

RIVM rapport 860703001/2003

Evaluatie van pT

De bepaling van toxische druk in water

J. Struijs en D. de Zwart

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het programma Strategisch Onderzoek RIVM, in het kader van project S/860703, Quantitative Ecological Risk Assessment and Sustainable Biodiversity Functions (QERAS), deelproject Integratie en Implementatie.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

This report documents the results of the “pT development project”, pT referring to toxic potency of surface water due to the presence of toxic substances of which the identity and concentrations are unknown. The multitude and diversity of potentially occurring chemicals have put strong limitations on information that conventional chemical monitoring can provide. Even if analysis of most chemicals was possible, such information cannot be interpreted in terms of toxic stress because toxicity data are available for only a limited number of environmental pollutants.

One need expressed by environmental policy makers is to develop an instrument to monitor toxic stress in ecosystems. There is also a need to keep track of the efficacy of environmental measures and to weight toxic stress with respect to other environmental stressors, such as acidification and eutrophication (“how serious is the problem of toxic substances for the environment?”).

The method developed to fulfil these needs was aimed at: 1) extracting and concentrating the unknown cocktail of toxic substances from a sample of surface water; 2) determining the acute toxicity of concentrated water samples using a test battery of miniaturised *in vivo* bioassays (“toxkits”) and 3) computing (from the observed interspecies variation of acute toxicity in the toxkits) impacts at a higher ecological level, *i.e.* toxic stress in terms of the potentially affected fraction of species (PAF) occurring in the field.

The concentration technique was optimised through different test mixtures consisting of chemicals with a non-specific (narcotic) mode of action, pesticides and surfactants. Toxkits were employed to test these mixtures. The test battery consisted of *Daphnia* IQ, PAM (an algae test), Microtox and Thamnotox F. The test mixtures were made of more than 30 chemicals with varying physico-chemical and toxic properties.

The recovery of the concentration technique finally adopted was higher than 60 % and should be considered as the maximum achievable; this is because the solid phase extraction on which it relies is specific with respect to physico-chemical properties of chemicals.

For metals an alternative technique was developed on the basis of multi-element analyses of a water sample in combination with ecotoxicity data for 16 metals.

Monitoring programs were executed to sample, concentrate and test the toxicity of surface waters in the Netherlands. Toxic pollution from both organic micropollutants and metals was found in descending order in the Scheldt, the Meuse and the Rhine. The pT method, also known as “measured msPAF” (where ms = multi-substance), was applied to varying test mixtures (see table) in an initial attempt to compare the calculation rules for mixtures (computed msPAF) with pT (measured msPAF) derived from measured toxicity distributions.

Median percentages of measured PAF (pT) and calculated msPAF for various cocktails containing 9 narcotic substances, 11 pesticides and 2 surfactants

	Narcotics	Pesticides	Surfactants
Measured (n = 4) PAF (pT)	< 0.01 %	10.9 %	9.4 %
Calculated msPAF	< 0.01 %	14.4 %	11.3 %

Voorwoord

Marja Wouterse en Evert-Jan van den Brandhof van het voormalige ECO (thans LER) hebben een belangrijke bijdrage geleverd bij de praktische uitvoering van de ontwikkeling van pT. Ook de analyses van LOC en LAC waren onmisbaar. Velen die bij dit project betrokken waren, hebben inmiddels ECO (of het RIVM) verlaten. Wij bedanken Anton Prins, Albert Willemsen, Leo van Buren, Miriam Collombon, die in een tijdelijke dienstverband aan pT hebben gewerkt. Manon Vaal, Carla Roghair, Rob van de Kamp en Arie-Jan Folkerts hebben het RIVM inmiddels verlaten. Zij speelden een belangrijke rol bij de totstandkoming van de methodiek. Monique Wolters, Dick Gielen, Rens van Veen en Carlo Strien hebben ECO verlaten voor een positie elders in het RIVM; wij bedanken hen voor hun inzet aan pT.

Inhoud

ABSTRACT	2
VOORWOORD	4
INHOUD	5
SAMENVATTING	6
1. INLEIDING	7
1.1 DGM WORKSHOP IN 1991: MILIEUBELEIDSINDICATOR STOFFEN.....	7
1.2 HET BEGRIJ “PT”.....	7
1.3 NUT EN NOODZAAK VAN DE PT WAARDE.....	8
1.4 DOEL EN RANDVOORWAARDEN.....	9
2. VOORAFGAANDE ONTWIKKELINGEN	11
2.1 AFNEMENDE TOXISCHE STRESS IN OPPERVLAKTEWATER.....	11
2.2 BIOLOGISCHE MONITORING VAN TOXISCHE STOFFEN.....	12
3. DE TOXISCHE DRUK IN MILIEUMONSTERS	13
3.1 TOXISCHE DRUK BEPAALD MET <i>IN VIVO</i> -BIOASSAYS.....	13
3.2 TOXISCHE DRUK BEPAALD MET GEMETEN CONCENTRATIES.....	15
3.3 OVERZICHT VAN DE GEKOZEN TERMINOLOGIE.....	17
4. DE ONTWIKKELING VAN PT	19
4.1 DE GO/NO-GO BESLISSING.....	20
4.2 OPTIMALISATIE EN VALIDATIE.....	21
4.2.1 <i>De blanco</i>	21
4.2.2 <i>De concentratietechniek</i>	22
4.2.3 <i>In vivo-bioassays (“toxkits”)</i>	25
4.2.4 <i>Validatie</i>	25
4.2.5 <i>Vergelijking met berekening van PAF</i>	26
4.3 MSPAF VOOR EEN SELECTIE VAN METALEN (MSPAF _{ME}).....	28
4.3.1 <i>Resultaten onder de aanname: opgelost is biologisch beschikbaar</i>	28
4.3.2 <i>Resultaten bij nadere beschouwing van de beschikbaarheid</i>	30
5. TOEPASSING IN EEN RIZA ONDERZOEK	32
6. CONCLUSIES	34
6.1 MSPAF(GEMETEN).....	34
6.2 MSPAF _{ME}	34
6.3 ALGEMEENE CONCLUSIE.....	35
LITERATUUR	36
BIJLAGE 1 VERZENDLIJST	39

Samenvatting

Dit rapport vormt de afronding van het project pT. De naam pT verwijst naar de toxische potentie van oppervlaktewater door de aanwezigheid van (veelal) lage concentraties van toxische stoffen, maar waarvan de samenstelling en concentraties onbekend zijn. De veelheid en verscheidenheid van potentieel aanwezige stoffen beperken de informatie die conventionele chemische monitoring kan leveren. Ook al zou het mogelijk zijn om de meeste stoffen te meten, dan nog is het onmogelijk om deze informatie te vertalen naar zoiets als toxische stress, omdat van slechts een klein aantal stoffen de toxische eigenschappen bekend zijn. Het milieubeleid heeft behoefte aan een instrument waarmee monitoring van toxische stress in het ecosysteem mogelijk is, zowel om de effectiviteit van het stoffenbeleid te kunnen volgen als om een afweging te kunnen maken met andere stressfactoren, zoals verzuring en vermisting (“hoe groot is eigenlijk het probleem van giftige stoffen in het milieu?”). Een methode werd ontwikkeld waarmee 1.) de onbekende cocktail van toxische stoffen uit een monster van oppervlaktewater wordt geëxtraheerd, 2) de acute toxiciteit wordt bepaald van het aldus geconcentreerde watermonster met behulp van een testbatterij van geminiaturiseerde *in vivo*-bioassays (“toxkits”) en 3.) uit de waargenomen variatie in gevoeligheid van de toxkits de toxische stress in het lokale ecosysteem wordt afgeleid die indicatief is voor een hoger integratieniveau zoals aantasting van de soortenrijkdom, PAF (potentieel aangetaste fractie).

Aan de hand van verschillende testmengsels, bestaande uit stoffen met een a-specifieke (narcotiserende) werking, pesticiden en surfactanten, werd de concentratietechniek geoptimaliseerd. Deze mengsels met meer dan 30 verschillende verbindingen met uiteenlopende fysisch-chemische en toxische eigenschappen, werden gebruikt bij het uittesten van de *in vivo*-bioassays.

De efficiëntie van de concentratietechniek was meer dan 60 %. Dit moet als het maximaal haalbare worden gezien vanwege het feit dat de vaste fase extractie waarop deze is gebaseerd, afhangt van de fysisch-chemische eigenschappen van stoffen. De testbatterij bestond uit *Daphnia* IQ, PAM (een algentest), Microtox en Thamnotox F.

Voor metalen is de methode ongeschikt en werd een andere procedure ontwikkeld. Deze is gebaseerd op multi-elementanalyse van watermonsters in combinatie met ecotoxiciteits data van 16 metalen.

Gezamenlijk onderzoek met het RIZA heeft aangetoond dat toxische stress afneemt in volgorde van Schelde, Maas en Rijn.

Met behulp van de pT methode, ook wel “msPAF(gemeten)” (multi substance PAF) genoemd, werd door toepassing op de verschillende testmengsels (zie tabel) een eerste aanzet gegeven tot de validatie van het PAF concept voor mengsels van stoffen.

Mediane waarden van gemeten PAF (pT) en berekende msPAF voor verschillende cocktails bestaande uit 9 narcotiserende stoffen, 11 pesticiden en 2 surfactanten

	narcotiserend	pesticiden	surfactanten
gemeten (n = 4): PAF (pT)	< 0,01 %	10,9 %	9,4 %
berekend: msPAF	< 0,01 %	14,4 %	11,3 %

1. Inleiding

Dit rapport evalueert de ontwikkeling en toepassing van een methode voor monitoring van toxische stress in oppervlaktewater. Het is de verantwoording van een in 1994 begonnen en met “de ontwikkeling van pT” of kortweg “pT” aangeduid project dat tot doel had een alternatief te ontwikkelen voor chemische monitoring in het milieu.

Eind 2001 werd de ontwikkeling van de methodiek beëindigd. Ontwikkelingen die hebben geleid tot het initiatief tot pT, de realisatie van de toegepaste techniek en de validatie en de toepassing, worden in dit rapport beschreven. De resultaten van het project ondersteunen de theorie over ecotoxische effecten van blootstelling aan complexe mengsels. De methode is geschikt voor monitoring van toxische druk in water, als alternatief voor en aanvulling op conventionele monitoring van chemische concentraties en modellering van toxische druk aan de hand van laboratorium toxiciteitsgegevens.

1.1 DGM workshop in 1991: milieubeleidsindicator stoffen

De aanleiding voor het project pT was de workshop “Een milieubeleidsindicator voor verspreiding van stoffen” bij DGM in 1991. De traditie om aantasting van het milieu door toxische stoffen stof voor stof te behandelen werd in het milieubeleid als beperkend ervaren. Er was behoefte aan thematisch gekozen indicatoren, waarvan sommige (verzuring, vermessing) in een vergevorderd stadium van ontwikkeling waren. Dat dit voor het thema Verspreiding nog niet het geval was, werd verklaard uit complicaties door de veelheid van stoffen in het milieu en de grote variatie van (combinaties van) effecten. Bij de andere thema's speelt slechts een gering aantal stressoren met relatief grote effecten een rol. Gezien de problematiek van de complexe cocktail van toxische stoffen in het milieu, werd het tijdens de workshop onwaarschijnlijk geacht dat men kon volstaan met één indicator voor het thema Verspreiding.

1.2 Het begrip “pT”

Het begrip “pT” werd door Slooff en De Zwart (1991) geïntroduceerd in het rapport “De pT-waarde als milieubeleidsindicator voor de verspreiding van toxische stoffen” dat naar aanleiding van de workshop werd opgesteld. Daarin werd het voorstel gelanceerd om op de wens van DGM in te gaan en een milieu-indicator onder de naam pT operationeel te maken. Milieutoxiciteit volgens het pT-concept werd gedefinieerd als (de logaritme van) “het aantal malen dat een milieumonster moet worden geconcentreerd (of verdund) om toxische effecten te geven”. Hoewel pT dikwijls in de context van “potentiële toxiciteit in een milieumonster” of “toxic potency” werd gebezigd, was de idee om door middel van de kleine letter “p” naar een logaritmische schaal te verwijzen, zoals bij pH en pKa. De uiteindelijk gedurende het

project pT ontwikkelde maatlat voor toxische druk wijkt van het oorspronkelijk basisconcept af. Het is het gevolg van de introductie van het concept Potentieel Aangetaste Fractie van soorten (PAF) voor het kwantificeren van toxische druk op ecosystemen via modellering (zie Hoofdstuk 2 van Species Sensitivity Distributions¹ in Ecotoxicology, Posthuma *et al.*, 2002). Omdat er voor de bepaling van de bedoelde pT-waarde ook gebruik gemaakt wordt van dergelijke SSD's, werd gekozen voor dezelfde maatlat als bij SSD's, de zogenaamde PAF (als voorspelling van de Potentieel Aangetaste Fractie). De logaritme bleef gehandhaafd, aangezien de PAF vrijwel altijd logaritmisches gerelateerd wordt aan blootstelling.

1.3 Nut en noodzaak van de pT waarde

Het milieubeleid kent verschillende doelstellingen in relatie tot de causaliteitsketen emissie-verspreiding-blootstelling-effect: emissiereductie doelstellingen in termen van percentage reductie per doelsgroep, kwaliteitsdoelstellingen als hoogst aanvaardbare of streefconcentratie van een verbinding in het milieu en ecologische doelstellingen, zoals “de zalm terug in de Rijn”. De vraag was op welk niveau in de causaliteitsketen het effect van milieubeleid het beste gemeten kan worden, zodanig dat het inzicht geeft in welke mate de hoofddoelstelling van het beleid (het bereiken van een dusdanige kwaliteit dat de gezondheid van mens, plant en dier is gewaarborgd) kan worden bereikt. Emissiereductie is relatief eenvoudig vast te stellen, maar geeft niet noodzakelijkerwijs zicht op het bereiken van de hoofddoelstelling van het beleid. Die doelstelling vereist vooral meting in het milieu zelf. Daarbij kan men twee mogelijkheden onderscheiden: het meten van de blootstelling door middel van concentraties (chemische metingen) en metingen van effecten als gevolg van de blootstelling (biologische metingen). Chemische metingen hebben de voordelen van eenduidigheid, betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid, maar hebben het bezwaar dat complexe verontreinigingen moeilijk beoordeeld kunnen worden:

- De tot op heden geïdentificeerde chemicaliën vertegenwoordigen slechts een klein deel van het totale aantal mogelijk in het milieu aanwezige stoffen² ;
- Ook als het mogelijk was om alle stoffen te analyseren dan is de kennis omtrent de schadelijke effecten ontoereikend, aangezien er slechts voor een fractie van de stoffen toxiciteitsgegevens zijn die afzonderlijk onder laboratoriumcondities getest zijn.
- Zou men zich beperken tot die verbindingen waarover voldoende chemisch-analytische en toxicologische kennis bestaat, dan is interpretatie van de milieuschadelijkheid problematisch vanwege optredende combinatie-effecten.

Er kleven ook bezwaren aan biologische metingen. Ze zijn tijdrovend en niet altijd eenduidig te interpreteren. Daarnaast zijn er problemen betreffende de algemene geldigheid en de betrouwbaarheid door het variabele karakter van biologisch materiaal. Biologische metingen bieden echter ook grote voordelen ten opzichte van de chemische monitoring:

¹ Verder in dit rapport zal Species Sensitivity Distribution afgekort worden met SSD

² Er zijn ongeveer 150000 “bestaande stoffen” geregistreerd in de European Inventory of Existing Chemical Substances (EINECS)

- Deze metingen verschaffen informatie die samenhangen met de hoofddoelen van het beleid: de mate waarin de belasting van het milieu met toxicanten leidt tot schadelijke effecten,
- Organismen integreren de werking van de afzonderlijke componenten in complexe toxische cocktails: op effectwaarnemingen gebaseerde uitspraken worden niet gehinderd door het onbekend zijn van de aanwezige stoffen, noch door interpretatie problemen veroorzaakt door combinatiewerking.

Bij de start van het project was de verwachting dat een diagnose van de toxicologische toestand van het aquatische ecosysteem via pT, dus zonder de aanwezige contaminanten precies te kennen, spoedig toepassing zou vinden in beleidsondersteunende rapportages van het milieu- en natuurplanbureau. Het project pT werd in het begin uitgevoerd als onderdeel van MAP-Milieu (1994-1996). Vanwege het strategische belang dat enerzijds verwacht werd van de geaggregeerde maat voor de toxische druk van complexe mengsels, maar anderzijds niet eenvoudig te verwezelijken leek door conceptuele en praktische problemen, werd pT opgenomen in het MAP-Directie (later MAP SOR).

Sinds 1996 wordt een standaard methodiek van pT toegepast in een gezamenlijk monitoringprogramma van Nederlandse oppervlaktewateren door RIZA en RIVM en worden bijdragen geleverd aan milieubalansen.

1.4 Doel en randvoorwaarden

Het meerjarige doel van pT was een methode operationeel te maken voor monitoring van effecten door toxische stoffen in het milieu, met als grootheid aantasting van soortenrijkdom in ecosystemen, uit te drukken met behulp van de eenheid fractie of percentage. Tevens zou de methodiek inzetbaar moeten zijn om gegevens te genereren aan rapportage van het milieuthema Verspreiding in de Milieubalans. In principe zou het mogelijk moeten zijn om het relatieve belang van toxische stress ten opzichte van andere stressoren aan te geven (dominante stressanalyse). Tegen de achtergrond van de workshop bij DGM in 1991 getuigt dit doel van hoge ambities.

Het primaire doel was een operationele techniek voor toepassing voor het compartiment water. Een oorspronkelijk perspectief was om pT, behalve voor het compartiment water, ook voor monitoring van andere milieucompartimenten geschikt te maken. Een overweging hierbij was dat een methode die operationeel is voor water, in principe ook ingezet kan worden bij monitoring van regenwater en grondwater. In hoeverre deze toepassing bruikbare informatie oplevert voor het kwantificeren van toxische druk in lucht en bodem, is nog onduidelijk. Toepassing op regenwater verwijst mogelijk naar de toxische betekenis van diffuse belasting van water en bodem. Toegepast op grondwater zou het wellicht een indicatie kunnen geven voor de toxische belasting van bodem. Deze toepassingen staan momenteel nog ver af van het beoogde doel en tijdens de uitvoering van pT werd duidelijk dat uitwerking om conceptuele en praktische redenen niet haalbaar is.

De beoogde graadmeter voor oppervlaktewater dient in de causaliteitsketen te liggen tussen blootstelling aan de complexe cocktail van stoffen en de effecten ervan op een hoger biologisch integratieniveau, zoals de aantasting van de soortenrijkdom. Om als maatlat voor de effectiviteit van het gevoerde stoffenbeleid te kunnen fungeren, zijn er diverse praktische vereisten:

1. De methodiek is logistiek inpasbaar in bestaande monitoring netwerken;
2. De methode is praktisch uitvoerbaar, in principe door niet-specialisten;
3. pT sluit aan bij het concept “ecotoxicologisch risico” zoals dat thans de basis vormt voor het afleiden van normen van stoffen in het milieu;³
4. Milieutoxiciteit kan vergeleken en gewogen worden met ecologische effecten veroorzaakt door andere stressoren. De te meten effecten worden veroorzaakt door toxische stoffen en niet door andere factoren.

³ In Nederland wordt een concentratie geacht een acceptable risico te representeren, indien tenminste 95% van de soorten beschermd wordt omdat ze niet boven hun NOEC (No Observed Effect Concentration) worden blootgesteld. De NOEC heeft betrekking op chronische toxiciteits experimenten.

2. Voorafgaande ontwikkelingen

Ontwikkelingen die aan het project vooraf gingen, zijn van grote invloed geweest op het basisontwerp van de pT methode, op de voortgang van het project en op het resultaat. Tijdens de uitvoering van het project pT kwam het SSD-concept tot ontwikkeling, waardoor een effect-gerelateerde grootte beschikbaar kwam, die universeel is dan de norm-gerelateerde PEC/PNEC ratio, maar die niet is gebaseerd op toxiciteitsmetingen aan complexe cocktails.

2.1 Afnemende toxische stress in oppervlaktewater

In de 70-er jaren gingen in het laboratorium watervlooiën en vissen bij blootstelling aan Rijnwater monster onmiddellijk dood. Emissiereducerende maatregelen voor specifieke stoffen (stofgericht beleid) en een sterke toename van het aantal afvalwater-zuiveringsinstallaties hebben voor een spectaculaire verbetering gezorgd. Met uitzondering van emissiestromen en puntbronnen zijn de huidige concentraties aan toxische stoffen zo laag dat geen acute effecten worden waargenomen. De toxicanten in een watermonster moeten geconcentreerd worden om nog effecten te kunnen meten in de beschikbare selectie van de gebruikelijke set laboratoriumtestsoorten. Desalniettemin zijn de concentraties van stoffen nog niet op het streefwaarde-niveau aangeland en bleef er reden om voor stoffen een milieu-effect indicator te ontwikkelen, met name vanwege het aspect “mengsels”.

Deze gunstige ontwikkelingen in de waterkwaliteit maakten het moeilijker om aan de eis van gemakkelijke uitvoerbaarheid te kunnen voldoen. Wat betreft de logistiek van monsternamen en behandeling is verdunnen van een watermonster immers gemakkelijker dan het concentreren van de daarin aanwezige toxicanten. In de praktijk is het verwijderen van water uit een watermonster (door vriesdrogen, verdamping of omgekeerde osmose) geen haalbare concentratietechniek. Voor het concentreren van toxische stoffen zijn extractiemethoden derhalve onvermijdelijk, meestal met een vaste fase.

De noodzakelijke vaste fase extractie maakt het gemakkelijker om aan de randvoorwaarde te voldoen van het maken van onderscheid tussen toxische stress en andere stressoren. Door extractie worden verzurende, vermestende of verziltende stoffen en andere stressoren gescheiden van toxische stoffen, waardoor toxische druk separaat meetbaar is. Als nadeel geldt dat door de specifieke werking van de vaste fase extractie tevens onderscheid gemaakt wordt tussen organische microverontreinigingen en toxische metalen. Het bleek praktisch onvermijdelijk om voor beide categorieën toxicanten afzonderlijke methoden te ontwikkelen.

2.2 Biologische monitoring van toxische stoffen

In de periode 1982 tot 1990 werd, voornamelijk bij het voormalige RID⁴, een methode ontwikkeld voor biologische monitoring van de chemische belasting van oppervlaktewater (Slooff en De Zwart, 1983; De Zwart en Slooff, 1983; Slooff *et al.*, 1983; Slooff *et al.*, 1984; Slooff *et al.*, 1985) die beschouwd kan worden als een voorloper van pT. Dit heeft geresulteerd in een combinatie van een concentratietechniek en een enkele bioassay voor het schatten van de toxiciteit van niet-identificeerbare verbindingen in oppervlaktewater. De Microtox, gebaseerd op reductie van bioluminescentie test (*Photobacterium phosphoreum*), was destijds de enig beschikbare geminiaturiseerde bioassay op organismaal niveau. Het concentreren van toxicanten werd door De Zwart en Folkerts (1991) gecombineerd met relatieve toxiciteitsmetingen met uitsluitend de Microtox en toegepast op watermonsters afkomstig van 18 stations in de Rijndelta. Lokale verschillen in toxiciteit werden aangetoond die verband hielden met lotgevallen van de toxicanten en verschillen in belasting van de Rijntakken. Voor de concentratietechniek werd door De Zwart en Folkerts (1991) vaste fase extractie met behulp van macroreticulaire harsen van het type XAD toegepast.

De Microtox bleek een mediane gevoeligheid te hebben in een voor toxiciteitstoetsen geselecteerde reeks vertegenwoordigers van diverse taxonomische klassen die voorkomen in aquatische ecosystemen. Dit kon worden afgeleid uit toxiciteitsgegevens van 15 verschillende anorganische en organische stoffen over verschillende taxonomische klassen (Slooff *et al.*, 1985). Deze bevindingen zijn *a priori* niet toepasbaar op een *individuele* stof, omdat voor een bepaalde verbinding de *Photobacterium phosphoreum* geheel ongevoelig kan zijn en voor een andere stof juist heel gevoelig. De rangschikking die door Slooff *et al.* (1985) kon worden afgeleid uit de single species toxiciteitsdata van afzonderlijke stoffen, werd door De Zwart (2002) van toepassing verklaard op een *complex mengsel* dat model zou kunnen staan voor een oppervlaktewatermonster. Volgens deze premisse zou voor dit complexe mengsel de (on)gevoeligste test een vergelijkbare positie innemen als in de rangschikking van het onderzoek van Slooff *et al.* (1985) en de Microtox zou dan weer een mediane gevoeligheid hebben en daarmee een goede indicator voor de toxiciteit van een monster van een doorsnee oppervlaktewater.

Voor extrapolatie van geconcentreerd naar origineel (ongeconcentreerd) watermonster is behalve de *locatie* (mediaan) ook een schatting nodig van de *breedte* van de gevoeligheidsverdeling van soorten in oppervlaktewater (dit wordt verder uitgelegd in paragraaf 3.1). Dus voor de realisatie van de maatlat pT voor toxische druk in oppervlaktewater zijn naast de Microtox nog minimaal 3 andere toxiciteitstoetsen nodig. De implementatie, aanpassing en verbetering van deze (geminiaturiseerde) toetsen waren een wezenlijk onderdeel van het pT project.

⁴ Rijks Instituut voor Drinkwateronderzoek, in 1986 met het RIV tot RIVM gefuseerd

3. De toxische druk in milieumonsters

Een testbatterij van geminiaturiseerde toxicologische testen van verschillende aquatische organismen biedt in principe de mogelijkheid om inzicht te krijgen in toxische druk. De noodzaak om een watermonster bij de huidige concentratieniveau's in oppervlaktewater aan een concentratieprocedure te onderwerpen brengt echter beperkingen met zich mee, waarvan de belangrijkste is dat het niet haalbaar is om één experimentele methode op *alle* milieucontaminanten toe te passen. In het project pT worden twee verschillende benaderingen gevolgd om toxische effecten te kwantificeren.

3.1 Toxische druk bepaald met *in vivo*-bioassays

Met behulp van *in vivo*-bioassays (“whole organism toxicity tests”) is het in principe mogelijk om de netto toxiciteit voor de in een ecosysteem aanwezige organismen te meten en te vertalen naar potentiële aantasting van de soortenrijkdom. De netto toxiciteit wordt bepaald door de directe effecten van toxische stoffen en de biologische mengseffecten die daarbij optreden en geldt voor zowel gemeten als niet-gemeten stoffen, onbekende stoffen en omzettingsproducten. Dit omvat in principe de zogenaamde “grijze deken”. Van de Plassche *et al.* (2002) geven de volgende definitie van *in vivo*-bioassays:

in vivo-bioassays zijn proeven waarin levende complete organismen (inclusief bacteriën) worden blootgesteld aan water, sediment, effluent of baggerspecie, of extracten daarvan. Deze testen kunnen worden uitgevoerd in het laboratorium of in de veldsituatie (in situ). De proeven kunnen kortdurend zijn (van enkele uren tot dagen) waarmee acute effecten kunnen worden vastgesteld, of langdurend (dagen tot maanden) waarmee chronische effecten kunnen worden bepaald. De in vivo-bioassay is een breedspectrum bioassay.

Volgens deze definitie beschikken *in vivo*-bioassays over een aantal voor pT vereiste eigenschappen. Direkte toepassing van aldus gedefinieerde *in vivo*-bioassays op oppervlaktewater is echter problematisch omdat:

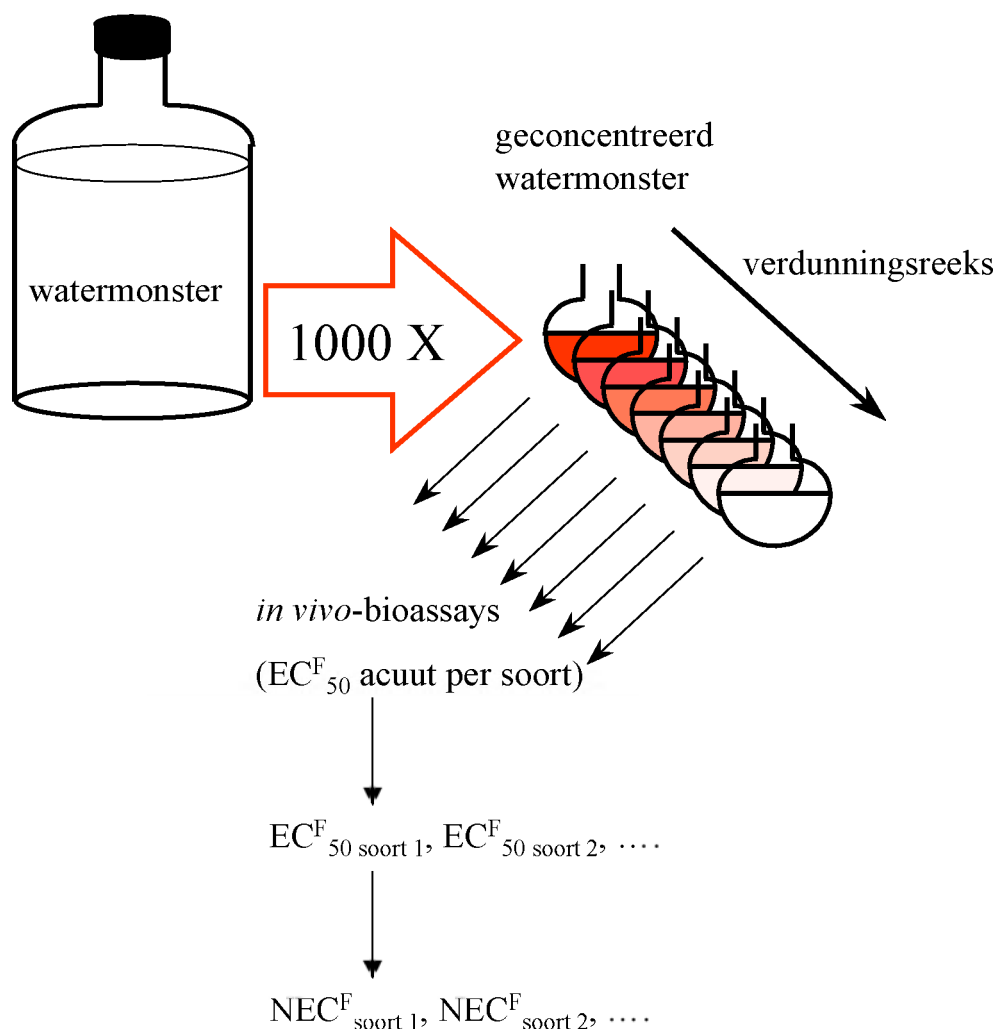
- de acute toxiciteit van een gemiddeld oppervlaktewatermonster aanzienlijk lager is dan doorgaans in *in vivo*-bioassays gemeten kan worden; concentrering van het water is derhalve noodzakelijk;
- stress die niet door toxische stoffen wordt veroorzaakt niet in de respons tot uitdrukking mag komen: toxische stress dient gescheiden te worden van andere stressoren.

De *in vivo*-bioassays worden in de pT methode uitgevoerd met oppervlaktewatermonsters, waarbij een deel van de stoffen via vaste fase extractie geconcentreerd is. Door vaste fase extractie van organische microverontreinigingen uit een watermonster worden toxicanten zowel geconcentreerd als gescheiden van andere in het monster aanwezige stressfactoren. Hieraan zijn nadelen verbonden. Een tekortkoming is dat de samenstelling van het concentraat verhoudingsgewijs afwijkt van het oorspronkelijke watermonster.

Concentratietechnieken zijn nu eenmaal selectief voor bepaalde groepen van organische stoffen doordat ze berusten op verschillen in fysisch-chemische eigenschappen van verschillende stoffen of stofgroepen, zoals verdelingscoëfficiënten en wateroplosbaarheid. Bij

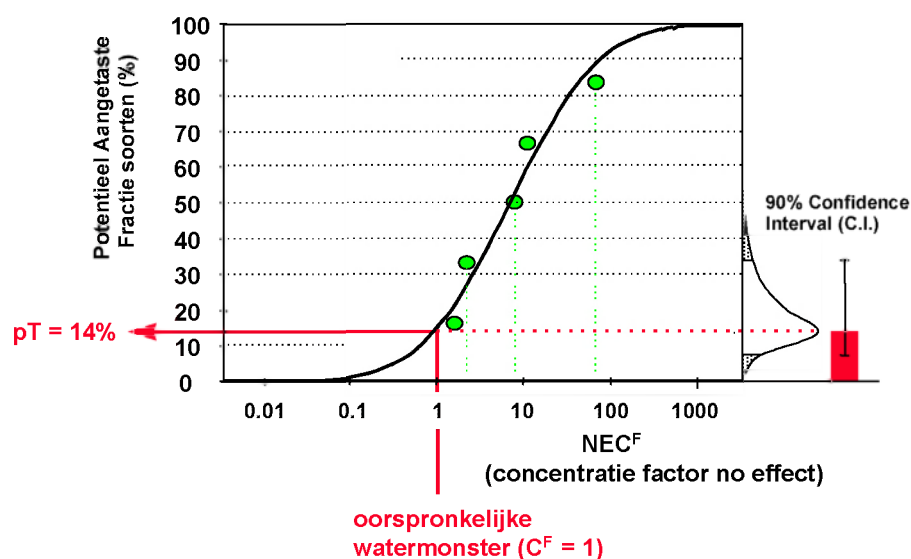
optimalisatie van de procedure werd gestreefd naar een zo hoog mogelijk rendement van alle organische chemicaliën. Door de typerende extractievoorwaarden die gesteld worden ten gevolge van de veelheid en verscheidenheid van deze categorie toxicanten, kan men er *a priori* vanuit gaan dat metalen zich vrijwel geheel aan de voor organische verbindingen optimale vaste fase extractie zullen onttrekken.

Na uitvoering van een set van 4 à 5 *in vivo*-bioassays is er informatie over de mate waarin de verschillende soorten gevoelig zijn voor geconcentreerde watermonsters. Via een statistische verdeling van deze waarnemingen, vergelijkbaar met de SSD uit de normstelling, kan een potentieel aangetaste fractie berekend worden. Een randvoorwaarde voor pT is dat de methodiek aansluit bij de systematiek voor het afleiden van normen voor stoffen. Aangezien normen gebaseerd zijn op *chronische* effecten en men met de *in vivo*-bioassays in geminiaturiseerde vorm slechts acute toxiciteit meet, is een extrapolatie van acute naar chronische effecten noodzakelijk (Figuur 1).



Figuur 1. Het experimentele deel van de pT methodiek; de bepaling van de mate waarin oppervlaktewater geconcentreerd moet worden om acute effecten (EC₅₀^F acuut) in in vivo-bioassays te verkrijgen.

Het modelmatige deel van de bepaling van de $msPAF_{pT}$ is gebaseerd op een gevoeligheidsverdeling van chronische no-effect waarden (NEC^F) van geconcentreerde watermonsters (Figuur 2). Deze verdeling is een ms-SSD (multi-substance) soorten gevoeligheidsverdeling, vergelijkbaar met de gebruikelijke SSD's die gebaseerd zijn op enkelvoudige stof-enkelvoudige soort toetsen. Uit het model wordt, bij de oorspronkelijke concentratie van het mengsel, ofwel $C^F = 1$, afgelezen hoe groot de potentieel aangetaste fractie is. Deze wordt, in analogie aan PAF uit de SSD voor een enkelvoudige stof, eveneens aangeduid als PAF. Aangezien het gaat om de SSD van een mengsel wordt de PAF echter aangeduid als $msPAF_{pT}$ of kortweg pT.



Figuur 2. Het modelmatige deel van de bepaling van de $msPAF$ (gemeten) of kortweg pT: de berekening van toxische druk door organische microverontreinigingen uit gemeten concentratiefactoren (De Zwart & Sterkenburg, 2002).

3.2 Toxische druk bepaald met gemeten concentraties

In het project "Indicator effecten toxische stoffen" (I_{tox}) werd een indicator ontwikkeld voor potentiële effecten van toxische stoffen in het milieu (Hamers *et al.*, 1996). In I_{tox} wordt aggregatie van een mengsel van toxische stoffen in een bepaald milieukompartiment vanuit een modelmatige invalshoek benaderd op basis van singel-species laboratorium toxiciteitsgegevens van verschillende soorten (Hamers *et al.*, 1996; Bakker en Van de Meent, 1997). De procedure berust op de distributie van de gevoeligheden van soorten voor blootstelling aan een enkelvoudige toxische stof. De input voor I_{tox} bestaat enerzijds uit gemeten (of modelmatig geschatte) concentraties van een stoffen in een milieukompartiment en anderszijds de SSD (Species Sensitivity Distribution, zie Posthuma *et al.*, 2002) van de afzonderlijke toxische stoffen. Bij voldoende ecotoxicologische gegevens van de verschillende stoffen kan de toxische druk als één getal (een fractie) worden uitgedrukt. Met deze benadering, aangeduid als $msPAF$ (multi substance PAF), kan toxische druk

gekwantificeerd worden zonder inbreng van andere milieustressoren in het betreffende milieucopartiment, waardoor afweging tussen de potentiële effecten van bijvoorbeeld vermisting en verzuring mogelijk is.

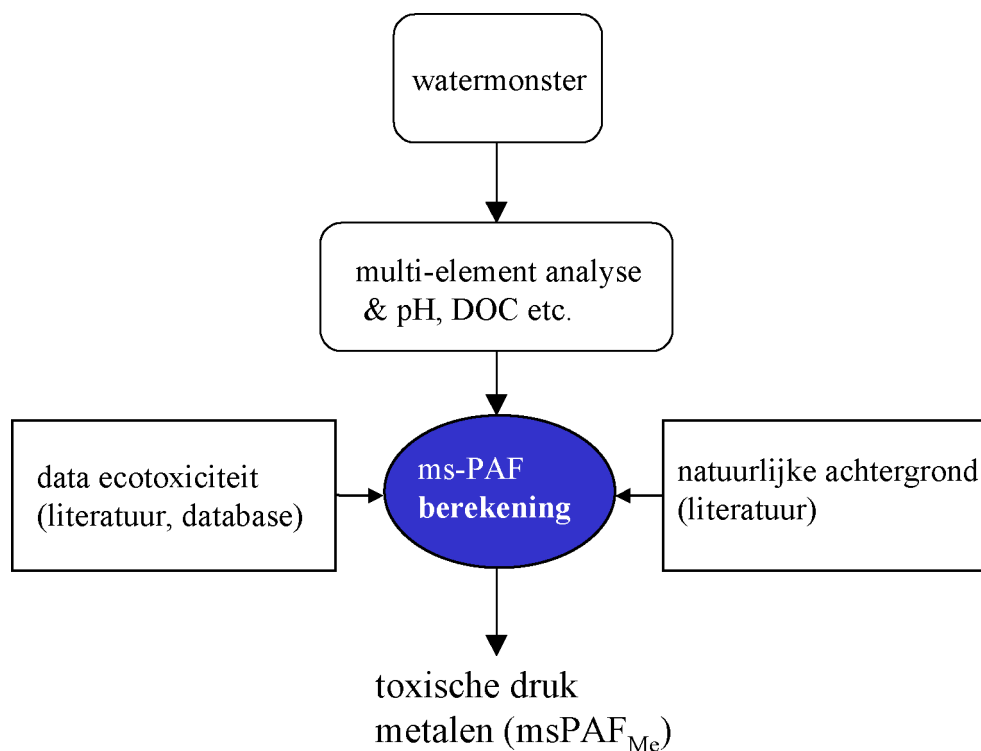
Vergeleken met organische microverontreinigingen bestaat de categorie van metalen uit een beperkt aantal toxicanten. De bijdrage aan toxische stress kan echter lokaal aanzienlijk zijn. De I_{tox} benadering biedt een interessante mogelijkheid om de toxische druk van metalen afzonderlijk en ook per lokatie te bepalen en is een aanvulling op de via *in vivo*-bioassays bepaalde $msPAF_{pT}$ die niet op metalen kan worden toegepast.

De chemische analyse van veel metalen is relatief efficiënt uit te voeren met multi-elementanalyse op basis van ICP-MS (inductief gekoppeld plasma gecombineerd met massaspectrometrie) en is voldoende gevoelig om antropogene niveau's te kwantificeren. Bovendien zijn er veel gegevens over de toxiciteit van metalen beschikbaar en kan volgens de I_{tox} procedure de toxische druk van een mengsel van metalen bepaald worden.

Uiteraard zijn ook aan deze benadering ook nadelen verbonden. De vorm waarin het metaal in het milieu voorkomt (metaalspecië) is een niet te verwaarlozen complicatie met grote invloed op de toxiciteit. Voor een zinvolle toepassing is kennis van de biologische activiteit ten opzichte van de gemeten totale (opgeloste) concentratie onontbeerlijk. De volgende aannames worden gedaan:

- het vrije metaalion bepaalt de toxiciteit, zowel in gestandaardiseerde toxiciteitstoetsen als in het veld;
- de fractie van het vrije metaalion t.o.v. de opgeloste totaalconcentratie wordt via modellering verkregen met behulp van een beperkt aantal gemakkelijk toegankelijke milieuparameters, zoals pH en DOC.

De uit geanalyseerde metalen berekende PAF wordt $msPAF_{Me}$ genoemd (Figuur 3).



Figuur 3. Op chemische analyse en toxiciteitsdata van metalen gebaseerde $msPAF_{Me}$

3.3 Overzicht van de gekozen terminologie

Bij pT worden de toxiciteitsgegevens van een genomen oppervlaktewatermonster zelf bepaald, na een bewerking (concentrerings) van het monster, zonder aard en concentraties van de toxicanten te kennen. Hoewel de term multi-substance PAF (gemeten), ofwel msPAF(gemeten), niet geheel bevredigend is omdat de pT methodiek ook een modelmatige stap bevat, wordt hiervoor gekozen om te benadrukken dat de variatie aan toxische effecten daadwerkelijk gemeten wordt, ook al volgt daarna modellering. Hieronder worden de belangrijkste termen samengevat:

pT hiermee wordt zowel het project als de methodiek aangeduid waarmee de toxische druk van een onbekend mengsel van organische toxicanten gekwantificeerd wordt op een schaal tussen 0 en 1 of tussen 0 en 100 %; pT is tevens de verkorte aanduiding voor msPAF(gemeten).

msPAF(gemeten) de toxische druk van organische toxicanten in oppervlaktewater. Deze wordt bepaald door een hybride procedure: een experimentele waarin de toxicanten geconcentreerd worden en waarin door toepassing van een verdunningsreeks en *in vivo*-bioassays acute effecten worden waargenomen. Deze waarnemingen leveren een set van (dimensieloze) EC_{50}^F waarden. Daarna wordt volgens een modelmatige procedure, onder de aannamen dat de set van EC_{50}^F waarden log-normaal of log-

logistisch zijn verdeeld en dat de ratio acuut/chronisch *van de complexe cocktail* gelijk is aan 10, de msPAF(gemeten) bepaald.

msPAF_{Me}

de berekende toxische druk van een selectie van metalen in monster van oppervlaktewater. Deze komt tot stand door middel van het meten van de opgeloste concentraties en een set van systeemp parameters (zoals pH en DOC) van hetzelfde watermonster. Het modelmatige deel bestaat uit het berekenen van de beschikbare fractie van ieder afzonderlijk metaal Me(i) en de PAF_{Me(i)}. Vervolgens wordt verondersteld dat de effecten onafhankelijk van elkaar zijn en worden de PAF waarden van de afzonderlijke metalen volgens de rekenregel voor respons-additie gecombineerd tot msPAF_{Me} en vergeleken met de (beschikbare) achtergrond.

4. De ontwikkeling van pT

De operationalisatie van de msPAF(gemeten) met behulp van *in vivo*-bioassays werd als korte-termijndoel aangemerkt. De Microtox toets was al operationeel en kon direct worden toegepast. Het lag in de verwachting dat beide pijlers waarop het experimentele deel van pT berust snel gerealiseerd zouden worden. In het voormalige Laboratorium voor Ecotoxicologie (ECO) bestond al een methode om organische microverontreinigingen uit water te extraheren die compatibel leek te zijn met bio-assays. De methode was gebaseerd op vaste-fase extractie met behulp van een combinatie macroporeuze harsen XAD-4 en XAD-8. De Zwart en Folkerts (1991) hadden deze methode toegepast vanwege de sorptiecapaciteit voor een breed scala van organische microverontreinigingen en de specificiteit voor biologisch actieve, dus toxische verbindingen. Bovendien werd verwacht dat andere recent op de markt verschenen toxkits spoedig beschikbaar kwamen. Langs drie onderzoeklijnen werd met het project pT begonnen:

1. het uittesten en verbeteren van de vaste fase extractie voor het concentreren van toxische stoffen in een watermonster;
2. het implementeren van voldoende geminiaturiseerde aquatische ecotoxiciteitstoetsen volgens de definitie van “*in vivo*-bioassays” (toxkits);
3. het ontwikkelen van een methode om op basis van de resultaten van toxiciteitsmetingen aan een geconcentreerd watermonster de fractie onbeschermde soorten (als PAF) in het oorspronkelijke watermonster te kunnen berekenen.

Bij aanvang van pT werd onderzoeklijn 1. als de grootste uitdaging gezien. De moeilijkheidsgraad lag in de noodzaak om enerzijds een organische fase aan te wenden om de milieutoxicanten te concentreren en anderzijds deze toxicanten in geconcentreerde vorm weer terug te brengen in de waterfase voor de toxiciteitstesten. De gehele procesgang is thermodynamisch echter zeer ongunstig en alleen te realiseren door middel van een aanzienlijke toevoer van energie en/of materiaal, met alle risico's van introductie van toxische stoffen (afkomstig van de hulpmaterialen) of - door de energiestroom - juist verlies van toxische stoffen die in het watermonster aanwezig waren. Een andere fase dan water is ongeschikt om de toxicanten cocktail uiteindelijk aan *in vivo*-bioassays te kunnen aanbieden. Tijdens oriënterende experimenten kwamen de volgende problemen aan het licht:

- De concentrering van toxicanten in een watermonster schoot ernstig tekort: vrijwel alle teststoffen gingen volledig verloren door vervluchtiging;
- Er kon weinig onderscheid gemaakt kon worden tussen een schone referentie (bijvoorbeeld gedestilleerd water) en verscheidene monsters oppervlaktewater met verschillende verontreinigingsgraad;
- Verschillende commercieel verkrijgbare toxkits vertoonden dusdanige gebreken dat aanpassingen onvermijdelijk waren;

In plaats van een snelle realisatie van een pT-methode door toepassing van al aanwezige methoden en commercieel verkrijgbare toxkits, leek een lang traject van methodiekontwikkeling in het verschiet. Voor wetenschappelijke acceptatie van pT bleek er

gaandeweg behoefte aan 1) een solide blanco controle die deel uitmaakt van de procedure en 2) kwantificering van eliminatie van organische verbindingen tijdens de concentreringsprocedure.

4.1 De go/no-go beslissing

Er was sprake van een dilemma. Enerzijds was aangetoond dat tijdens de oorspronkelijke opwerkingsprocedure vrijwel alle hydrofobe verbindingen uit het monster verdwenen, waaronder veel bestrijdingsmiddelen, anderszijds was duidelijk dat in het oppervlaktewater verbindingen aanwezig zijn die met de oorspronkelijke procedure van De Zwart en Folkerts (1991) geconcentreerd kunnen worden én in de Microtox test een respons geven. *Het kon niet worden uitgesloten, maar evenmin bevestigd, dat deze verbindingen een afspiegeling zijn van toxische druk in oppervlaktewater, die gezien de doelstelling van pT bruikbaar is.*

In de oorspronkelijke methode werden waarschijnlijk een aantal meer polaire stoffen geconcentreerd, waaronder HPVC's (high production volume chemicals) zoals surfactanten maar ook een aantal toxische bestrijdingsmiddelen. Daarnaast werden waarschijnlijk ook de minder polaire HPVC's zoals (polycyclische) musken en ftalaten voor een deel geconcentreerd. Na concentratie kunnen er voldoende stoffen uit de categorie hoge emissie (HPVCs) en/of uit de categorie hoge toxiciteit (pesticiden) aanwezig zijn om een respons in de Microtox test te geven. Het was onduidelijk welke verbindingen voor de respons verantwoordelijk waren. Een systematische verbetering van de concentratietechniek was nodig. Uiteindelijk moest met behulp van een serie testchemicaliën de relatie tussen fysisch-chemische eigenschappen en verlies in de concentratieprocedure duidelijk worden. Het tussendoel werd een kwantitatieve uitspraak over de efficiëntie van de concentratietechniek voor organische microverontreinigingen die relevantie hebben voor oppervlaktewater.

Een mijlpaal werd bereikt met de totstandkoming een procedure voor het berekenen van msPAF(gemeten) op basis van concentratiefactoren die gerelateerd zijn aan acute effecten in de toxkits (Roghair *et al.*, 1997; De Zwart en Sterkenburg, 2002). De vastgestelde rekenprocedure levert behalve de mediane waarde van msPAF(gemeten) tevens de onzekerheidsmarges (5^e en 95^e percentiel) die vanwege het geringe aantal toxiciteitsmetingen aanzienlijk zijn.

Ondanks de tekortkomingen en beperkingen werd sinds 1996 de pT methodiek⁵ toegepast in monitoring van oppervlaktewater. In een gezamenlijke campagne van RIZA en RIVM werden plaatselijke verschillen in toxische druk aangetoond waarbij de toxiciteit consistent afneemt in volgorde van de Schelde, de Maas en de Rijn.

Zowel de monitoring door RIVM en RIZA (project Kartering Ecotoxicologische Effecten Stoffen) als de methodiekontwikkeling in het project pT vergde een grote capaciteitsinzet van ECO. Een aantal problemen in de methodiek bleken dermate hardnekkig te zijn dat het noodzakelijk was de balans op te maken voor een beslissing over voortzetting van pT. Het

⁵ de *state of the art* techniek die op dat moment operationeel was

rapport “De pT-methode voor het bepalen van milieutoxiciteit. Noodzaak en ontwikkelingsstatus” (De Zwart, Roghair en Struijs, 1996) vormde de basis voor een “go/nogo” beslissing eind 1996. Na een workshop met de RIVM directie werd besloten om het project pT te continueren. Vervolgens werden investeringen gedaan om de concentratietechniek te optimaliseren. De in 4.2.2 beschreven stappen in de opwerkingsprocedure werden in de daarop volgende jaren aangepast, toegevoegd of geëlimineerd. Verschillende testmengsels van narcotiserende stoffen, polaire en apolaire bestrijdingsmiddelen, detergenten en organotinverbindingen werden onderzocht, zowel bij de optimalisatie van de concentratietechniek als in het onderzoek naar de validiteit en betekenis van de gehele methodiek.

In een afzonderlijk deelproject werd de bepalingmethode voor toxische druk van metalen in oppervlaktewater verder uitgewerkt en toegesneden op de doelstellingen van het project.

4.2 Optimalisatie en validatie

4.2.1 De blanco

De methodiek geeft geen uitsluitsel over de herkomst en identiteit van toxische stoffen die in geconcentreerde vorm een acuut effect kunnen geven. Een toxische stof kan bijvoorbeeld al in het watermonster aanwezig zijn, maar kan ook onbedoeld tijdens en door de procedure worden geïntroduceerd. Daarom bestond er een primaire behoefte om te kunnen beschikken over een betrouwbare en reproduceerbare blanco. Tijdens optimalisatie van de concentratietechniek werden verschillende media en materialen (macroporeuze harsen, elutievlloeistof, glas, staal *etcetera*) in variërende hoeveelheden, van verschillende herkomst of als alternatief toegepast. Ook bij optimalisatie van het tijdrovende zuiveren van de XAD harsen was het noodzakelijk om aan de hand van de blanco procedure te controleren of er onzuiverheden waren geïntroduceerd.

Ook de monitoringcampagne van RIZA/RIVM vereiste vanaf het begin in 1996 een solide blanco om tijdig onvolkomenheden in bemonstering en opwerking te kunnen detecteren. De eerste experimenten waren dan ook primair gericht op een gemakkelijk verkrijgbare referentie (Struijs en Van Buren, 1995), wat geleid heeft tot een operationele definitie van “water zonder toxische druk”: water dat bij de hoogste concentreringsfactor (450 X) in de Microtox nog geen effect geeft (zie kader 1).

Kader 1

Gedemineraliseerd voldeed niet aan de op de Microtox-effecten gebaseerde eis, evenmin als dubbelgedestilleerd water. Het laatste kan merkwaardig genoemd worden, omdat tijdens de eerste destillatiestap een destructie met zuur kaliumpermanganaat plaatsvindt waardoor sporen organische contaminanten in het uitgangsmateriaal (gedemineraliseerd water) zouden moeten verdwijnen. Commercieel verkrijgbaar mineraalwater van het merk Spa Blauw bleek reproduceerbaar aan de Microtox-eis te voldoen. Het was op dat moment nog niet zeker of daarmee ook aan de conditie msPAF(gemeten) = 0 % kon worden voldaan. Toen de overige toxkits operationeel waren, bleek dat de blanco (Spa Blauw) aan die eis voldeed.

4.2.2 De concentratietechniek

Bij aanvang van het pT project was een “standard operating procedure” beschikbaar voor het extraheren van organische microverontreinigingen uit een watermonster met behulp van XAD harsen (SOP ECO/076/00, 1993). Deze beschrijft de bewerking van een watermonster in drie verschillende stappen:

- adsorptie van de organische microverontreinigingen aan XAD-4/XAD-8 harsen,
- desorptie van de organische verbindingen door middel van elutie met aceton,
- verwijdering van aceton door 6 uur afblazen en geleidelijk toedienen van kleine hoeveelheden water waardoor uiteindelijk een watermonster ontstaat waarin de organische contaminanten 1000 keer geconcentreerd zijn.

Een literatuuronderzoek naar extractie/concentreringsmethoden (Struijs en Van Buren, 1995) bevestigde de combinatie van XAD-4 en XAD-8 als het optimale mengsel van harsen voor extractie van een grote verscheidenheid van organische contaminanten uit water. Ook de keuze van aceton om de verbindingen van deze harsen te desorberen was met deze keuze van harsen kwalitatief optimaal.

De derde stap ging echter in kwantitatieve zin gepaard met een groot verlies aan hydrofobe verbindingen, zoals bleek bij oriënterende experimenten met twee testmengsels (hydrofobe/narcotiserende stoffen en pesticiden). Van het testmengsel met 12 narcotiserende verbindingen met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen, kon slechts 2,4-dichlooraniline na de concentratieprocedure aangetoond worden, echter met verlies van 96 %. Deze verbinding had binnen het testmengsel de laagste lucht-water verdelingscoëfficiënt. Hoewel het testmengsel van 7 bestrijdingsmiddelen uit stoffen bestond met een lagere vluchtigheid, konden drie verbindingen niet meer aangetoond worden. Het isoleren/concentreren van hydrofobe organische verbindingen, waarvoor het gebruik van een *organisch oplosmiddel* onvermijdelijk is, laat zich moeilijk combineren met het aanbieden van de toxicanten *in de waterfase* (zonder solvent) wat cruciaal is voor de *in vivo*-bioassays.

De eerste modificatie van de concentratietechniek resulteerde in een reductie van het volume aceton⁶, waardoor nog slechts 20 minuten af/doorblazen met stikstof nodig was om residuen van dit oplosmiddel te verwijderen tot een voor de toxkits aanvaardbaar niveau. SOP ECO/076/00 (1993), voortgekomen uit het onderzoek van De Zwart en Folkerts (1991), werd vervangen door twee procedures:

- SOP ECO/303/00 (1996) voor de vaste fase extractie met XAD en desorptie met aceton
- SOP ECO/310/00 (1997) voor de opwerking van het aceton eluaat tot een watermonster dat compatibel is met *in vivo*-bioassays (Collombon *et al.*, 1997).

Daarnaast werden pogingen ondernomen om aceton als elutiemiddel geheel te vermijden (zie kader 2).

⁶ Een Kuderna-Danish destillatie werd in de procedure opgenomen voor het grotendeels verwijderen van aceton.

Kader 2

Als alternatief voor het moeilijk te verwijderen en zoals later bleek voor sommige toxkits bezwaarlijke aceton, werd super-kritisch CO₂ (super-critical fluid extraction, SFE) toegepast om de op XAD geaccumuleerde stoffen te elueren. Dit bleek een belangrijke en consistente verbetering voor het testmengsel van 12 narcotiserende stoffen (Collombon *et al.*, 1997, Struijs *et al.*, 1998), maar werkte onbevredigend uit bij testmengsels met in het totaal 12 pesticiden (Struijs *et al.*, 1998). De aantrekkelijke kanten van de SFE methode zijn de gemakkelijk verwijdering van het niet-toxische elutiemiddel CO₂. De SFE methode bleek helaas geheel ongeschikt voor de meer polaire verbindingen en omdat een deel van de toxische druk in oppervlaktewater aan deze categorie (sommige bestrijdingsmiddelen, detergenten en dergelijke) moet worden toegeschreven, werden verdere pogingen met SFE gestaakt.

De tweede modificatie bracht een doorbraak zowel wat betreft het terugdringen van de verliezen van stoffen door vervluchtiging als met betrekking tot logistieke aspecten. De belangrijkste veranderingen waren:

- Achtvoudige reductie van de hoeveelheid XAD, met voor monitoring belangrijke financiële en logistieke voordelen;
- Door verdere reductie van het volume aceton (1,7 in plaats van 3 bedvolumina) kon de destillatie dermate efficiënt worden uitgevoerd dat afblazen geheel achterwege kon blijven. Het verlies van de 12 narcotiserende stoffen was zelfs minder dan met de SFE techniek (zie kader 1), terwijl de relatief hoge opbrengst voor de meer polaire stoffen, met vooral bestrijdingsmiddelen, gehandhaafd bleef.

Door deze verbetering was de opbrengst van de testchemicaliën op een zodanig niveau gekomen dat van verdere optimalisatie werd afgezien.

Tijdens het optimalisatie-onderdeel werden in totaal 30 verschillende verbindingen tenminste één keer aan een bepaalde versie van de concentratietechniek onderworpen: 12 hydrofobe verbindingen, 13 bestrijdingsmiddelen, 3 surfactanten en 2 organotin verbindingen. Van deze teststoffen werden 16 verbindingen (11 hydrofobe en 5 bestrijdingsmiddelen) in alle versies van de procedure geanalyseerd. De resultaten met deze teststoffen (Tabel 1) geven een beeld van de stapsgewijze verbetering van de concentratietechniek. De lucht-water verdelingsconstante van de stoffen bestrijkt 9 orden van grootte, waarbij zoals verwacht kon worden de opbrengst laag was voor vluchtige stoffen, zoals 1,4 dichloorbenzeen en hexachloorethaan, met een Henry coëfficiënt (H) van 160 en 6800 Pa m³ mol⁻¹ respectievelijk. Van de geteste stoffen met een opbrengst van meer dan ca 60 % is het bereik van H nog ca 7 orden van grootte. Alle stoffen uit Tabel 1 hebben een log K_{ow} tussen 2,6 tot 4,8. In het eindrapport van de optimalisatie van de concentratietechniek (Struijs en Van de Kamp, 2001) werden de volgende conclusies getrokken:

- De efficiëntie, gemeten als chemische opbrengst, is gestegen van 17 naar ongeveer 60 %, met de kanttekening dat het onmogelijk is om precies de geëxtraheerde fractie van stoffen te kennen die verantwoordelijk is voor toxische stress in een *onbekend* watermonster. De resultaten met de testchemicaliën zijn slechts een indicatie voor de efficiëntie die men mag verwachten bij het concentreren van organische microverontreinigingen in een monster van reëel oppervlaktewater. De testmengsels dienden als hulpmiddel bij het optimaliseren van de methode;

- De methode is minder arbeidsintensief en verbruikt minder kostbaar materiaal;
- De vaste fase extractie vertoont een licht verminderde efficiëntie voor meer polaire chemicaliën. Deze tendens is sterker wanneer water een hoge humusconcentratie bevat (zie kader 3);
- Met *in vivo*-bioassays gemeten effecten in opgewerkte watermonsters worden veroorzaakt door de daarin aanwezige toxische stoffen;
- De concentratietechniek is op sommige onderdelen erg gevoelig voor juiste behandeling van materialen en vereist gespecialiseerd personeel;
- De efficiëntie van de concentrering is reproduceerbaar.

Tabel 1. Recoveries van 16 stoffen in 4 verschillende procedures die in de loop van het pT project werden getoetst.

Procedure voor een 60 L watermonster	ECO/076/00 (1993) ¹	ECO/303/00(01), ECO/310/00 (1997/1998) ²	ECO/303/01 & SFE (1997/1998) ³	ECO/303/02 ECO/310/01 (1999) ⁴
Sorptie	120 ml XAD	120 ml XAD	30 ml XAD	15 ml XAD
Elutie	120 ml aceton	120 ml aceton	Super-crit. CO ₂	25 ml aceton
Destillatie	Niet	K-D	Niet	Micro K-D
Teststof Afblazen	6 hr	20 min	Niet	Niet
1,4-dichloorbenzeen	0	0	5	29
hexachloorethane	0	0	5	21
1,3,5-trichloorbenzeen	0	0	24	36
3,4-dichloortoluene	0	0	26	49
1,2,3-trichloorbenzeen	0	0	37	61
3-chloornitrobenzeen	0	49	58	79
2,4-dichlooraniline	4	49	49	83
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen	0	0	48	69
3,4-dichloor-nitrobenzeen	0	48	60	75
2,4,6-trichlooraniline	0	44	53	76
pentachloorbenzeen	0	6	43	69
lindaan	0	36	12	64
m-parathion	79	55	21	77
fenchlorphos	0	20	27	58
chlorfenvinphos	95	52	79	81
diuron	91	66	6	74
Gemiddeld	17	26	34	63

¹ resultaten Collombon *et al.* (1997).

² resultaten (polair) hydrofobe stoffen door Collombon *et al.* (1997); data pesticiden zijn het gemiddelde van resultaten door Collombon *et al.* (1997) en Struijs *et al.* (1998).

³ data (polair) hydrofobe chemicaliën zijn het gemiddelde van resultaten door Collombon *et al.* (1997) en Struijs *et al.* (1998); data bestrijdingsmiddelen: Struijs *et al.* (1998).

⁴ Data Struijs en Van de Kamp (2001)

Kader 3

De tweede modificatie maakte het mogelijk de afblasstap geheel achterwege te laten, waardoor de prestatie van de concentratietechniek sterk verbeterde. Een voorwaarde was dat de hoeveelheid XAD per watermonster met bijna een orde van grootte verlaagd werd. Er was enige ongerustheid omtrent de competitieve rol van het in een reëel opervlaktewatermonster altijd aanwezige opgeloste organisch koolstof (DOC). Ter controle werden naast de recovery experimenten met gedemineraliseerd water waaraan de teststoffen waren toegevoegd, vergelijkbare series met 10 mg/L DOC onderzocht, waarmee watermonsters met een hoog DOC gehalte gesimuleerd werden. Ook werd aan een reëel watermonster, afkomstig van het Amsterdam-Rijn kanaal, het testmengsel toegediend. Er was enige competitie merkbaar, maar het nadeel van een gering verlies woog geenszins op tegen de voordelen die de nieuwe procedure bood.

4.2.3 *In vivo*-bioassays (“toxkits”)

Op basis van een literatuurstudie naar de typerende gevoeligheidskenmerken van de beschikbare toxkits stelden Willemsen *et al.* (1995) een minimum testbatterij van microbiotests voor, waarmee de meeste klassen van toxicanten konden worden gedetecteerd. Criteria waren onder andere toetsgemak, volledigheid van documentatie, reproduceerbaarheid, mate van standaardisatie en relatieve gevoeligheid voor milieumonsters en enkelvoudige stoffen. De volgende testbatterij werd geselecteerd: de Microtox, een algen “microplate” toets, de Thamnotoxkit F met larven van kreeftachtigen en een bacteriële mutageniteitstoets (Mutatox).

Een probleem bij geminiaturiseerde toxiciteitstesten voor aquatische organismen is het kleine watervolume dat grote grensvlakken impliceert. Processen aan een grensvlak zoals vervluchtiging en adsorptie aan de wanden kunnen leiden tot een onderschatting van de feitelijke blootstelling in de test met als gevolg een onderschatting van de toxiciteit. De criteria ten aanzien van de testbatterij werden door Vaal en Folkerts (1998) meer toegesneden op pT, waarbij behalve op gevoeligheid en reproduceerbaarheid, vanwege de kleine testvolumina vooral gelet werd op blootstellingsduur en de geometrie. De Thamnotox F test, Rotox F test (een radardiertje), de MicroTox test, de Algentoxkit F en de *Daphnia* IQ (watervlo) werden getest met kaliumdichromaat en twee testmengsels (hydrofoob/narcotiserend en bestrijdingsmiddelen). De Algentoxkit F bleek ongeschikt vanwege de te lange toetsduur (72 uur) waardoor te groot verlies door grensvlakprocessen optrad. Dit bleek ook het geval bij de Thamnotox F en de Rotox F; de eerste test kon worden aangepast, de tweede niet. Vaal en Folkerts (1998) concludeerden dat de Microtox, de verbeterde Thamnotox F en de *Daphnia* IQ een goede basis vormden voor een testbatterij voor het bepalen van toxische stress in het aquatische ecosysteem maar dat uitbreiding tot tenminste 4 taxonomisch verschillende klassen gewenst was, bij voorkeur met een kortdurende test met algen vanwege hun ecologische functie. Ondanks de beperkingen bleef de Rotox F deel uitmaken van de testbatterij zodat deze uit tenminste vier verschillende organismen bestond.

4.2.4 Validatie

Op basis van deze testbatterij werd een toxicologische validatie uitgevoerd met een mengsel van hydrofobe stoffen met een niet-specifieke (narcotiserende) werking (Vaal *et al.*, 1999). De concentraties lagen in het mg/L gebied en verschilden per stof, afhankelijk van de hydrofobiteit. De toxiciteit werd gemeten van 1) het mengsel, 2) het 1000 keer verdunde mengsel dat vervolgens weer 1000-voudig was geconcentreerd volgens de concentratietechniek, 3) 1000-voudig geconcentreerde blanco (ofwel mineraalwater dat aan de concentratieprocedure werd onderworpen) en 4) een 1000-voudig geconcentreerde blanco waaraan het mengsel pas aan het eind werd toegevoegd. Deze experimenten hadden tot doel om verlies aan toxische stoffen als vermindering van toxisch effect waar te nemen, maar ook toename van toxiciteit als mogelijk gevolg van de concentratieprocedure. Uit de resultaten met de blanco bleek dat de concentratietechniek een aanzienlijk toxisch effect introduceerde. De overall toxiciteit van de blanco watermonsters benaderde de toxiciteit van de

watermonsters waaraan de teststoffen waren toegevoegd. De concentratietechniek werd op twee onderdelen verbeterd (Struijs *et al.*, 2000) waardoor de oorzaak (residuen aceton) werd weggenomen. Vaal *et al.* (1999) concludeerden dat uittesten van pT vanuit een toxicologische invalshoek onmisbaar is omdat met uitsluitend chemische analyses dergelijke artefacten waarschijnlijk onopgemerkt waren gebleven.

In 1999 kwam een methode met algen (*Selenastrum capricornutum*) beschikbaar die aan de gesteld eisen voldeed (Van Beusekom *et al.*, 1999). De PAM test, waarbij de inhibitie van de fotosynthese efficiëntie van de alg *Selenastrum capricornutum* met een Pulse-Amplitude-Modulation fluorometer wordt gemeten, werd operationeel in de projecten pT en Kartering Ecotoxicologische Effecten Stoffen.

Na de tweede modificatie van de concentratietechniek (Struijs en Van de Kamp, 2001) werd het onderzoek naar de toxicologische validiteit van de pT procedure herhaald. Behalve toepassing van de geheel herziene concentratietechniek (Vaal en Struijs, 2002) werd de de Rotox F test vervangen door de PAM test. Behalve het hydrofobe mengsel (9 stoffen) werden mengsels van bestrijdingsmiddelen (11) en oppervlakteactieve stoffen (2) onderzocht.

Tabel 2. Gemeten acute effecten in de verschillende cocktails, weergegeven als log EC^f50 in 4 verschillende toxkits; onderste deel tabel: mediane waarden voor PAF-bioassays (pT) met 90 % betrouwbaarheidsintervallen.

toxkit	narcotiserend	pesticiden	surfactanten
Daphnia IQ	2,43	1,40	1,15
PAM	3,00	1,15	3,00
Microtox	2,41	2,66	2,31
Thamnotox F	3,00	2,92	1,60
PAF (pT)	0,009 %	10,9 %	9,4 %
CL (5%)	0 %	1,4 %	1 %
CL (95%)	5,1 %	50,3 %	48,5 %

De resultaten worden als logaritme van de concentreringsfactor voor 50 % acuut effect in Tabel 2 weergegeven. Vrijwel alle effecten konden worden toegeschreven aan de aanwezigheid van de toxische teststoffen. Er was enig verlies met het hydrofobe mengsel als gevolg van de concentreringsprocedure en wandeffecten in de Thamnotox F.

Uit de resultaten werd geconcludeerd dat de verschillen in gevoeligheid voor de verschillende stofgroepen goed overeenkwamen met toxiciteitsgegevens uit de literatuur over narcotiserende (hydrofobe) stoffen, pesticiden en detergents. De Microtox test heeft voor de testmengsels een mediane gevoeligheid, zoals eerder gebleken was uit de analyse door Slooff *et al.* (1985) van toxiciteitsgegevens van 15 verschillende (an)organische stoffen over vertegenwoordigers van diverse taxonomische klassen van een aquatisch ecosysteem. De EC^f50 waarden werden berekend tot de mediaan van msPAF(gemeten) met betrouwbaarheidsintervallen (Tabel 2).

4.2.5 Vergelijking met berekening van PAF

Behalve voor het uittesten van de concentratietechniek en de toxkit testbatterij, dienden deze experimenten ook een ander doel, namelijk validatie van de rekenregels voor msPAF. De

concentraties van het testmengsel van 9 narcotiserende (hydrofobe) verbindingen lagen na 1000-voudige verdunning in het microgram gebied. De toxicologische gegevens van deze stoffen werden uit de RIVM e-tox Base (Wintersen *et al.*, 2002) verzameld. De op basis van de klassieke laboratoriumtoetsen bepaalde msPAF van dit verdunde mengsel bleek lager te zijn dan dan 0,01 % (zie Tabel 3). Toepassing van de pT methodiek resulteerde in een mediane waarde van msPAF(gemeten) die eveneens lager was dan 0,01 %.

De berekende msPAF van het mengsel van 11 verschillende bestrijdingsmiddelen (met 3 verschillende werkingsmechanismen) was 14 %, na correctie voor enig verlies in de concentratieprocedure. De mediane msPAF(gemeten) is met 11 %, gezien de grote onzekerheidsmarges (90% betrouwbaarheidsinterval is tussen 1,4 % en 50,4 %) als gevolg van het geringe aantal geteste soorten, goed in overeenstemming met de berekende msPAF. Een vergelijkbaar beeld leverde het mengsel van de twee meest toegepaste surfactanten. De msPAF(gemeten) PAF is door n = 4 weer met grote onzekerheid omgeven: tussen 1 % en 48,5 %. De msPAF werd op basis van data uit Feijtel en Van de Plassche (1995) berekend en is vrijwel gelijk aan de mediane waarde van msPAF(gemeten).

Tabel 3. De mediane waarden van msPAF(gemeten) en berekende msPAF voor drie cocktails: 9 narcotiserende stoffen, 11 pesticiden en 2 surfactanten

	narcotiserend	pesticiden	surfactanten
gemeten (n = 4): PAF (pT)	< 0,01 %	10,9 %	9,4 %
berekend: msPAF	< 0,01 %	14,4 %	11,3 %

Tabel 3 vertoont een opmerkelijke samenhang tussen het msPAF concept (Hamers *et al.*, 1996; Bakker en Van de Meent, 1997; Traas *et al.* 2002) en pT, waarbij men dient te bedenken dat msPAF(gemeten) slechts op vier in vivo-bioassays is gebaseerd. Bij het mengsel van uitsluitend narcotiserende verbindingen met een zeer lage toxische druk - of anders gezegd: met concentratiefactoren die in de verschillende toxkits hoog moest zijn om een acute effecten waar te kunnen nemen - is de onzekerheidsmarge slechts 5 %. De 90 % onzekerheidsintervallen voor de mengsels met pesticiden en surfactanten liggen tussen 1 % en circa 50 %.

4.3 msPAF voor een selectie van metalen (msPAF_{Me})

Voor metalen in water is de concentratietechniek op basis van vaste fase extractie met XAD harsen ongeschikt. Een alternatieve methode voor een selectie van metalen werd ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt werd van gemeten concentraties die vastgesteld werden met multi-elementanalyse⁷. Uit de gemeten concentraties en ecotoxicologische data uit de RIVM e-tox Base (Wintersen *et al.*, 2002) werd via SSD-modellering msPAF_{Me} berekend. Struijs *et al.* (2000) berekenden op deze wijze de toxische druk van 16 metalen uit gemeten concentraties⁸ in 8 verschillende watermonsters.

Voor ieder metaal werd afzonderlijk de PAF uitgerekend. De gecombineerde toxiciteit van alle metalen werd uitgerekend (msPAF_{Me}) volgens de respons-additie methode van Hamers *et al.*, (1996) en Traas *et al.* (2002), waarbij voor ieder metaal een verschillend werkingsmechanisme verondersteld wordt.

Gevevens over de achtergrondconcentraties in het stroomgebied van de Rijn werden aan de wetenschappelijke literatuur ontleend (Van de Berg en Zwolsman, 2000). Op analoge wijze werd de msPAF_{Me}(bg) voor de concentraties van de natuurlijke achtergrond (bg). De msPAF_{Me}(bg) werd afzonderlijk berekend en gerapporteerd⁹. Voor de volgende metalen werd de methode ontwikkeld: *beryllium (Be)*, *boon (B)*, *vanadium (V)*, *chromium (Cr)*, *nikkel (Ni)*, *koper (Cu)*, *zink (Zn)*, *arsen (As)*, *seleen (Se)*, *molybdeen (Mo)*, *zilver (Ag)*, *cadmium (Cd)*, *tin (Sn)*, *antimoon (Sb)*, *kwik (Hg)* en *lood (Pb)*.

4.3.1 Resultaten onder de aanname: opgelost is biologisch beschikbaar

Tabel 4 vat de resultaten samen van een onderzoek naar 8 verschillende locaties. Voor Cd, Sn, Hg en Pb bleek de detectielimiet hoger dan het achtergrondgehalte, wat de oorzaak is van een marge in PAF_{Me(i)} voor Me(i) en dus een de (geringe) marge in msPAF_{Me}. Deze marge wordt aan de ene kant begrensd door de “worst case” aanname dat de actuele concentraties van deze 4 metalen gelijk zijn aan de detectielimiet, aan de andere kant door aan te nemen (“best case”) dat deze slechts op het achtergrondniveau liggen.

Tabel 4. msPAF van 16 elementen van 8 verschillende locaties in 1998.

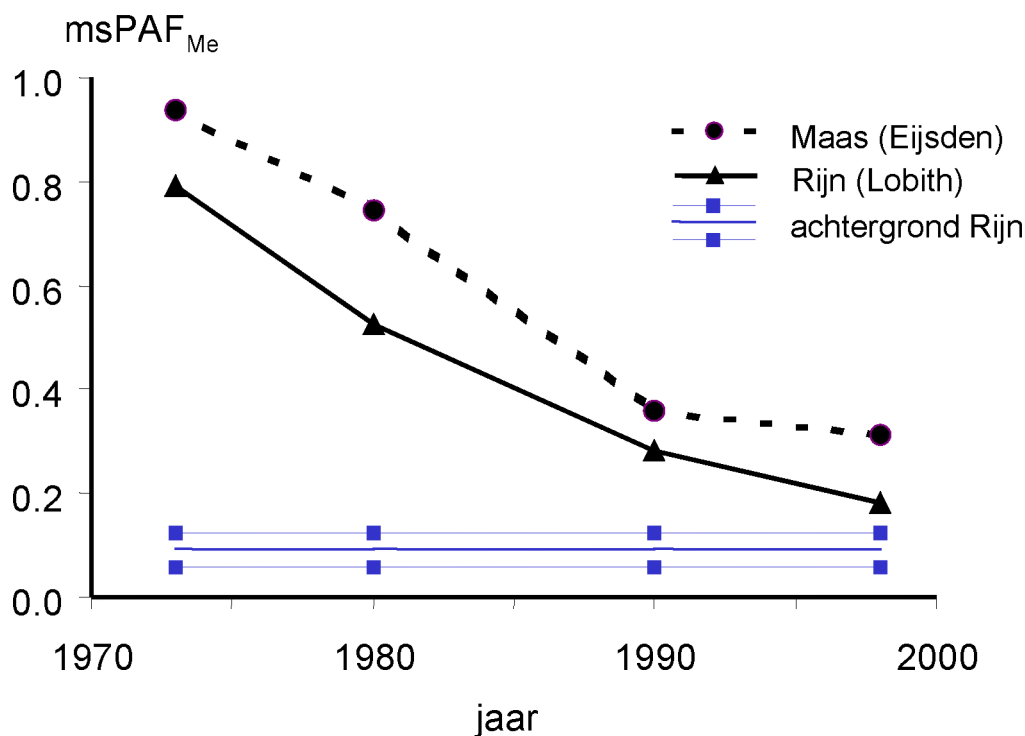
locatie	msPAF _{Me} (%)
achtergrond Rijn	8-10
Maas (Eijsden)	30-33
Rijn (Lobith)	17-20
Nieuwe Waterweg (Maassluis)	17-20
Schelde (Schaar v Oude Doel)	26-29
Vijver (Noordwijk)	10-13
Nauwernasche Braak (Assendelft)	26-29
Vijver (Oud-Beijerland)	11-14
De Aa (Rosmalen)	59-62

⁷ gebruik werd gemaakt van Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry (ICP-MS)

⁸ Onder gemeten concentratie wordt hier verstaan: de concentratie na filtratie over 0,45 µm en na aanzuren met salpeterzuur tot pH = 1.

⁹ msPAF_{Me}(antropogeen) kan gedefinieerd worden als $[\text{msPAF}_{\text{Me}} - \text{msPAF}_{\text{Me}}(\text{bg})] / [1 - \text{msPAF}_{\text{Me}}(\text{bg})]$

De $msPAF_{Me}$ van de natuurlijke achtergrond van metalen in Rijnwater bedraagt circa 9 % en wordt voor 75 % bepaald door de achtergrondgehalten van Ni en Cu. Bij gebrek aan data wordt $msPAF_{Me}(bg)$ van de Rijn als referentie gebruikt voor watermonsters van de stroomgebieden de Maas en de Schelde.



Figuur 4. $msPAF$ metalen in de Maas en de Rijn. De achtergrond werd berekend op basis van achtergrondgehalten van de Rijn met 50 % onzekerheid.

De toxische druk van 16 metalen, in Tabel 4 uitgedrukt als $msPAF_{Me}$, bleek te variëren tussen 10 % (vrijwel gelijk aan de achtergrond van de Rijn) en 60 %. Voor alle monsters geldt dat zink, nikkel en koper een grote bijdrage te leveren aan $msPAF$ (zie uitgebreide tabel in Struijs *et al.*, 2000). De vijver in Noordwijk wordt gekenmerkt door een lage toxische druk, evenals de vijver in Oud Beijerland. Het riviertje de Aa daarentegen toont een hoge waarde van toxische druk, toegeschreven aan met name zink, koper en nikkel, hoewel ook van de overige metalen relatief hoge concentraties werden gemeten.

De waterkwaliteitsdoelstellingen voor zink, koper, kwik en cadmium werden in de 70-er jaren in de Rijn met meer dan een factor 10 overschreden. Figuur 4 laat zien hoe sindsdien een zodanige verbetering is opgetreden dat vrijwel het niveau van de natuurlijke achtergrond van de Rijn bereikt is. De berekeningen voor 1973, 1980 en 1990 zijn gebaseerd op concentraties van koper, zink, cadmium, kwik en lood uit CCRX rapporten¹⁰. Het (kleine) verschil wordt vrijwel geheel bepaald door (de essentiële elementen) zink en koper. Omdat er

¹⁰ Uit Annual reports of the Coordinating Committee for Monitoring of Radioactivity and Xenobiotic Substances.

geen onderzoek werd verricht naar de natuurlijke achtergrond van de Maas, is het niet duidelijk of de afname van msPAF metalen sinds 1990 stagneert of dat de natuurlijke achtergrond benaderd wordt.

4.3.2 Resultaten bij nadere beschouwing van de beschikbaarheid

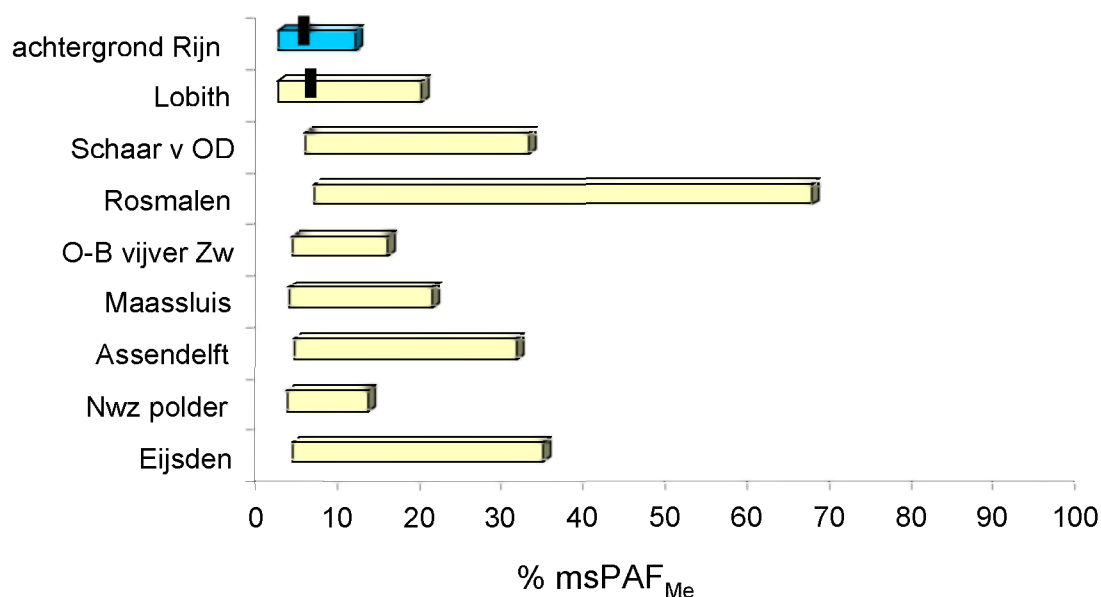
De toxische stress van de 16 metalen in Tabel 4, uitgedrukt als msPAF metalen, is waarschijnlijk een overschatting. De opgeloste concentratie, zoals hierboven operationeel gedefinieerd, is in de berekening van msPAF metalen als 100 % beschikbaar verondersteld. Deze waarden hebben echter betrekking op de opgeloste concentratie na filtratie over een filter van 0,45 m en aanzuren tot pH = 1. Onder voor zoet oppervlaktewater gangbare omstandigheden is slechts een bepaalde fractie hiervan te vergelijken met de “nominale concentratie” die als parameter in standaard aquatische toxiciteitstesten gehanteerd wordt. Organische en anorganische componenten in oppervlaktewater kunnen de biobeschikbaarheid aanzienlijk reduceren. De waarden voor msPAF_{Me} in Tabel 4 zijn dus een “worst case”: de modellering van toxische druk komt ongetwijfeld lager uit indien we voor de 16 metalen een correctie zouden maken voor de biobeschikbare fractie in oppervlaktewater. Eerder werd aangetoond dat zonder correctie voor biobeschikbaarheid, de msPAF_{Me} van 16 metalen in Nederlandse wateren (aangenomen dat deze 8 locaties representatief zijn) geheel gedomineerd wordt door de gehalten aan Zn, Cu en Ni. Op grond van deze beperkte set van monsterlocaties kan de voorlopige conclusie getrokken worden dat, voor de Nederlandse situatie, de beoogde correctie voor de biologische beschikbaarheid slechts zinvol is voor deze 3 metalen.

Een poging om de biologisch beschikbare fractie in water voor zink, koper en nikkel in de berekening van msPAF_{Me} te verdisconteren werd door Struijs en De Groot (2001) ondernomen. Algemeen wordt aangenomen dat de effecten in standaard aquatische toxiciteitstesten teweeg gebracht worden door de vrije metaalionen. Voor metalen in water wordt daarom de “biologische beschikbare fractie” gedefinieerd als de fractie van het vrije metaal ion ten opzichte van de operationeel gedefinieerde gemeten concentratie (= totaal opgeloste concentratie na filtratie over 0,45 m en aanzuren tot pH = 1).

De biologisch beschikbare fractie van zink, koper en nikkel, zowel gemeten in een watermonster als toegediend aan een aquatische toxiciteitstoets werd met een metaalspeciatioprogramma¹¹ geschat. Om die reden werden naast multi-element analyse tevens pH, DOC, fosfaat, nitraat, sulfaat, ammonium, chloride en de elektrische geleidbaarheid in deze watermonsters gemeten. Een gevoeligheidsanalyse met WINHumicV wees uit dat van de gemeten systeemparameters uitsluitend DOC en pH van belang zijn voor de fractie van het vrije metaalion van Zn, Cu en Ni. Vervolgens werd msPAF_{Me} in de watermonsters berekend op basis van voor biobeschikbaarheid gecorrigeerde waarden van zink, koper en nikkel. De metalen Zn, Cu en Ni blijken onder deze condities niet of slechts zeer beperkt biologisch beschikbaar. In tegenstelling tot de aldus gedefinieerde

¹¹ Gustafsson, J.P. (1999). WINHumicV is te downloaden van: <http://amov.ce.kth.se/people/gustafjp/gustafjp.htm>

biobeschikbaarheid in aquatische toxiciteitstoetsen, waarvoor de metaalspeciatieberekeningen voorspellen dat de nominale concentratie voor de testorganismen geheel beschikbaar is.



Figuur 5. Onder- en bovengrenzen van $msPAF_{Me}$.

Het verdisconteren van verwaarloosbare biobeschikbaarheid van Cu, Zn en Ni geeft een aanzienlijke lager waarde van $msPAF_{Me}$, zowel bij de natuurlijke achtergrond als in de watermonsters. Bij de heersende pH zijn humus- en fulvineverbindingen, aangenomen dat het gemeten DOC hoofdzakelijk uit deze componenten bestaat, bepalend voor de lage biobeschikbaarheid van Cu, Zn en Ni. In het staafdiagram (Figuur 5) wordt dit weergegeven als de linkerzijde van de liggende balken. In dit diagram wordt $msPAF_{Me}$ dus weergegeven als een interval, aan de lage kant begrensd door $msPAF_{Me}$ berekend op basis van volledige onbeschikbaarheid van Cu, Zn en Ni en aan de hoge kant door $msPAF_{Me}$ berekend uitgaande van volledige beschikbaarheid van alle metalen.

Verdere analyse met het rekenprogramma voor metaalspeciatie bracht aan het licht dat de gemeten systeemparameters ontoereikend zijn om rekening te kunnen houden met een verminderde bezettingsgraad van de opgeloste humusverbindingen voor de drie metalen. Calcium en magnesium ionen binden ook met humus- en fulvinezuren. Competitie met zink en nikkelionen kan de concentratie van het vrije ion van deze metalen vergroten. Bij gelijkblijvende waarden van pH en DOC neemt de beschikbaarheid (gedefinieerd als niet geassocieerd met humus) van zink en nikkel toe van 0 % tot 25 %, respectievelijk 75 % wanneer rekening gehouden was met reële waarden voor $[Ca^{2+}]$ en $[Mg^{2+}]$. Koper is volledig onbeschikbaar bij gangbare concentraties van Ca^{2+} en Mg^{2+} . In het staafdiagram (Figuur 5) wordt met verticale balkjes aangegeven welke waarde $msPAF_{Me}$ in de Rijn zou aannemen bij mediane concentraties van Ca^{2+} en Mg^{2+} die door het RIWA in dezelfde maand in de Rijn werden gemeten.

5. Toepassing in een RIZA onderzoek

In samenwerking met het RIZA en enkele universiteiten werd in 1998 een gezamenlijk onderzoek verricht naar de toxische effecten van de onbekende cocktail aan organische chemicaliën in water en sediment. Op een vijftal locaties (Figuur 6) werden watermonsters door het RIZA verzameld en door het RIVM volgens de pT techniek geconcentreerd. Het RIZA, RIVM en de UvA onderzochten de geconcentreerde watermonsters met 7 verschillende *in vivo*-bioassays. De resultaten worden als SSD parameters en (locatie en breedte van de distributie van log-getransformeerde chronische NEC^f waarden) en als msPAF(gemeten) in Tabel 5 weergegeven.

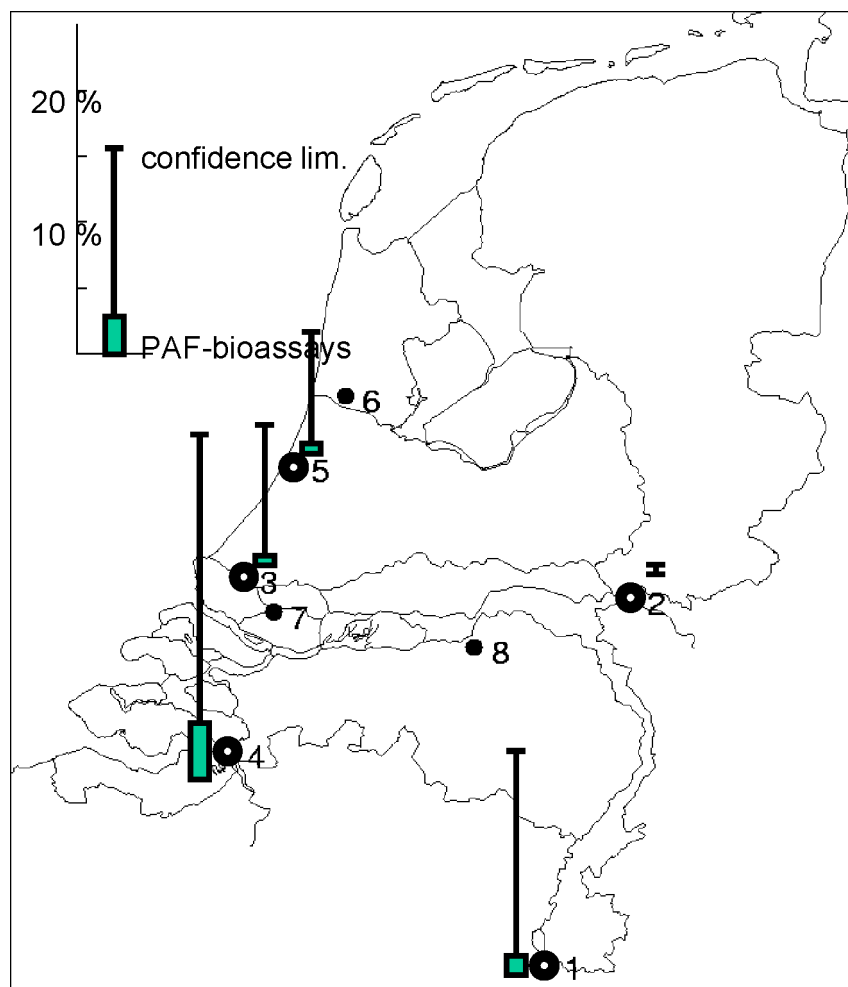
Tabel 5. SSD parameters afgeleid uit testen met concentraten van organische stoffen, mediane waarden voor PAF-bioassays met 90 % betrouwbaarheidsintervallen

watermonster	α	β	msPAF (gemeten) (%)	CL 5-95 (%)
blanco	1.528	0.057	0.0	0 - 0.00
Maas (Eijsden)	0.682	0.170	1.8	0 - 16.7
Rijn (Lobith)	0.852	0.098	0.0	0 - 0.8
Nieuwe Waterweg (Maassluis)	0.866	0.176	0.7	0 - 10.4
Schelde (Schaar v Oude Doel)	0.749	0.243	4.4	0.4 -25.6
Vijver (Noordwijk)	0.854	0.166	0.6	0 - 9.1

De toxische druk door organische microverontreinigingen in de Rijn bij Lobith benadert die van mineraalwater. Deze waarneming is goed in overeenstemming is met de bevindingen in het sinds 1996 lopende monitoring programma Kartering Ecotoxicologische Effecten Stoffen. Dit kan als een bevestiging worden opgevat van waarnemingen van de terugkeer van soorten¹² naar de rivier de Rijn (Greve *et al.*, 1999). Dit is een aanwijzing dat toxische druk voor verdwenen soorten in dit stroomgebied blijkbaar geen belemmering meer is. Een vijver in Noordwijk was gekozen als een voorbeeld van een locatie die niet belast wordt door toxische stoffen. Tabel 5 suggereert dat water van de Rijn bij Lobith de rol van “schone veld referentie” even goed zou kunnen vervullen, hoewel de uitgevoerde bio-assays uitsluitend gebaseerd waren op acute toxiciteitsmetingen en eventuele hormonale effecten zich aan de waarnemingen hebben onttrokken.

De resultaten bevestigen de trend van het monitoring programma Kartering Ecotoxicologische Effecten Stoffen: de toxische druk neemt af volgens Schelde > Maas > Rijn. Het afvalwater (zowel huishoudelijk als industrieel) in het stroomgebied van de Rijn werd in die periode voor meer dan 90 % gezuiverd, in tegenstelling tot België waar het zuiveringspercentage op slechts 40 % ligt.

¹² De eendagsvlieg (*Ephoron Virgo*), deel uitmakend van de testbatterij, is een typische riviersoort die in de 20e eeuw in de Rijn en de Maas is verdwenen en onlangs terugkeerde in het Rijnstroomgebied.



Figuur 6. Lokaties voor PAF bioassays en msPAF metalen: 1) Maas (Eijsden), 2) Rijn (Lobith), 3) Nieuwe Waterweg (Maassluis), 4) Schelde (Schaar van Ouden Doel) en 5) vijver (Noordwijk). Uitsluitend msPAF metalen: 6) Nauwernasche Braak (Assendelft), 7) vijver (Oud Beijerland) en 8) Aa (Rosmalen).

6. Conclusies

6.1 msPAF(gemeten)

- De pT methode is geschikt voor het schatten van de toxische druk in een watermonster met een complex mengsel van onbekende organische stoffen. Andere milieustressoren beïnvloeden de bepaling niet.
- De optimalisatie van de concentratie techniek heeft geresulteerd in verhoging van de efficiëntie van de concentratietechniek van 17 % naar 60 %. Bovendien werd een achtvoudige afname van materiaalkosten gerealiseerd en is de procedure minder arbeidsintensief geworden.
- Verschillende categoriën stoffen, zoals toxische verbindingen afkomstig van industriële en huishoudelijk toepassingen en bestrijdingsmiddelen worden met pT gemeten. De efficiëntie van de concentratietechniek is voldoende (circa 60 %) voor monitoring.
- In de testbatterij bestaande uit Microtox, Thamnotox F, *Daphnia* IQ en PAM (algen) neemt de Microtox wat betreft gevoeligheid een middenpositie.
- De pT methode getest op testmengsels van narcotiserende stoffen, bestrijdingsmiddelen en surfactanten geeft vergelijkbare uitkomsten als verkregen worden bij statistische gevoeligheidsmodellering in combinatie met rekenregels voor het optellen van toxische stoffen.
- De methode is ongeschikt voor organotinverbindingen en waarschijnlijk ook voor andere organometaal verbindingen. De pT methode “ziet” de categorie metalen niet.

6.2 msPAF_{Me}

- De procedure voor het karakteriseren van de toxische stress in een watermonster door metalen is een noodzakelijke aanvulling op pT. De concentratietechniek van pT is niet geschikt voor metalen waardoor toxiciteit van metalen zich aan de waarneming onttrekt.
- De procedure voor msPAF metalen omvat 16 verschillende metalen, maar wordt gekenmerkt door eenvoud van bemonstering (kleine volumina) en simpele logistiek van chemische analyse.
- In watermonsters die op acht locaties verspreid over Nederland werden verzameld en die een scala van watertypen vertegenwoordigen van het Nederlands oppervlaktewater, wordt de toxiciteit indien volledige biologische beschikbaarheid van de 16 metalen wordt verondersteld, grotendeels bepaald door zink, nikkel en koper.
- Onder- en bovengrens van msPAF metalen kan worden benaderd door de biobeschikbare fracties van koper, zink en nikkel in water op 0 %, respectievelijk 100 % te stellen.
- Bij de gemeten pH en DOC waarden in de acht watermonsters is de biologische beschikbaarheid van koper vrijwel 0 %.

- Dat is niet het geval voor zink en nikkel. Het verdient daarom aanbeveling om behalve DOC en pH ook de concentraties van calcium- en magnesiumionen in het watermonster te bepalen. Hiermee kan voor deze metalen een nauwkeuriger schatting gemaakt worden van de biologisch beschikbare fractie.

6.3 Algehele conclusie

- Het project heeft een methode voortgebracht die geschikt is voor monitoring van toxische druk in oppervlaktewater.
- Omdat uit de experimenten met drie verschillende testmengsels is gebleken dat de concentratietechniek goed reproduceerbaar is, kan de op toxkits (*in vivo*-bioassays) gebaseerde msPAF(gemeten) als research-tool ingezet worden ter verificatie van het msPAF concept voor blootstelling aan complexe mengsels.
- Toxische druk door organische microverontreinigingen (pT) is niet hoog (< 5 %) maar vertoont grote variatie tussen lokaties in Nederlandse oppervlaktewateren. In hoeverre deze maatlat voor toxische druk samenhangt met soortenverlies dient nader onderzocht te worden.
- Anthropogene toxische druk door metalen vertoont in sommige wateren hoge waarden, die aanzienlijk verlaagd worden indien rekening gehouden wordt met de beperkte biobeschikbaarheid van de metalen nikkel, koper en zink. Validatie van deze modificatie van de methode waarbij gecorrigeerd wordt voor de biologisch beschikbare fractie, heeft nog niet plaats gevonden.
- Toepassing van deze methode voor de bepaling van toxische stress in oppervlaktewater volgens de beide methodieken, maakt duidelijk dat de waterkwaliteit van de verschillende watersystemen in Nederland aanzienlijk kan verschillen.
- De toxische stress in de Rijn bij Lobith, met pT en msPAF_{Me} bepaald, is thans laag.

Literatuur

- Bakker, J. en D. van de Meent (1997). Receptuur voor de berekening van de Indicator Effecten Toxische stoffen (I_{tox}). RIVM rapport nr. 607504 003. Bilthoven, the Netherlands
- Berg van de. G.A. and J.J.G. Zwolsman (2000). Nieuwe methode voor inschatting van achtergrondconcentraties aan zware metalen in oppervlaktewater. Werkdocument 99.200X DGRW/RIZA.
- Collombon, M., R. Van de Kamp and J. Struijs, 1997. Procedure for extracting organic micro-pollutants from water samples to monitor toxicological stress. RIVM-Report nr. 607042 008. Bilthoven, the Netherlands.
- De Zwart, D. en A. Folkerts (1991). Monitoring the toxicity of organic compounds dissolved in Rhine water. *Hydrobiol. Bull.* 24, 5-12.
- De Zwart, D., C.J. Roghair and J. Struijs, 1996. De pT-methode voor het bepalen van milieutoxiciteit. Noodzaak en ontwikkelingsstatus. RIVM report no. 607042 007. Bilthoven, the Netherlands.
- De Zwart, D (2002). Observed regularities in SSDs for aquatic species. In: Posthuma, L., Traas, T.P. and Suter, G.W. (eds.) (2002). *The Use of Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*.
- De Zwart, D and A. Sterkenburg (2002). Toxicity-Based Assessment of Water Quality. In: Posthuma, L., Traas, T.P. and Suter, G.W. (eds.) (2002). *The Use of Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*.
- De Zwart, D. and W. Slooff (1983). The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquatic Toxicology*, 4, 129-138.
- Feijtel, T.C.J. and E.J. van de Plassche (1995). Environmental Risk Characterization of 4 major Surfactants Used in The Netherlands. RIVM-Report nr. 679101 025. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. The Netherlands.
- Greve, G.D., H.G. van der Geest, S.C. Stuijzand, A. Kureck and M.H.S. Kraak (1999). Development and validation of an ecotoxicity test using field collected eggs of the riverine mayfly *Ephoron virgo*. *Proc. Exper. & Appl. Entomol.* 10: 105-110.
- Hamers, T, T. Aldenberg & D. van de Meent (1996). Definition Report - Indicator Effects Toxic Substances (tox). RIVM report no. 607128 001. Bilthoven, the Netherlands.
- Hendriks, A.J., Maas-Diepeveen, J.L., Noordsij, A. Van der Gaag, M.A. (1994). Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: a major part of the toxic compounds remains unidentified. *Wat. Res.* 28. No 3. 581-598.
- Plassche, van de E.J., M. van de Hoop, R. Posthumus, R. and T. Crommentuijn (1999). Risk limits for boron, Silver, titanium, tellurium, uranium and organosilicon compounds in the framework of EU Directive 76/464/EEC. RIVM-Report nr. 601501 005. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. the Netherlands.
- Plassche, van de E.J., A. Straetmans, J. Hendriks, D. Vethaak en J.L. Maas. (2003). Normstelling voor bioassays; uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodems (RIZA/RIKZ).

- Posthuma, L., Traas, T.P. and Suter, G.W. (eds.) (2002). The Use of Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology.
- Roghair, C.J., Struijs J. and De Zwart D. (1997). Measurement of toxic potency in fresh waters in the Netherlands; Part A: Methods. RIVM-Report nr. 607504 004. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. the Netherlands.
- Slooff, W. en D. de Zwart (1991). De pT-waarde als milieubeleidsindicator voor de verspreiding van toxische stoffen. RIVM rapport nr. 719102 001. Bilthoven, the Netherlands.
- Slooff, W. and D. de Zwart (1983). Bio-indicators and chemical pollution of surface waters. Environm. Monit. Assessm., 3, 237-245.
- Slooff, W., D. de Zwart and J.F.J. van de Kerckhoff (1983). Monitoring the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands for toxicity. Aquatic Toxicology, 4, 189-198.
- Slooff, W., C.F. van Kreijl en D. de Zwart (1984). Biologische parameters en oppervlaktewater(meetnetten), H₂O, 1, 2-5.
- Slooff, W., C.J. van Leeuwen en E. van Donk (1985). Use of biomonitoring in water quality regulatory decisions. Proceedings of the International workshop on biological testing of effluents (and related receiving waters). OECD-USEPA, 61-96.
- SOP ECO/076/00 (1993). Voorschrift voor het gebruik van XAD-hars bij de extractie van organische verontreinigingen uit oppervlaktewater.
- SOP ECO/303/00 (1996) Voorschrift voor het concentreren van organische microverontreinigingen uit water met behulp van XAD-harsen.
- SOP ECO/310/00 (1997) Opwerking van een acetonconcentraat tot een watermonster voor aquatische toxiciteitstoetsen.
- RIWA (1998). Jaarverslag 1998, deel A, De Rijn, p 101.
- Struijs, J en L. van Buren (1995). Milieutoxiciteit (pT) van water (I): het opwerken tot waterconcentraten. RIVM report no. 607042 006. Bilthoven, the Netherlands.
- Struijs, J., Van de Kamp, R. and Hogendoorn, E.A. (1998). Isolating organic micropollutants from water samples by means of XAD resins and supercritical fluid extraction. RIVM-Report nr. 607602 001. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. The Netherlands.
- Struijs, J., Ritsema R., Van de Kamp, R. en De Zwart, D. (2000). Toxic pressure in surface water. A pilot of new monitoring techniques. RIVM-Report nr. 607200 003. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. The Netherlands.
- Struijs, J and R. Van de Kamp (2001). A revised procedure to concentrate organic micropollutants in water. RIVM-Report nr. 607501 001/2001. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. The Netherlands.
- Vaal, M.A. and A.J. Folkerts, 1998. Sensitivity of microscale ecotoxicity tests and their suitability to measure toxicity of environmental samples. RIVM report no 607042 009. Bilthoven, the Netherlands.
- Vaal, M.A., A.J. Folkerts, R. Van de Kamp and J. Struijs (1999). Toxicological validation of a procedure for extracting organic micropollutants from water samples. RIVM-Report nr. 607200 002. Nat. Inst. Publ. Health & Environment. The Netherlands.
- Vaal, M.A. en J. Struijs (2002), BRIEFRAPPORT PROJECT "Toxische druk organische microverontreinigingen" PROJECTNUMMER S/607200/01/SJ

- Van Beusekom, S.A.M., Admiraal, W., Sterkenburg, A. and De Zwart, D. (1999), ECO notitie 98/09 HANDLEIDING PAM-TEST.
- Verweij, W., Glazewski, R. and De Haan, H. (1992). Speciation of copper in relation to its bioavailability. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 4(2).
- Willemsen, A., M.A. Vaal and D. de Zwart. 1995. Microbiotests as tools for environmental monitoring. RIVM report no. 607042 005. Bilthoven, the Netherlands.
- Wintersen, A., R. Roelofs, L. Posthuma en D. de Zwart. 2002. Realisation of the RIVM EcoTox Database. ECO-notitie nr 2002/04. RIVM/KUN.

Bijlage 1 Verzendlijst

- 1 Directie RIVM, Prof. ir. N.D. van Egmond
- 2 Ir. M.R.de Potter (KEMA, Arnhem)
- 3 Dr. G. Schoeters (VITO, België)
- 4 Dr. A.J.Murk (LUW, Wageningen)
- 5 Dr. W.M.G.M. van Loon (RIKZ, Haren)
- 6 Dr. P.E.G. Leonards (RIVO, IJmuiden)
- 7 Drs. J.L. Maas (RIZA, Lelystad)
- 8 Dr.Ir. A.J. Hendriks (RIZA, Lelystad)
- 9 Drs. H. Klamer (RIKZ, Haren)
- 10 Dr. J.L.M. Hermens (IRAS UU, Utrecht)
- 11 Ir. M.A. Vaal (Wetenschapswinkel Biologie UU, Utrecht)
- 12 Ir. C.J. Roghair (DLG Centrale Eenheid, Utrecht)
- 13 R.. van de Kamp (Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Houten)
- 14 Ms.Sc.Ing. M.Collombon (TNO/MEP, Den Helder)
- 15 Ing. A.J. Folkerts (Marble, Renkum)
- 16 Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
- 17 Sectordirecteur Milieu, Ir. F. Langeweg
- 18 Sectordirecteur Milieurisico's en Externe Veiligheid, Dr. Ir. R.D. Woittiez
- 19 Hoofd Stoffen Expertise Centrum, Dr. W.H. Könemann
- 20 Dr. W. Slooff (RIVM/SEC)
- 21 Hoofd Bureau Milieu- en Natuurverkenning, Drs. R.J.M. Maas
- 22 Dr. W.H.J. Verweij (MNP/LDL)
- 23 Hoofd Laboratorium voor Ecologische Risicobeoordeling, Drs. J.H. Canton
- 24 Dr.Ir. D. van de Meent (RIVM/LER)
- 25 Dr. A. Sterkenburg (RIVM/LER)
- 26 Dr. Ir. W. Peijnenburg (RIVM/LER)
- 27 Drs. D. de Zwart (RIVM/LER)
- 28 Dr. A. B. Breure (RIVM/LER)
- 29 Ing. A.C. De Groot (RIVM/LER)
- 30-32 Auteurs
- 33 SBC/Communicatie
- 34 Bureau Rapportenregistratie
- 35 Bibliotheek RIVM
- 36 Depot LER
- 37 - 39 Archief LER/RiB
- 40 - 42 Bureau rapportenbeheer
- 43 - 53 Reserve-exemplaren t.b.v. het Laboratorium voor Ecologische Risicobeoordeling