

7478

EVALUATIE VAN AMMONIUM TOXICITEIT IN VERONTREINIGDE WATERBODEMS VAN DE BOVENSCHELDE: ontwikkeling en toepassing van Toxiciteits-Identificatie Evaluatie procedures

P.A. VAN SPRANG, C.R. JANSSEN en G. PERSOONE
Universiteit Gent,
Laboratorium voor Biologisch Onderzoek van Waterverontreiniging
F. BENIJTS
ECCA n.v.

ASSESSMENT OF AMMONIA TOXICITY IN CONTAMINATED SEDIMENTS OF THE UPPER SCHELDT (BELGIUM): THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF TOXICITY IDENTIFICATION EVALUATION PROCEDURES.

The toxicity of sediment pore waters from 4 sites in the Upper Scheldt was characterized using modified Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures and the microbioassay *Thamnotoxkit FTM*. The samples from all locations exhibited acute toxicity to the freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* ranging from 3.3 to 12.8 toxic units. This TIE approach was conducted using an

enlarged battery of selective fractionation tests. Toxicity was removed or reduced significantly by the cation exchange resins and the air-stripping test at pH 11. Additionally, increased toxicity was observed at higher pH while a reduced toxicity was found at a decreased pH. From these TIE studies, ammonia was identified as the dominant toxic agent for all 4 locations.

1 INLEIDING

Grote hoeveelheden verontreinigde waterbodems afkomstig uit rivieren of havens worden jaarlijks gebaggerd. De evaluatie van de potentiële impact van dergelijke baggeractiviteiten op aquatische ecosystemen impliceert onder andere de identificatie van de componenten verantwoordelijk voor de waargenomen toxiciteit wat kan bijdragen in het beslissingsproces voor de selectie van de meest geschikte saneringstechniek (Ankley *et al.*, 1990). Voor de detectie en identificatie van chemicaliën verantwoordelijk voor de vastgestelde toxiciteit heeft de "US Environmental Protection Agency" specifieke technieken, die selectieve fractioneringen combineert met ecotoxicologische testen, ontwikkeld (Norberg-King *et al.*, 1991; Durham *et al.*, 1993; Mount, 1989). De bruikbaarheid van deze Toxiciteits-Identificatie Evaluatie (TIE) benadering werd uitvoerig bestudeerd op effluënten met conventionele bioassays (Schubauer-Berigan & Ankley, 1991; Ankley & Burkhard, 1992; Schubauer-Berigan *et al.*, 1993; Burkhard & Jenson, 1993). Deze studie beoogde de ontwikkeling en toepassing van een aangepaste TIE methodologie met een hoog discriminerend vermogen, gebaseerd op de conventionele benadering, voor de detectie en identificatie van specifieke toxicanten in poriënwater.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Algemeen

De toegepaste methodologie voor de identi-

ficatie van de toxiciteit in poriënwaters wordt schematisch weergegeven in Figuur 1.

2.2 Staalname en extractie

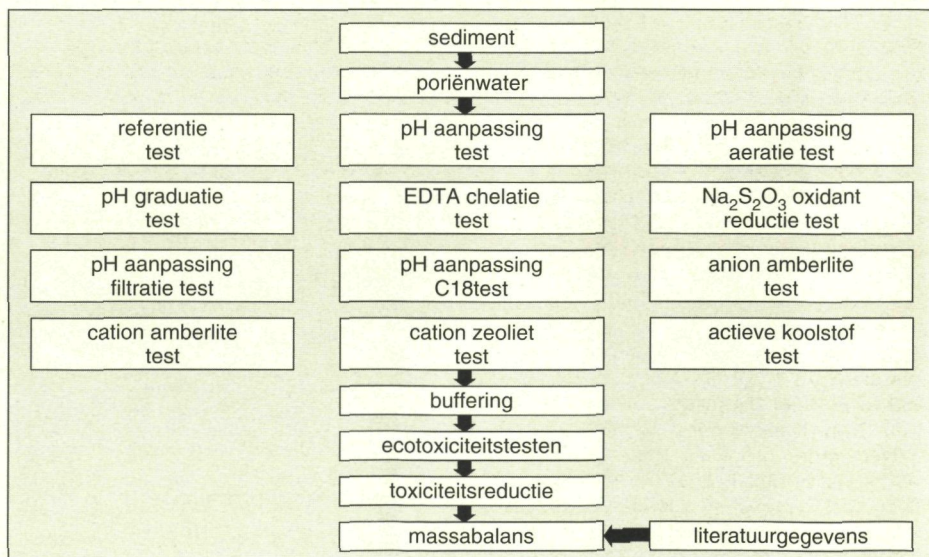
Sedimentstalen afkomstig van 4 lokaties in de Bovenschelde (Bo I, Bo II, Bo III en Bo IV), stroomopwaarts van Gent, werden ge-collecteerd met een Van Veen grijper. De stalen werden getransporteerd in polyethyleen emmers en werden in het laboratorium bewaard bij 4°C in het donker. Het poriënwater, dat als representatieve fractie voor de toxiciteit van waterbodems wordt be-

schouwd, werd geëxtraheerd met behulp van filterperseenheden (Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap, 1995).

2.3 Fractioneringstechnieken

De in deze studie gebruikte technieken zijn gebaseerd op de toxicant karakterisatie procedures beschreven door Norberg-King *et al.* (1991). Informatie omtrent de fysico-chemische eigenschappen van de toxicanten wordt bekomen door de toxiciteit van het staal na iedere individuele fractionering te vergelijken met die van het onbehandelde

Figuur 1: schematische weergave van de TIE methodologie



staal. Volgende fractioneringstesten werden toegepast: de referentie test, de pH aanpassingstest (pH3 aan en pH11 aan), de pH aanpassing/aeriatietest (pH3 aer, pH_i aer en pH11 aer), de pH graduatietest (pH7 en pH8.5), de EDTA chelatietest (edta), de Na₂S₂O₃ oxidant reductie test (thio), de pH aanpassing/filtratie test (pH3 fil, pH_i fil en pH11 fil) en de pH aanpassing/C18 test (pH3 C18, pH_i C18 en pH9 C18). De gebruikte eindconcentratie aan EDTA en Na₂S₂O₃ in de verschillende verdunningsreeksen is gebaseerd op de 24h LC₁₀ en bedroeg 0.1 g/l voor beide chemicaliën (ongepubliceerde data). In de pH aanpassing/C18 test werden kolommen met 1 g sorbens gebruikt. Aan deze klassieke batterij testen werden een aantal supplementaire behandelingen toegevoegd: de synthetische anion (amberlite IRA-440C, Sigma) en cation (amberlite IR-120Plus, Sigma) wisselaar, de natuurlijke cation wisselaar (zeoliet, Aldrich) en de actieve koolstof (Sigma), afgekort tot respectievelijk hars-, hars+, koolstof en zeoliet. Voor deze studie werden glazen chromatografie kolommen met volgende afmetingen gebruikt: 1.5x25 cm voor de synthetische hars testen (gevuld met 10 g hars) en 2.5x25 cm voor de filtratie, de zeoliet en de actieve koolstof testen (gevuld met 10 g zeoliet en actieve koolstof). Spoelwater, blanco's en de stalen werden over de kolommen geëluëerd met een debiet van ± 12 ml/min, gebruik makend van een peristaltische pomp (Watson-Marlow, type 302F). Gedeïoniseerd water (150 ml) bij de aangepaste pH (pH 3, pH_i, pH 9 of pH 11) en 20 ml HPLC zuiver methanol voor de pH aanpassing/C18 test werden gebruikt voor het spoelen van de kolommen. Hierna werden de 25 ml pH aangepaste (pH 3, pH_i, pH 9 of pH 11) blanco's over dezelfde kolommen gepompt. Elke fractionering vereiste 25 ml staal voor de uitvoering van de scheikundige analyses en het opzetten van de toxiciteitstesten. Na de fractioneringen werden de stalen en blanco's gebufferd (zie 2.3) en werd de pH opnieuw teruggebracht tot de initiële pH (= pH_i). Aanpassing en heraanpassing van de zuurtegraad werd bewerkstelligd door de toediening van pro analyse HCl en NaOH van verschillende normaliteit (0.1, 1.0 en 2.0 N).

2.4 Ecotoxiciteitstesten

De microbiotest Thamnotoxkit FTM met de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus* werd gebruikt voor de uitvoering van alle ecotoxiciteitstesten. Het kieuwpootkreeftje *T. platyurus* is een klein organisme (1 à 2 mm in lengte) dat in plassen en poelen voorkomt en heeft de eigenschap in ongunstige omstandigheden winter- of rusteieren te produceren. De testprocedure wordt uitvoerig beschreven door Centeno (1994) en is hieronder samengevat. Voor de aanvang van de bio-toetsen werden deze rusteieren gedurende 24 h geïncubeerd in 1/8 verdund EPA water (Horning & Weber, 1985) bij 25°C en continue belichting (2000 Lux). Na 18h werden de ontloken larven van het eerste vervellingsstadium getransfereerd naar vers EPA medium. De larven van het tweede vervellingsstadium, gebruikt in deze bio-toetsen, werden bekomen na 4 tot 6 h

incubatie. De toxiciteitstesten werden uitgevoerd in 1 ml testvolume met 3 herhalingen per concentratie (100-50-25-12.5-6.25%) en 10 organismen per testvaatje. De testplaten werden geïncubeerd bij 25°C voor 24 h in duisternis. Na deze incubatieperiode werd de mortaliteit genoteerd. Ieder toxiciteitstest vereiste een totaal volume van 10 ml staal. Voor de blanco's en het verdunningswater werd EPA medium, gesupplementeerd met de waterstof-ion buffer MOPS (3-{N-Morfolino}propaan-sulfonzuur, Sigma), gebruikt voor de stabilisatie van de pH tijdens de toxiciteitstesten. De MOPS buffer werd aan alle verdunningsreeksen toegediend aan een eindconcentratie van 5 g/l. Na buffer additie werd de pH van alle stalen, blanco's en verdunningswater, uitgezonderd voor de pH graduatie test, opnieuw op de initiële pH (= pH_i) gebracht. De toxiciteit van het onderzochte staal werd niet beïnvloed door toevoeging van de buffer (Norberg-King *et al.*, 1991).

2.5 Chemische analyses

Bepaling van de metalen concentraties (Zn, Cr, Cu, Ni, Cd en Pb) werd uitgevoerd met de ICP-MS techniek. Ammonium concentraties werden spectrofotometrisch bepaald met de Nessler methode (Hach, DR-2000).

2.6 Data verwerking

De ecotoxiciteitstesten werden als geldig beschouwd wanneer de mortaliteit in de controle de 10% niet overschreed. De effect concentraties (24h LC₅₀) werden berekend door de probit methode (Finney, 1971). Deze data werden vervolgens getransformeerd tot Effect Eenheden (E.E.) gebruik makend van volgende formule:

$$E.E. = 100\% / 24h LC_{50} (\%)$$

De toxiciteit van de stalen werd gekarakteriseerd door de toxiciteit na iedere fractionering (E.E._{fractionering,i}) te vergelijken met de initiële toxiciteit van de referentietest (E.E._{referentie}). Aldus kon de relatieve toxiciteitsreductie tengevolge van de toepassing van de fractionering i (%T.R._i) als volgt berekend worden:

$$\%T.R._i = (1 - E.E._{fractionering,i} / E.E._{referentie}) * 100$$

Tabel 1.: Resultaten van de chemische analyse en acute toxiciteit van de 4 poriënwaters van de Bovenschedde.

Parameter	Staal			
	Bo I	Bo II	Bo III	Bo IV
pH	8.5	8.4	7.8	8.2
NH ₄ ⁺ (mg/l)	175.7	222.0	196.2	337.1
Zn (µg/l)	150.0	41.0	35.0	93.0
Cr (µg/l)	10.0	7.5	18.0	26.0
Pb (µg/l)	20.0	7.0	19.5	8.5
Cu (µg/l)	17.5	13.0	20.0	21.0
Cd (µg/l)	1.2	0.7	0	0.9
Ni (µg/l)	30.0	19.0	20.5	38.0
Toxiciteit (E.E.)	9.7	12.8	3.3	7.8

Positieve waarden wijzen op een verlaging in toxiciteit, negatieve waarden op een verhoging in toxiciteit in vergelijking met de initiële toxiciteit.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De chemische samenstelling en de waargenomen toxiciteit van de onderzochte poriënwaters worden in Tabel 1 samengevat. Ammoniak concentraties tussen 175.7 en 337.1 mg/l totaal NH₄⁺ werden genoteerd, terwijl de toxiciteit van de onbehandelde stalen varieerde tussen 3.3 en 12.8 E.E.

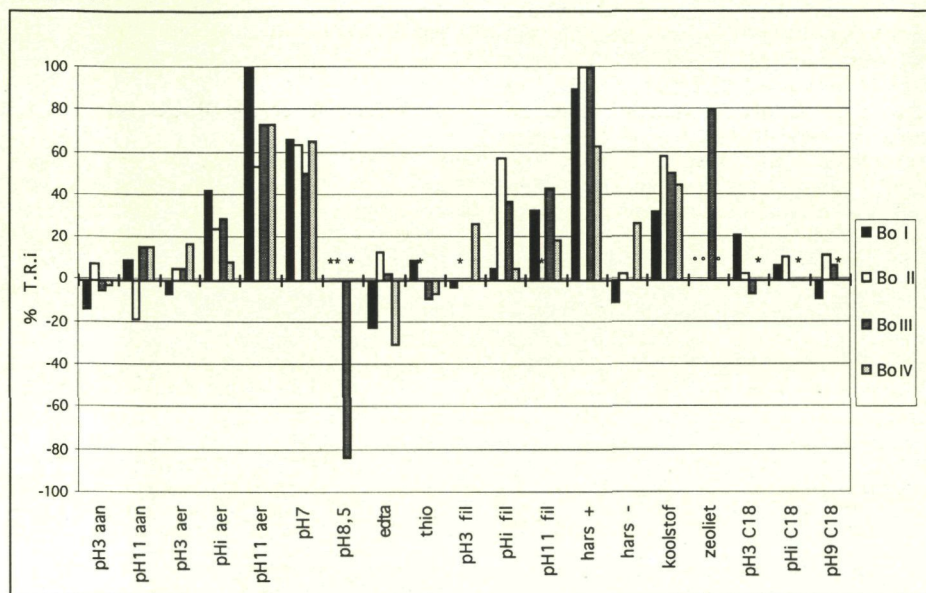
De toxiciteitskarakterisatie profielen van de onderzochte poriënwaters (Figuur 2) werden bekomen door toepassing van de fractioneringstechnieken beschreven in 2.2. Bij gebrek aan voldoende monstervolume konden niet alle geplande fractioneringstesten uitgevoerd worden. Gedurende de incubatie van de toxiciteitstesten werden pH verschuivingen, die de interpretatie van de resultaten bemoeilijken, geobserveerd.

Vergelijking van de toxiciteit van de gefractioneerde substalen met de toxiciteit van de referentie duidde op een sterk pH afhankelijke toxiciteit. Verlaging van de pH verminderde de oorspronkelijke toxiciteit met 49 tot 66%. Verhoging van de pH resulteerde in een verhoging van de toxiciteit met 79% voor staal Bo III. Omdat de initiële pH van de andere poriënwaters niet significant verschilde van pH 8.5 kon het effect van een verhoogde pH niet bestudeerd worden op de stalen Bo I, Bo II en Bo IV.

Ook bleek de waargenomen toxiciteit sterk gereduceerd te worden door beluchting van de stalen bij pH 11. Inderdaad, een toxiciteitsreductie tussen 53 en 100% werd genoteerd, wat op een pH gevoelige en vluchtige toxicant wijst. Verder werd een verlaging in toxiciteit van 63 tot 100% gevonden na eluatie van de stalen over de cationische harsen. Op basis van deze bevindingen kon een anorganische cation als toxicant gesuggereerd worden.

Bij de zeoliet test werd in 3 van de 4 blanco's een mortaliteit boven de 10% genoteerd. Deze testen konden bijgevolg niet

Figuur 2: De relatieve toxiciteitsreductie (%T.R.i) bekomen door de toepassing van de fractioneringstechnieken op de poriënwaters Bo I, Bo II, Bo III en Bo IV van de Bovenschelde (*: test niet uitgevoerd; °: test niet geldig).



als geldig beschouwd worden. De metalen analyse van de zeoliet blanco's duiden op de aanwezigheid van hoge Cu concentraties voor de stalen Bo I, Bo II en Bo IV (respectievelijk 3.5, 1.2 en 2.2 mg/l). Die Cu uitloging overschrijdt de 24h LC₅₀ van Cu (Persoone *et al.*, 1993) voor *T. platyurus* (= 0.079 mg/l) en kon aldus de waargenomen toxiciteit in de blanco's verklaren.

Andere testen met een minder éénvoudig respons zorgden eveneens voor een vermindering in toxiciteit. Bij de actieve koolstoffest werd een partiële toxiciteitsverwijdering van 32 tot 58% vastgesteld, terwijl bij de filtratietest een sterk variabele toxiciteitsvermindering van 0 tot maximaal 58% genoteerd werd.

Volgens Norberg-King *et al.* (1991) duidt een pH afhankelijke toxiciteit, een significante verlaging in toxiciteit door beluchting en door de zeoliet behandeling op ammoniak als verantwoordelijke toxisch agens. Ankley *et al.* (1990) rapporteert dat ammoniak toxiciteit verwijderd wordt door toepassing van volgende technieken: verlaging van de pH, eluatie van de stalen over cationwisselaars en beluchting bij basische pH. Vervolgens identificeerde Ankley *et al.* (1990) ammoniak als verantwoordelijke toxisch agens in de pH graduatie test waar een verlaging in toxiciteit geobserveerd werd na verlaging van de pH van de testoplossing en in de zeoliet test waar de toxiciteit volledig verdwenen was. De pH afhankelijke toxiciteit van ammoniak en de efficiënte ammoniak verwijdering door de zeolietbehandeling wordt bevestigd in de literatuur (Schubauer-Berigan & Ankley, 1991; Burkhard & Jenson, 1993; Schubauer-Berigan *et al.*, 1995). Het effect van granulair actieve koolstof op de verwijdering van ammoniak wordt aangegeven door Culp *et al.* (1978). Actieve koolstof, gewoonlijk ingeschakeld bij de tertiaire zuivering ter verwijdering van organische componenten, absorbeerde meer dan 90 % van het influent ammoniak in een piloot waterzuiveringsinstallatie.

Steunend op deze resultaten werd ammoniak gesuggereerd als verantwoordelijke toxisch agens voor alle onderzochte poriënwaters.

4 CONCLUSIE

De 4 onderzochte sedimenten lokaties Bo I, Bo II, Bo III en Bo IV in de Bovenschelde vertoonden een sterk acuut toxisch signaal voor de zoetwatercrustacee *T. platyurus*. De waargenomen 24h LC₅₀, uitgedrukt als effect eenheden, waren respectievelijk 9.7, 12.8, 3.3 en 7.8. De karakterisatie fase suggereerde ammoniak als verdachte toxisch agens. Beluchting bij pH 11, verlaging van de pH en eluatie van de stalen over cationische synthetische en natuurlijke harsen resulteerden in een significante afname of volledige verwijdering van de oorspronkelijke toxiciteit. De toepassing van de ontwikkelde technieken, gebruik makend van microbiotesten, bleken zeer efficiënt voor de karakterisatie van ammoniak toxiciteit in poriënwaters.

5 DANKWOORD

Deze studie is tot stand gekomen met de samenwerking van het Vlaams Instituut voor de bevordering van het Wetenschappelijk-Technologisch Onderzoek in de Industrie, Bischoffsheimlaan 25, 1000 Brussel.

P.A. VAN SPRANG,
C.R. JANSSEN,
G. PERSOONE
Universiteit Gent
Laboratorium voor Biologisch Onderzoek
van Waterverontreiniging
J. Plateaustraet 22
9000 Gent

F. BENIJTS
ECCA n.v.
Klaartestraet 24
9052 Zwijnaarde

6 LITERAATUURSTUDIE

ANKLEY G.T., KATKO A. & ARTHUR J.W. (1990). Identification of ammonia as an important sediment associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ.Toxicol.Chem.* Vol 9. pp. 313-322.

ANKLEY G.T. & BURKHARD L.P. (1992). Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ.Toxicol.Chem.* Vol 11. pp. 1235-1248.

BURKHARD L.P. & JENSON J.J. (1993). Identification of ammonia, chlorine and diazinon as toxicants in a municipal effluent. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* Vol 25. pp. 506-515.

CENTENO M.D.F. (1994). Development of cost-effective toxicity tests with the anostracan *Streptocephalus proboscideus* (Frauenfeld) and *Thamnocephalus platyurus* (Packard). *Doktoraatsthe-sis, Universiteit Gent*, 331p.

CULP R.L., WESNER G.M. & CULP G.L. (1978). *Handbook of advanced wastewater treatment.* Van Nostrand Reinhold Company (second edition), New York, 1978. 632 p.

DURHAN E.J., NORBERG-KING T.J. & BURKHARD L.P. (1993). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity.* EPA/600/R-92/080. U.S. Environmental Protection Agency. Duluth.

FINNEY D.J. (1971). *Probit analysis.* Third edition. Cambridge University Press. Cambridge. Great Britain., 1971. pp. 1-333.

HORNING W.B. & WEBER C.I. (1985). Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-85/014. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati. 161 p.

Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap, AMINAL en AWZ (1995). *Handboek voor de karakterisatie van de bodems van de Vlaamse waterlopen.*

MOUNT D.I. (1989). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase III toxicity confirmation procedures.* EPA/600/3-88/036. U.S. Environmental Protection Agency. Duluth.

NORBERG-KING T.J., Mount D.I., Durhan E.J., ANKLEY G.T. & BURKHARD L.P. (1991). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I toxicity characterization procedures.* EPA/600/6-91/003. U.S. Environmental Protection Agency. Duluth.

PERSOONE G., GOYVAERTS M., JANSSEN C., DE COEN W. & VANGHELuwe M. (1993). Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits. Commission of the European Communities. ACE89/BE2/D3.

SCHUBAUER-BERIGAN M.K. & ANKLEY G.T. (1991). The contribution of ammonia, metals and non-polar organic compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an Illinois river tributary. *Environ.Toxicol.Chem.* Vol 10. pp. 925-939.

SCHUBAUER-BERIGAN M.K., AMATO J.R., ANKLEY G.T., BAKER S.E., BURKHARD L.P., DIERKES J.R., JENSON J.J., LUKASEWYCZ M.T. & NORBERG-KING T.J. (1993). The behavior and identification of toxic metals in complex mixtures: examples from effluent and sediment pore water Toxicity Identification Evaluations. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* Vol 24. pp. 298-306.

SCHUBAUER-BERIGAN M.K., MONSON P.D., WEST C.W. & ANKLEY G.T. (1995). Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ.Toxicol.Chem.* Vol 14(4). pp. 713-717.