte van het oorspronkelijke monster, geen effecten kunnen worden waargenomen, dan kan de kwaliteit van het milieumonster op VE-niveau worden gewaardeerd. Het EE-niveau (Ernstig Effectniveau) wordt bereikt als het 'as is' monster in één of meer bioassays een ernstig effect laat zien (dit wil zeggen: in één bioassay vertoont de helft van de testorganismen een effect of in twee bioassays wordt een

Afb. 1: Samenvatting van de maatlaten voor in vivo bioassays voor oppervlaktewater en sediment en in vitro bioassays. ACR = acuut-chronische ratio, PAF = potentially affected fraction.



effect gemeten bij minder dan de helft van de testorganismen).

Als in plaats van chronische, acute bioassays worden gebruikt, dan is sprake van het MTE indien in drie acute *in vivo* bioassays, in een tien maal geconcentreerd monster, geen effect gemeten wordt. Op dit moment is dit een algemeen geaccepteerde generieke factor⁹⁾. Het VE-niveau bevindt zich daar een factor 10 vandaan, dit wil zeggen dat in een 100 maal geconcentreerd monster geen effecten worden geconstateerd. Het EE-niveau is vergelijkbaar met het EE-niveau bij chronische testen, maar dan toegepast op een tien maal geconcentreerd monster.

Als resultaten uit meer dan drie testen beschikbaar zijn, acuut en/of chronisch, dan is een meer verfijnde kwaliteitsbeoordeling mogelijk met behulp van de zogenaamde PAF-benadering. Het MTE-niveau wordt dan gedefinieerd als het niveau waarbij vijf procent van de soorten potentieel is aangetast (PAF₅, dit is gelijk aan het 95 procent beschermingsniveau). Bij het EE-niveau is de helft van de soorten potentieel aangetast (PAF₅₀). Het VE is 1/10 van de concentratiefactor behorende bij het MTE (PAF₅). Vergelijking van de resultaten van het onbehandelde monster met de concentratiefactor voor MTE en VE bepaalt of het oppervlaktewater voldoet aan het MTE of het VE. Voor deze maatlat met de PAF-benadering kunnen zowel chronische als acute assays gebruikt worden, maar de resultaten van alle testen worden uiteindelijk naar een chronische assay omgerekend.

In vivo bioassays met waterbodembodem

Ook voor waterbodems wordt het MTE-niveau gelegd bij het 'geen-effect-niveau' van drie chronische *in vivo* bioassays met 'as is' monster, waarvan minimaal twee met 'whole sediment'. Voor sediment zijn eigenlijk alleen chronische testen beschikbaar, zodat geen MTE-niveau wordt gedefinieerd voor acute testen. Het VE-niveau kan ook niet bepaald worden: aan het concentreren van sediment kleven te veel praktische bezwaren. Het EE-niveau wordt bereikt wanneer in één chronische test een effect van meer dan EC₅₀ gemeten wordt of in twee chronische testen een effect van minder dan 50 procent.

In vitro bioassays

Naast een maatlat voor *in vivo* bioassays is ook een aantal mogelijke benaderingen voor de afleiding van een maatlat voor *in vitro* bioassays onderzocht. Voor één assay in het bijzonder (DR-CALUX) werden indicatief twee maatlatconcepten verder onderzocht. De meest kansrijke benadering op de korte termijn, tevens de meest pragmatische, lijkt de maatlat 'van schoon naar verontreinigd', waarbij op

basis van bestaande metingen met *in vitro* bioassays locaties in Nederlands oppervlaktewater of waterbodembodem worden verdeeld in 'schone' en 'verontreinigde' locaties. Het VE kan dan gelegd worden bij die grens die (gemiddeld) in de 'schone' locaties gevonden wordt. Deze benadering is alleen uitvoerbaar indien een aanzienlijke dataset van meetgegevens aanwezig is, bij voorkeur in combinatie met chemische stofgegevens. In de toekomst zal moeten blijken of het mogelijk is om *in vitro* assays, die ieder zo'n heel verschillend karakter hebben, op één maatlat te schalen.

Afbeelding 1 geeft een schematisch overzicht van de manier waarop de maatlat voor *in vivo* en *in vitro* bioassays wordt toegepast.

Toepassing van de maatlat: de toekomst

Het rapport 'Normstelling voor bioassays; uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodembodem'¹⁾ verschijnt tegelijkertijd met dit artikel. Na de wetenschappelijke afstemming zullen zowel het beleid als de waterbeheerder zich over het voorstel moeten buigen. Het rapport is bij de stuurgroep INS ingebracht om dit vervoltraject in gang te zetten.

Alvorens de invoering van de effectgerichte beoordeling mogelijk wordt, moet er nog veel gebeuren om de methodiek en de set van bioassays geschikt te maken voor routinematig gebruik. De nadruk ligt daarbij op een uitbreiding van het aantal bioassays, op de uitwerking in protocollen en op ecologische calibratie. Ook zal moeten blijken welke toegevoegde waarde bioassays werkelijk hebben ten opzichte van chemische monitoring, op welke locaties en hoe vaak gemeten moet worden en welke maatregelen bij normoverschrijding genomen moeten worden om de effecten te verlagen. Door zogenaamd TIE-onderzoek (Toxiciteit, Identificatie en Evaluatie) zouden verantwoordelijke stoffen of stofstromen kunnen worden opgespoord. En in internationaal kader zal een concrete invulling gegeven moeten worden aan de aansluiting van de effectgerichte beoordeling bij de Kaderrichtlijn Water, die consequenties heeft voor de Nederlandse wetgeving op dit gebied. ☞

LITERATUUR

- 1) Maas J., E. van de Plassche, A. Straetmans, D. Vethaak en A. Belfroid (2003). Normstelling voor bioassays; uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodembodem. RIZA-rapport 2003.005, RIKZ-rapport 2003.007, ISBN 9036954851.
- 2) Vierde Nota Waterhuishouding (1998).
- 3) Tussendoelnotitie (2000-2001). Tweede Kamer, 26.401, nr 24.
- 4) Tonkes M., H. Pols, H. Warmer en V. Bakker (1998). Totaal-effluentbeoordeling. RIZA-rapport 98.034.

- 5) Zwart D. de en A. Sterkenburg (2002). 'Toxicity-based assessment of water-quality. In 'Species sensitivity distributions in ecotoxicology'.
- 6) Lahr J., J. Maas-Diepeveen, S. Stuijzand, P. Leonards, J. Druke, S. Lucker, A. Espeldoorn, L. Kerkum, L. van Stee en A. Hendriks (2003). Responses in sediment bioassays used in the Netherlands: can observed toxicity be explained by routinely monitored priority pollutants? Water Research 37 (8), pag. 1691-1710.
- 7) Vethaak D., G. Rijs, S. Schrap, H. Ruiters, A. Gerritsen en J. Lahr (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: Occurrence, potency and biological effects. RIZA/RIKZ-rapport 2002.001.
- 8) Stronkhorst J., C. Schipper, J. Honkoop en K. van Essen (2001). Baggerspecie in zee: hoe regelen we dat verantwoord? Een nieuw effectgericht beoordelingssysteem. RIKZ-rapport 2001.030.
- 9) Zwart D. de (2002). Observed regularities in species sensitivity distributions for aquatic species. In 'Species sensitivity distributions in ecotoxicology'.
- 10) Traas T. (2001). Guidance document on deriving environmental risk limits. RIVM-rapport 601501 012.