

Vergelijking van *Mysidopsis bahia* en *Corophium volutator* in een mariene toxicity identification evaluation (TIE).

Marlies Schot, Peter Schout*, Johan Jol, Wies Vonck, Kay Ho**, Gerard Spronk en Joost Stronkhorst.

28 december 1995

WERKDOCUMENT, RIKZ/OS-95.839X.

Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ).
Jacobaweg 2, 4493 MX Kamperland.
Tel: 0113-371651

* NIOO-CEMO
Vierstraat 28, 4401 EA Yerseke.

** United States- Environmental Protection Agency (U.S.- EPA)
Rhode Island, Narraganset.

Voorwoord

Sedimenten en effluënten zijn vaak verontreinigd met verschillende toxicanten. Een bio-assay geeft wel uitslag over de toxiciteit van dit sediment/ effluent maar geeft niet aan welke stof(fen) of stofgroepen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Als we de stof kunnen ontdekken die toxische effecten veroorzaakt geeft dit ook een mogelijkheid om een mogelijke vervuiler hierop aan te spreken. Een ander voordeel van het identificeren van de stof/stofgroep welke toxische effecten veroorzaakt is de mogelijkheid om het betreffende sediment of effluent doelgericht te reinigen.

Voor het identificeren van de toxische stoffen is een methode in ontwikkeling; de Toxicity Identification Evaluation (TIE). Deze methode bestaat uit drie fasen; Fase I: Toxicity Characterization, Fase II: Toxicity Identification, Fase III: Toxicity Confirmation.

In fase I van een TIE wordt getracht de stofgroep te determineren welke het toxische effect veroorzaakt. Tijdens fase I van een TIE worden de mogelijke toxicanten onderverdeeld in de volgende stofgroepen: metalen, organische stoffen, vluchtige stoffen en oxidanten.

In fase II van een TIE wordt getracht de stof(fen) te determineren welke het toxische effect veroorzaakt. De methoden gebruikt in fase II van een TIE zijn afhankelijk van de toxische stofgroep. Deze fase kan een aantal verdachte stoffen opleveren.

In fase III van een TIE wordt getracht een positieve bevestiging te krijgen van een stof of een aantal stoffen die door fase II als verdacht zijn aangewezen.

Dit rapport behandelt alleen de eerste fase van een TIE welke is uitgevoerd met de amphipoda *Corophium volutator* en de mysidacea *Mysidopsis bahia*.

In het eerste deel van dit rapport staan de voorbereidende testen die zijn uitgevoerd met *Corophium volutator* om de gevoeligheid van deze amphipode voor de verschillende chemicaliën die gebruikt worden in de eerste fase van een TIE te testen. Het tweede deel van dit rapport is een bespreking van de uitgevoerde eerste fase van een TIE met beide testorganismen.

Deel 1

Tolerantie van *Corophium volutator* voor chemicaliën gebruikt tijdens de eerste fase van een TIE.

M.E. Schot, J.G. Jol en P.G. Schout

Tolerantie van *Corophium volutator* met betrekking tot het testvolume.

M.E. Schot en P.G. Schout

Inhoudsopgave deel 1

§ 1 Inleiding	3
§ 2 Materiaal en Methoden	5
§ 2.1 Materiaal	5
§ 2.2 Methoden	5
§ 3 Resultaten	9
§ 3.1 Resultaten van tolerantie testen	9
§ 3.2 Resultaten van volume testen	11
§ 4 Conclusies en Discussie	13

§ 1 Inleiding

Als we de stofgroep die een bepaald toxische effect veroorzaakt willen determineren moeten we het poriewater of effluent manipuleren op dusdanige wijze dat bepaalde stofgroepen verwijderd worden of niet meer beschikbaar zijn voor de testorganismen. Deze manipulaties worden uitgevoerd met verschillende chemicaliën, voordat we de TIE methode uit gaan voeren is het dus belangrijk dat de tolerantie van het testorganisme voor deze chemicaliën bekend is.

De amphipode *Corophium volutator* is getest met de stoffen; Aceton, Methanol, DMSO, EDTA en Natriumthiosulfaat. Uit deze testen zijn indien mogelijk NOEC en LC₅₀-waarden berekend.

Voor het uitvoeren van de TIE is gebruik gemaakt van poriewater. Gezien de verschillende manipulaties binnen de TIE aanpak is er veel materiaal nodig, dit kan met poriewater een probleem op leveren. Het is daarom noodzakelijk om een toxiciteitstest uit te voeren met een zo klein mogelijk volume aan testmateriaal. In voorbereiding op de TIE is daarom getest hoe groot het testvolume moet zijn en hoe veel organismen er maximaal in een klein test bekertje gaan, zonder dat dit sterfte veroorzaakt bij de organismen. De controle-sterfte mag niet meer dan 20% zijn als we aan de randvoorwaarden willen blijven voldoen (Ciarelli, 1994).

...

§ 2 Materiaal en Methoden

§ 2.1 Materiaal

Water

Zeewater (saliniteit 29-33‰) werd opgepompt uit de Oosterschelde en gefilterd over een zandbedfilter om deeltjes te verwijderen. Vervolgens is dit water gespiked met verschillende concentraties van respectievelijk aceton, methanol, DMSO, EDTA en natriumthio-sulfaat. De temperatuur, pH, saliniteit en het zuurstof percentage van het water worden aan het begin en einde van de test gemeten.

Corophium volutator

Corophium volutator is een sediment-bewonende amphipode, welke in U-gevormde hollen leeft. De amphipode heeft een lichaamslengte van 1 tot 8 mm, en kan gevonden worden in een saliniteits bereik van 2 tot 50 ‰ (McLusky, 1967).

Corophium kan eenvoudig worden verzameld op de referentie lokatie Oesterput in de Oosterschelde, door het sediment te zeven over een 500 µm zeef. De organismen zijn ook gemakkelijk onder laboratorium omstandigheden te houden. De amphipode wordt daarom door de Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) aanbevolen voor gebruik in mariene sediment bio-assays (Hill *et al.*, 1993).

§ 2.2 Methoden

Algemene testcondities Water-Only toxiciteits test.

Alle testen worden uitgevoerd op een tafel in een temperatuur gecontroleerde kamer (15° ± 1°C). Het zuurstofpercentage, de temperatuur, de saliniteit en de pH worden aan het begin en einde van alle testen gemeten.

Alle testen worden uitgevoerd in duplo, en bevatten alleen water als testmedium.

Specifieke testcondities met betrekking tot de tolerantie testen.

Alle testen worden uitgevoerd in dezelfde testbekers, 1L boorsilicaat glazen bekens. De testbekers worden gedurende de test afgedekt met een horloge-glas en belucht (in de vloeistof) door een Pasteur pipet.

Bij deze test bevatte elke testbeker 500 ml water. Dit water wordt in verschillende concentraties gespiked (vervuild) met Aceton, Methanol, DMSO, EDTA of Natriumthio-sulfaat.

Direct na het vullen van de testbekers worden, in verband met de vluchtigheid van verschillende van de te testen stoffen, in elke testbeker 20 testorganismen toegevoegd.

Na 72 uur (3 dagen) wordt de inhoud van de testbekers gezeefd over een 500 μm zeef om de testorganismen te verzamelen en te tellen. Een *Corophium* wordt als dood geteld als deze niet meer beweegt, zelfs na fysieke stimulatie.

Testcondities met betrekking tot de testvolume testen.

Deze testen zijn uitgevoerd met twee typen boorsilicaat glazen testpotjes: Type I: (brede) potjes van 50 ml, Type II: (smalle) potjes van 25 ml. De potjes worden gedurende de test afgedekt met een stukje parafilm (met een klein gaatje erin). De ene helft van de potjes wordt belucht boven de vloeistof door een Pasteur pipet, de andere helft wordt niet belucht.

Bij deze test bevatten de helft van beide typen potjes 10 en de andere helft 20 ml ongespiked water. We willen namelijk alleen de sterfte die optreedt door het volume verschil en model van de potjes bestuderen en niet de sterfte die optreedt door een toxicant.

Na het vullen van de potjes worden de 10, 15 of 20 testorganismen toegevoegd in de testpotjes. Na 72 uur en 96 uur wordt de inhoud van de testpotjes gezeefd over een 500 μm zeef om de testorganismen te verzamelen en te tellen. Een *Corophium* wordt als dood geteld als deze niet meer beweegt, zelfs na fysieke stimulatie.

Berekeningen

De LC_{50} berekeningen zijn uitgevoerd met een programma van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwater beheer en Afvalwater behandeling (RIZA). Dit programma is gebaseerd op de trimmed Spearman-Kärber methode (Hamilton *et al.*, 1977).

Statistische berekeningen voor het bepalen van NOEC en LOEC waarden zijn uitgevoerd met het programma TOXSTAT.

§ 3 Resultaten

§ 3.1 Resultaten van de tolerantie testen

Aceton (99,3% zuiver)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van aceton voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 3 µl/l, 30µl/l, 300 µl/l, 3ml/l en 30 ml/l.

Het eerste significante effect van aceton werd waargenomen bij een concentratie van 30 ml/l (LOEC); de NOEC-waarde van *Corophium* voor aceton is dan 3 ml/l. Een LC₅₀-waarde kon niet worden berekend gezien de hoogste concentratie van 30 ml/l een mortaliteit gaf van 27,5%.

Methanol (99,8% zuiver)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van methanol voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 1%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 8% en 16 % methanol v/v.

Het eerste significante effect van methanol werd waargenomen bij een concentratie van 2,5% v/v (LOEC); de NOEC-waarde van *Corophium* voor methanol is dan 2 % v/v. Van deze testen kon ook een 72h LC₅₀-waarde berekend worden welke 2,7 % v/v bedraagt met een 95% betrouwbaarheids interval van 2,6 tot 2,8 % v/v methanol.

DMSO (99,9% zuiver)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van DMSO voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 3 µl/l, 30µl/l, 300µl/l, 1ml/l, 3ml/l, 5ml/l, 15ml/l, 20ml/l, 25ml/l en 30 ml/l.

Het eerste significante effect van DMSO werd waargenomen bij een concentratie van 25 ml/l (LOEC); de NOEC-waarde van *Corophium* voor DMSO is dan 20 ml/l. Ook van deze testen kon een 72h LC₅₀-waarde worden berekend, deze bedraagt 28,9 ml/l DMSO met een 95% betrouwbaarheids interval van 27,0 tot 30,9 ml/l DMSO.

EDTA (99,7% zuiver)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van EDTA voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 0,5 µM, 50µM, 100µM, 0,5mM, 1mM en 10 mM.

Het eerste significante effect van EDTA werd waargenomen bij een concentratie van 10 mM (LOEC); de NOEC-waarde van *Corophium* voor EDTA is dan 1 mM. Een LC₅₀-waarde kon niet worden berekend gezien de hoogste concentratie van 10mM een mortaliteit gaf van 22,5%.

Natriumthiosulfaat (99,8% zuiver)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van Natriumthiosulfaat voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4mM, 0,8mm, 1,6mM, 3,2mM en 6,4 mM.

Binnen deze concentratie reeks werd geen significant effect van natriumthiosulfaat gevonden een LOEC en LC₅₀-waarde kunnen dus niet worden berekend. Wel kunnen we stellen dat bij een concentratie van 6,4 mM er geen effect is van natriumthiosulfaat.

Hexaan (95% zuiver n-hexaan)

Om de NOEC, LOEC en eventueel LC₅₀-waarden van Hexaan voor *Corophium volutator* te bepalen is een oplopende concentratie reeks ingezet van 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% en 2%. v/v hexaan.

Het eerste significante effect van hexaan werd waargenomen bij een concentratie van 0,2% v/v (LOEC); de NOEC-waarde van *Corophium* voor hexaan is dan 0,1% v/v. Van deze testen kon ook een 72h LC₅₀-waarde worden berekend, welke 0,20% v/v bedraagt met een 95% betrouwbaarheids interval van 0,16 tot 0,26 % v/v hexaan.

De bovenstaande waarden zijn slechts gedeeltelijk waar omdat hexaan niet in water oplosbaar is. Hexaan vormt een laagje aan de oppervlakte van de testbeker. Bij de lage concentraties (<0,2%) is slechts een gedeelte van het wateroppervlak bedekt met hexaan, bij de hogere concentraties (>0,5%) is meer dan 50% van het gehele wateroppervlak

bedekt. De *Corophium* gaan direct dood als ze tijdens het zwemmen in aanraking komen met het hexaan laagje. De hier vermelde waarden geven dus meer de kans aan dat *Corophium* in aanraking komt met de hexaan dan een werkelijke LC₅₀, NOEC of LOEC-waarde.

§ 3.2 Resultaten van de volume testen

Op tijdstip 0 zijn de volgende waarden gemeten voor de fysische grootheden:

saliniteit 31 ‰.

zuurstof % 95 %.

zuurgraad 8,25.

temperatuur 15°C.

72 uurs test, belucht.

Tabel 3.2. Resultaten van de beluchte 72 uurs volume test.

Aantal levende organismen op t=0.	10	15	20	Sal ‰	O ₂ %	pH	T °C.
Type I met 10 ml	8	0	0	94,7 *	91	8,20	14,7
Type II met 10 ml	10	14	1	83,9 *	82	8,20	14,7
Type I met 20 ml	10	15	20	46,9 **	88	8,18	14,7
Type II met 20 ml	10	15	20	43,4 **	90	8,20	14,7

* 10 ml potjes voor 2/3 ingedampt.

**20 ml potjes voor 1/3 ingedampt.

Door het beluchten is een groot gedeelte van het water verdampt. Dit heeft bij sommige potjes een dusdanige verhoging van de saliniteit tot gevolg gehad dat bij *Corophium* sterfte optrad ten gevolge van deze hoge saliniteit (>80‰).

72 uurs test, onbelucht.

Uit tabel 3.3 blijkt dat de zuurstof percentages in de Type II potjes sneller dalen dan de zuurstof percentages in de Type I potjes. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het volume aan lucht dat boven het water staat in de potjes. Bij de smalle type II potjes staat er bij een testvolume van 20 ml nog maar 5 ml lucht boven het water. Bij de brede type I potjes van 50 ml staat er meer lucht boven het water en bovendien is ook het uitwisselings oppervlak groter.

Tabel 3.3. Resultaten van de onbeluchte 72 uurs volume test.

Aantal levende organismen op t=0.	10	15	20	Sal ‰	O ₂ %	pH *	T °C.
Type I met 10 ml	10	15	20	31,4	93	-	14.8
Type II met 10 ml	10	14	20	31,4	87	-	14.9
Type I met 20 ml	10	14	20	31	91	-	14.7
Type II met 20 ml	10	5	19	31	81	-	14.8

* Bij deze test zijn geen pH waarden gemeten.

96 uurs test, onbelucht.

Tabel 3.4. Resultaten van de onbeluchte 96 uurs volume test.

Aantal levende organismen op t=0.	10	15	20	Sal ‰	O ₂ %	pH	T °C.
Type I met 10 ml	10	15	19	31,7	91	-	14,8
Type II met 10 ml	10	14	20	31,7	81	-	15,2
Type I met 20 ml	10	13	20	31,1	87	-	14,7
Type II met 20 ml	9	15	17	31,4	68	-	14,8

Uit deze tabel kunnen we dezelfde conclusie trekken als uit tabel 3.3 omdat ook hier duidelijk is dat het zuurstof percentage in de type II potjes sneller daalt dan in de type I potjes. Ook is hier een iets hogere mortaliteit te zien bij de type II potjes met 20 ml.

§ 4 Conclusie en Discussie

Uit de tolerantie testen blijkt dat *Corophium volutator* redelijk goed tegen de geteste stoffen bestand is. De NOEC waarden (zie tabel 4.1) liggen allemaal veel hoger dan de concentraties die gedurende een TIE gebruikt worden. *Corophium volutator* is dus wat betreft zijn gevoeligheid voor de gebruikte stoffen een goed organisme om mee te testen gedurende een TIE procedure.

Tabel 4.1. Tolerantie van *Corophium volutator* voor verschillende stoffen.

Stof	72h NOEC	72h LOEC	72h LC ₅₀ (95 % betrouwbaarheid)	Concentratie tijdens TIE
Aceton	3 ml/l	30 ml/l	-	-
Methanol	2 % v/v	2,5 % v/v	2,7 % v/v (2,6-2,8 % v/v)	variabel
DMSO	20 ml/l	25 ml/l	28,9 ml/l (27,0-30,9 ml/l)	-
EDTA	1 mM	10 mM	-	0,22 mM
Na ₂ S ₂ O ₃	≥ 6,4 mM	-	-	0,30 mM
Hexaan	0,1 % v/v *	0,2 % v/v *	0,2 % v/v (0,16-0,26 % v/v) *	variabel

* Kansen i.p.v. waarden zie ook commentaar § 3.1 Hexaan.

Uit de volume testen blijkt dat het niet mogelijk is om te beluchten als testen uitgevoerd worden met kleine volumina omdat dan de saliniteit teveel oploopt. Zeer duidelijk is ook te zien dat de brede type I potjes van 50 ml beter voldoen dan de smalle type II potjes van 25 ml omdat bij de type II potjes het zuurstof percentage terugloopt.

Een duidelijke aanwijzing voor het maximale aantal testorganismen in een potje is uit deze gegevens niet te halen maar bij 20 testorganismen zien we toch regelmatig een grotere mortaliteit dan bij minder testorganismen. Gezien het kleine bodem oppervlak van de potjes is het aan te raden niet meer dan 10 *Corophium* in deze kleine potjes te testen.

Deel 2

Vergelijking van *Mysidopsis bahia* en *Corophium volutator* in de eerste fase van een mariene toxicity identification evaluation (TIE).

M.E. Schot, P.G. Schout en K.T. Ho

Inhoudsopgave deel 2

§ 1 Inleiding	3
§ 2 Theorie chemische manipulaties	5
§ 2.1 Filtratie Procedure	5
§ 2.2 Beluchtings Procedure	5
§ 2.3 EDTA Procedure	7
§ 2.4 Natriumthiosulfaat Procedure	8
§ 2.5 Ulva Procedure	9
§ 2.6 C ₁₈ SPE kolom Procedure	10
§ 2.7 Methanol eluaat Procedure	11
§ 2.8 pH Procedure	12
§ 3 Materiaal en Methoden chemische manipulaties	13
§ 3.0 Poriewater en Effluent	13
§ 3.1 Filtratie Procedure	13
§ 3.2 Beluchtings Procedure	15
§ 3.3 EDTA Procedure	15
§ 3.4 Natriumthiosulfaat Procedure	16
§ 3.5 Ulva Procedure	16
§ 3.5 C ₁₈ SPE kolom Procedure	17
§ 3.6 Methanol eluaat Procedure	18
§ 3.7 pH Procedure	19
§ 4 Materiaal en Methoden toxiciteits testen	23
§ 4.1 Materiaal	23
§ 4.2 Methoden	26
§ 5 Resultaten	29
§ 5.1 Resultaten van TIE testen met <i>Corophium volutator</i>	29
§ 5.2 Resultaten van TIE testen met <i>Mysidopsis bahia</i>	33
§ 6 Conclusies	37
Literatuurlijst	39

§ 1 Inleiding

Deel 2 van dit rapport beschrijft de methode en de resultaten van een de eerste fase van een TIE procedure met poriewater verkregen uit sediment M16, den Helder. Dit sediment is getest met verschillende bioassays, waaronder één met *Corophium volutator*, en toxisch bevonden (TNO, 1995, Aquasense, 1995b).

In de eerste fase van een TIE wordt getracht de stofgroep te determineren welke het toxische effect veroorzaakt. De mogelijke toxicanten kunnen in deze fase worden onderverdeeld in de volgende stofgroepen: metalen, organische stoffen, vluchtige stoffen en oxidanten.

Door chemische manipulaties kunnen de verschillende stofgroepen uit het poriewater of effluent worden verwijderd. Indien dit niet mogelijk is kan door het toevoegen van stoffen ervoor worden gezorgd dat bepaalde stofgroepen niet of minder beschikbaar worden voor de testorganismen.

...

§ 2 Theorie chemische manipulaties

§ 2.1 Filtratie Procedure

Als we een monster filtreren verkrijgen we informatie over de filtreerbaarheid van de toxiciteit. Het geeft echter weinig informatie over de stofgroep(en) tot welke de toxicant(en) behoort.

Als de toxiciteit van een monster door het filtreren hiervan afneemt betekent dit dat de toxiciteit van het monster geassocieerd is met gesuspendeerd materiaal of geassocieerd is met deeltjes. De verdeling van stoffen over de waterfase en de filtreerbare fase is afhankelijk van de oppervlaktelading en het oppervlak van de deeltjes, de polariteit, lading en oplosbaarheid van de stoffen en de monstrematrix. Als we deeltjes verwijderen door middel van filtratie kunnen andere stoffen zich tijdens dit proces aan de deeltjes hechten. Deze stoffen zijn dan niet meer beschikbaar voor de testorganismen. De toxiciteit kan ook afnemen door filtratie als de toxicanten niet gebonden zijn aan deeltjes. Het is bekend dat filtratie het totaal aan cationische metalen kan reduceren (Norberg-King *et al.*, 1992).

Een verandering in toxiciteit door filtratie leidt dus niet tot een eenduidige conclusie in de richting van een bepaalde stofgroep welke verantwoordelijk zou zijn voor de toxische effecten van het monster. Maar toch is het nuttig om te weten of de toxiciteit weg te filtreren is, met betrekking tot bijvoorbeeld de reiniging van effluënten.

§ 2.2 Beluchtings Procedure

Als we een monster beluchten verkrijgen we informatie over het feit of de toxiciteit veroorzakende stof(fen) als dan niet verwijderd kan worden met beluchting. Tijdens het beluchten van een monster kan de toxiciteit via drie verschillende mechanismen toe of af nemen; oxideren, vervluchtigen en uitspatten.

Oxideren: Tijdens het beluchten van een monster wordt ook veel zuurstof door het monster geleid. Dit kan ervoor zorgen dat stoffen oxideren, wat een verandering in de toxiciteit van het monster kan veroorzaken.

Vervluchtigen: Tijdens het beluchtingsproces kunnen vluchtige stoffen die zijn opgelost in het monster, oplossen in de luchtbellen en zodanig worden verwijderd uit het monster, wat een afname van de toxiciteit tot gevolg kan hebben.

Uitspatten: Tijdens het beluchtingsproces wordt een grote hoeveelheid lucht in de monsteroplossing geblazen, deze lucht moet deze oplossing natuurlijk ook weer verlaten. Als een monster stoffen bevat welke oppervlakte actief (zepen) zijn kunnen deze een laagje vormen om een luchtbel. Als de luchtbel de monsteroplossing verlaat gaan de oppervlakte actieve stoffen mee. Deze luchtbellen zullen meestal uiteenspatten tegen de wand van het beluchtingsvat. De eventueel aanwezige oppervlakte actieve stoffen zullen zich dus nu aan de wand boven de vloeistof bevinden. De toxiciteit van het monster kan door het verwijderen van de oppervlakte actieve stoffen toe of af nemen (Norberg-King *et al.*, 1992).

Als de toxiciteit van een monster sterk veranderd door de beluchtingsprocedure is het noodzakelijk om enige aanvullende testen te doen om te bepalen welk mechanisme in welke mate verantwoordelijk is voor de verandering in de toxiciteit.

Om te onderzoeken of de toxiciteit door oxidatieve processen is veranderd kunnen we de beluchtingsprocedure nogmaals uitvoeren maar nu door te beluchten met stikstofgas. De processen vervluchtigen en uitspatten kunnen nu nog wel optreden maar het oxidatieproces is niet meer.

Om te onderzoeken of de toxiciteit is veranderd door uitspattings-processen moeten we het beluchte monster uit het beluchtingsvat verwijderen zonder dat het in contact komt met de wand van het vat boven het monster. Dit is noodzakelijk omdat de oppervlakte actieve stoffen anders weer in het monster terecht kunnen komen. De beste methode om het beluchte monster dusdanig uit het beluchtingsvat te verwijderen is overhevelen. Als we vervolgens het vat goed uitwassen met verdunningswater bevat dit water de oppervlakte actieve stoffen die zich aan de wand van het vat waren achtergebleven. Door het beluchte monster te testen met het uitwaswater en schoon verdunningswater kunnen we onderzoeken of de toxiciteit wordt beïnvloed door de aanwezigheid van oppervlakte actieve stoffen.

Het uitvoeren van een normale beluchtingsprocedure levert dus informatie op over de eventuele toxiciteit van verschillende stofgroepen. Door het uitvoeren van de verschillende vervolg testen kunnen we, in geval van een sterke verandering van de normale beluchtingsprocedure, aangeven welk mechanisme verantwoordelijk is voor de toxiciteit

verandering en hieraan een stofgroep koppelen. Is de verandering in de toxiciteit veroorzaakt door oxidatieve processen dan duidt dit op een toxiciteit veroorzaakt door oxideerbare stoffen of geoxideerde stoffen. Is de verandering in de toxiciteit veroorzaakt door vervluchtiging dan duidt dit op een toxiciteit veroorzaakt door vluchtige stoffen (vaak organische stoffen). Is de verandering in de toxiciteit veroorzaakt door het uitspattingsproces dan duidt dit op een toxiciteitsverandering veroorzaakt door oppervlakte actieve stoffen.

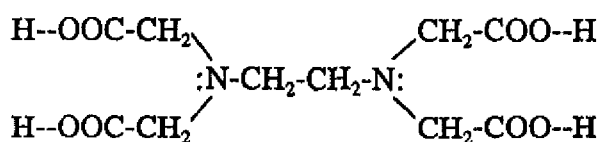
§ 2.3 EDTA Procedure

Als we EDTA toevoegen aan een monster verkrijgen we informatie over het feit of de toxiciteit wel of niet wordt veroorzaakt door bepaalde cationische metalen. Door de additie van EDTA aan poriewater of effluënten kunnen niet-toxische complexen ontstaan met verschillende cationische metalen.

EDTA (Ethyleen Diamine Tetra Acetaat zuur) is een sterke organische complexator. Door de complexeringssterkte van EDTA zal deze vaak andere liganden (als chlorides en oxides) verdringen. De complexatie van metalen door EDTA is afhankelijk van de pH, het type en speciatie van het metaal, andere liganden in de oplossing en de bindingscapaciteit van EDTA voor het metaal. Verschillende studies hebben aangetoond dat het toevoegen van EDTA de toxiciteit van metalen reduceert (Gerringa *et al.*, 1995, Norberg-King *et al.*, 1992).

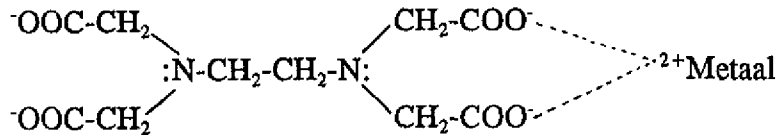
EDTA vormt de sterkste complexen met divalente metalen als Cadmium, Koper, IJzer, Lood, Nickel, Zink en Kwik (2+). Matig sterke complexen kunnen worden gevormd met de metalen; Aluminium, Arseen, Barium, Calcium, Kobalt, Magnesium, Mangaan, Strontium en Thallium. Met anionische vormen van metalen (als seleniden, chromaten en hydrochromaten) kunnen geen complexen worden gevormd (Skoog *et al.*, 1988).

Molekuulformule van EDTA in de neutrale vorm:



Afhankelijk van de pH van de oplossing gaan de waterstofionen van de zuurgroepen af en krijgt het EDTA vrije carbonaat groepen waaraan metalen kunnen worden gebonden.

Molekuulformule van EDTA in de gecomplexeerde vorm:



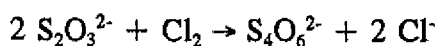
Verschillende studies hebben aangetoond dat de molaire verhoudingen tussen EDTA en totaal metalen minstens 1:1 moet zijn, willen we de toxiciteit van de metalen effectief reduceren (Norberg-King *et al.*, 1992). Een overmaat aan EDTA is aan te raden omdat we met evenwichts-situaties te maken hebben. Hierbij moeten we natuurlijk wel de tolerantie van het testorganisme ten opzichte van EDTA in het oog houden, omdat we alleen de toxiciteit willen trachten te reduceren en geen nieuwe EDTA toxiciteit introduceren.

Een afname van de toxiciteit door additie van EDTA duid vooral op toxiciteit veroorzaakt door metalen. Maar bij het interpreteren van de resultaten moeten we ook rekening houden met het feit dat door het toevoegen van EDTA niet alleen de toxiciteit van cationische metalen afneemt, maar ook de toxiciteit van sommige cationische oppervlakte actieve stoffen kan afnemen (Norberg-King *et al.*, 1992).

§ 2.4 Natriumthiosulfaat Procedure

Als we natriumthiosulfaat toevoegen aan een monster levert dit informatie op over het feit of de toxiciteit van een monster veroorzaakt wordt door oxidanten of andere eenvoudig te oxideren verbindingen. Door de additie van natriumthiosulfaat, een sterke reductor, aan een monster kunnen oxidatieve verbindingen (als chloor, broom, jood, ozon en chloordi-oxine) worden gereduceerd (Norberg-King *et al.*, 1992). Ook andere verbindingen (als mangaan en koper) kunnen gereduceerd worden. Deze reducties kunnen leiden tot een afname van de toxiciteit.

Reductie van chloor door natriumthiosulfaat (Skoog *et al.*, 1988):



Het thiosulfaat ion kan ook complexen vormen met metalen. Omdat het thiosulfaat ion een zwakke complexator is, is de vorming van metaalcomplexen afhankelijk van de metalen en de complexatie snelheid. Op basis van de evenwichtskonstanten kan gezegd worden dat de metalen; Cadmium, Koper, Zilver en Kwik (2+) in aanmerking komen voor complexvorming met het thiosulfaat ion (Smith and Martell, 1981).

Het thiosulfaat ion is een zeer instabiel ion en kan uiteenvallen in ongeveer 24 uur. Als het de bedoeling ook metalen te complexeren met het thiosulfaat ion is het aan te raden elke 24 uur een nieuwe additie van natriumthiosulfaat aan het monster te doen (Norberg-King *et al.*, 1992).

Een afname van de toxiciteit door additie van natriumthiosulfaat duidt vooral op toxiciteit veroorzaakt door oxidatieve verbindingen. Maar we moeten bij het interpreteren van de resultaten ook rekening houden met het feit dat door het toevoegen van natriumthiosulfaat ook de toxiciteit van metalen kan afnemen.

§ 2.5 Ulva Procedure

Deze manipulatie kunnen we gebruiken als we vermoeden dat de toxiciteit van een monster vooral wordt veroorzaakt door ammonia. Ulva of zeesla kan ammonia opnemen of omzetten naar minder toxische stikstofverbindingen.

Door de Ulva behandeling wordt de toxiciteit veroorzaakt door ammonia weggenomen en dus kunnen andere toxische factoren worden onderzocht. Aan het gebruik van Ulva is ook een nadeel verbonden, door het grote oppervlak van de Ulva kunnen hieraan veel organische stoffen sorberen. Ulva kan de totale hoeveelheid van organische stoffen in het monster met 60% verminderen. Als een gedeelte van de toxiciteit veroorzaakt wordt door organische stoffen zal dit dus ook met 60% kunnen verminderen (K.T. Ho, persoonlijke communicatie, RIKZ-Middelburg, 1995).

De behandeling met Ulva moet dus vooral gezien worden als een voorbehandeling waarna nog een of meerdere andere manipulaties kunnen worden uitgevoerd.

Een afname van de toxiciteit van het monster na behandeling met Ulva kan dus vooral worden toegeschreven aan een vermindering van de ammonia toxiciteit. Maar bij het interpreteren van de resultaten moeten we heel goed rekening houden met het feit dat door de Ulva behandeling het percentage organische stoffen in de oplossing sterk kan

veranderen. Het is dus noodzakelijk extra testen uit te voeren om de eventuele toxiciteit vermindering door de afname van de totale hoeveelheid organische stoffen te onderzoeken, bijvoorbeeld een pH7 + C₁₈ SPE kolom manipulatie.

§ 2.6 C₁₈ SPE kolom Procedure

Als we een monster over een C₁₈ SPE kolom leiden levert dit informatie op over de toxiciteit van de organische componenten in het monster bij de gebruikte pH.

Een C₁₈ SPE kolom verwijderd vooral de apolaire organische stoffen uit een oplossing door sorptie aan de kolom (Norberg-King *et al.*, 1992). Omdat de poriën in een kolom klein zijn heeft deze ook een filter werking, hierdoor kunnen ook sommige metalen en sommige oppervlakte actieve stoffen uit het monster worden verwijderd. De monsters moeten voordat ze over een kolom worden geleid eerst worden gefiltreerd om de deeltjes te verwijderen deze zouden mogelijk een verstopping kunnen veroorzaken in de kolom.

Een afname in de toxiciteit van het monster kan dus worden veroorzaakt door twee principes, filtratie en de extractie van organische stoffen door de kolom. De extractie van stoffen door de kolom berust op het verschil in polariteit tussen de beide fasen. De C₁₈ is apolair en heeft een dipoolmoment van 0 het water is matig polair en heeft een dipoolmoment van $6,2 * 10^{-30}$ C m (Lide, 1992). De extractie van apolaire stoffen is volledig omdat deze liever naar de C₁₈ fase gaan dan in de waterfase blijven, dit type extractie proces noemen we reverse phase extractie. De extractie van polaire stoffen is afhankelijk van hun dipoolmoment en de oplosbaarheid van deze stoffen, bij kleine dipoolmomenten zal de stof eerder naar de C₁₈ fase gaan en bij hogere dipoolmomenten liever in de waterfase blijven als de oplosbaarheid van de stof dit toelaat. Voor theorie over de filtratie van stoffen zie § 2.1.

Als de toxiciteit is afgenomen na de C₁₈ kolom kunnen we controleren of de toxiciteit was veroorzaakt door apolaire en licht polaire organische stoffen door de kolom te eluëren met methanol, de methanol eluaat procedure.

§ 2.7 Methanol eluaat Procedure

Met deze procedure kunnen we de apolaire en laag polaire stoffen welke door de C₁₈ SPE kolom uit het monster zijn verwijderd weer van de kolom afhalen en deze testen op toxiciteit. Het uitvoeren van deze procedure is alleen nuttig als de toxiciteit van het monster verwijderd of gereduceerd wordt door de C₁₈ SPE kolom procedure (§ 2.6).

Het eluëren van apolaire stoffen gaat het beste met een apolair oplosmiddel. Hexaan is het meest apolaire oplosmiddel wat we kennen maar hexaan is zeer toxisch voor aquatische organismen (zie ook deel 1 van dit rapport). Andere apolaire oplosmiddelen zijn benzenen en chloormethanen, deze zijn ook toxisch voor aquatische organismen. Als eluaat is daarom gekozen voor methanol dit oplosmiddel is matig polair (dipoolmoment $5,7 * 10^{-30}$ C m) maar in veel mindere mate toxisch dan meer apolaire oplosmiddelen (deel 1 van dit rapport). In de praktijk blijkt dat methanol goed voldoet voor het verwijderen van apolaire stoffen van een C₁₈ SPE kolom.

Als we de kolom spoelen met methanol zullen de apolaire stoffen hierin snel oplossen, veel sneller dan ze uit het water aan de kolom sorberen. Het is mogelijk om een 1 gram C₁₈ SPE kolom schoon te spoelen met 3 ml methanol, als we over deze kolom 1 liter monster hebben geleid betekent dit dat in deze 3 ml methanol de apolaire stoffen 333* geconcentreerd zijn (Norberg-King *et al.*, 1992). Natuurlijk kunnen we pure methanol niet gebruiken voor toxiciteitstesten maar door de hoge concentratie factor kunnen we kleine volumina van deze methanol oplossing toevoegen aan verdunningswater. Het methanol percentage mag niet hoger worden dan de NOEC waarde van het testorganisme gebruikt in de toxiciteitstesten.

Het is mogelijk dat zeer apolaire stoffen, metalen en oppervlakte actieve stoffen niet van de kolom kunnen worden gehaald met methanol. Maar de eventuele toxiciteit van metalen en oppervlakte actieve stoffen kunnen we op andere wijze testen. Als de vermindering van toxiciteit niet teruggevonden kan worden in de methanol eluaten zit deze waarschijnlijk nog op de kolom. Door zeer apolaire oplosmiddelen te gebruiken kunnen we deze er wel afhalen maar niet testen op organismen gezien deze oplosmiddelen zeer toxisch zijn. Er bestaan mogelijkheden om van oplosmiddel te veranderen maar dit kan een verlies van toxiciteit geven en is zeer ingewikkeld.

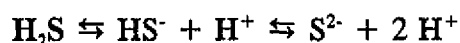
§ 2.8 pH Procedure

De pH kan een grote invloed hebben op de toxiciteit van stoffen, door het veranderen van de pH krijgen we informatie over de pH afhankelijkheid van de stoffen die de toxiciteit veroorzaken. We kunnen hierbij direct denken aan stoffen als ammonia, waterstofsulfide en sommige organische stoffen, en indirect aan metalen. De speciatie van metalen kan veranderen door het veranderen van de pH, gezien de speciatie van metalen grote invloed heeft op de toxische fractie van de metalen kan een veranderende pH de toxiciteit van metalen indirect beïnvloeden (Morisson *et al.*, 1989).

Bij mariene monsters wordt getest bij drie pH's; pH 7, de normale pH (± 8) en pH 9.

Voor metalen geldt dat een hogere pH zorgt voor een afname van metaal toxiciteit, door een hoger percentage CO_3^{2-} en OH^- in het water, deze ionen kunnen metalen complexeren en ze hierdoor minder beschikbaar maken voor organismen (Kester, 1986).

Voor ammonia en waterstofsulfide gelden de volgende reactie vergelijkingen (Skoog *et al.*, 1988):



Als de pH hoger wordt zullen deze reacties naar rechts verlopen. Dit zal in het geval van ammonia een toename in toxiciteit geven en in het geval van waterstofsulfide een afname in toxiciteit. De vetgedrukte vormen van ammonia en waterstofsulfide zijn de meest toxische vormen voor verschillende aquatische organismen (Aquasense, 1995).

§ 3 Materiaal en Methoden chemische manipulaties

§ 3.0 Poriewater of Effluent

De manipulatie procedures beschreven in dit rapport zijn alleen geschikt voor vloeistoffen. Willen we de toxiciteit veroorzakende stoffen van een sediment trachten te achterhalen zullen van dit sediment een elutriaat moeten maken of poriewater moeten winnen.

Effluenten kunnen we direct testen, mits hierin geen grove vaste deeltjes aanwezig zijn (> 0,5 mm). Grove deeltjes kunnen invloed hebben op de manipulaties.

Poriewater van een sediment kunnen we verkrijgen door het sediment uit te persen of door dit sediment af te draaien. We kunnen sediment afdraaien in polypropyleen of teflon buizen gedurende minstens 30 minuten bij 2000 G. Voor het verkrijgen van 1 liter poriewater zal gemiddeld 5 liter sediment moeten worden afgedraaid. Het uitpersen van sedimenten wordt ook veel gedaan maar heeft een nadeel dat zeer kleine vaste deeltjes in het poriewater terecht kunnen komen. Voor het verkrijgen van 1 liter poriewater heb je bij persen meer sediment nodig dan bij afdraaien. Deze redenen zorgen ervoor dat bij ons de voorkeur bestaat voor het afdraaien van sedimenten ter verkrijging van poriewater.

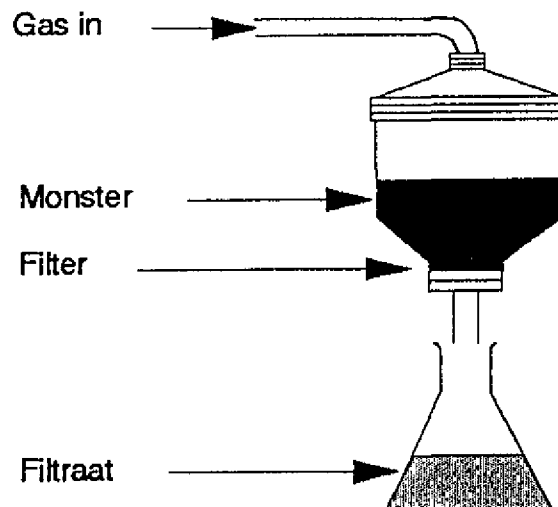
Van sedimenten kunnen ook elutriaten gemaakt worden door deze geruime tijd met een hoeveelheid verdunningswater te schudden, nadeel hiervan is dat het maken van elutriaten verdunend werkt. Bij sedimenten die maar licht toxisch zijn is dit dus geen handige methode.

Gebruik voor het uitvoeren van een "sediment"-TIE dus bij voorkeur poriewater wat doormiddel van afdraaien uit een sediment is verkregen. Gebruik voor het uitvoeren van een effluent-TIE, effluenten die zijn gezeefd over een 0,1 mm zeef.

§ 3.1 Filtratie Procedure

Voor het filtreren van poriewaters en effluenten hebben we een positieve druk filtratie opstelling nodig. Als namelijk een vacuüm filtratie opstelling wordt gebruikt worden ook vluchtige stoffen verwijderd. Een plastic filtratie opstelling van millipore voldoet goed aan deze eisen. Als filters wordt gebruik gemaakt van 0,45 μ m glasfiber filters (zonder organische bindmiddelen) welke geschikt zijn voor de te gebruiken filtratie opstelling. De

positieve druk kan worden geleverd door een olie-vrije pomp, olie-vrij persluchtstelsel of stikstofgas (Burgess *et al.*, 1993).



Figuur 3.1: Filtratie opstelling.

Procedure

- Maak de filtratie opstelling schoon met zuur en aceton en spoel deze met milliQ water.
- Was de filters door milliQ water te filtreren, dit water kan weggegooid worden.
- Filtreer eerst het verdunningswater en vang het op.
- Filtreer zonder eerst het filter te verwisselen het monster en vang het op. Het filter mag zo vaak als nodig is vervangen worden om verstoppingen tegen te gaan, alle gebruikte filters moeten wel vooraf gewassen zijn met milliQ water en gespoeld met verdunningswater.
- Bewaar alle gebruikte filters, voor mogelijke verdere testen in een polystyreen petrischaal.
- De filtraten kunnen direct gebruikt worden in een toxiciteitstest.

§ 3.2 Beluchtings Procedure

Voor het beluchten van poriewater of effluenten is een beluchtings opstelling nodig welke in een zuurkast is geplaatst. Het beluchtingsvat kan gevormd worden door een maatscilinder welke maximaal tot de helft gevuld mag zijn (i.v.m. onderzoek naar oppervlakte actieve stoffen). Het is aan te raden de maatscilinders vast te zetten aan een statief. De lucht die door de oplossing wordt geblazen kan afkomstig zijn van een olie-vrije pomp of uit een olie-vrij perslucht systeem; bij een vervolgonderzoek kan ook gebruik worden gemaakt van stikstofgas (i.v.m. oxidatieve processen onderzoek). De lucht wordt in de oplossing gebracht door middel van 1 ml glazen Pasteur pipetten (Burgess *et al.*, 1993).

Procedure

- Maak de beluchtingsopstelling schoon met zuur en aceton en spoel het met milliQ-water.
- Vul de beluchtingsvaten (maximaal tot de helft) met monster (vat A) en verdunningswater (vat B).
- Sluit de pipetten aan op het beluchtingssysteem en plaats deze in de beluchtingsvaten.
- Zet de beluchting aan en regel de flow zo dat kleine belletjes ontstaan.
- Belucht de oplossingen gedurende 1 uur. De zuurkast moet aan staan!
- Verwijder het monster uit het beluchtingsvat zonder de wand boven de oplossing te raken (overhevelen).
- De beluchte oplossingen kunnen direct gebruikt worden in een toxiciteitstest.

§ 3.3 EDTA Procedure

Het toevoegen van EDTA aan de monsters wordt pas gedaan nadat de verschillende test verdunningen al gemaakt zijn. Aan elk van de testpotjes wordt een bepaalde hoeveelheid EDTA stockoplossing van 25 g/l EDTA toegevoegd (Burgess *et al.*, 1993).

Procedure

- Weeg 2,78 gram NaEDTA \cdot 2H $_2$ O af en los dit op in 100 ml milliQ water (m.b.v. een maatkolf). Deze stockoplossing is stabiel en kan gekoeld worden bewaard.
- Maak de verschillende test verdunningen aan en schenk deze in de testpotjes.
- Pipetteer 30 μ l EDTA stockoplossing per 10 ml testoplossing in de testpotjes en mix deze.

- Laat de testpotjes 3 uur staan alvorens testorganismen toe te voegen (i.v.m. evenwichtsinstellingen).

§ 3.4 Natriumthiosulfaat Procedure

Het toevoegen van natriumthiosulfaat aan de monsters wordt pas gedaan nadat de verschillende test verdunningen al gemaakt zijn. Aan elk van de testpotjes wordt een bepaalde hoeveelheid natriumthiosulfaat stockoplossing van 15 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ toegevoegd (Burgess *et al.*, 1993).

Procedure

- Weeg 2,35 gram $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ af en los dit op in 100 ml milliQ water (m.b.v. een maatkolf). Deze stockoplossing is onstabiel en kan niet bewaard worden, de stockoplossing altijd direct voor gebruik **nieuw** aanmaken.
- Maak de verschillende test verdunningen aan en schenk deze in de testpotjes.
- Pipetteer 33 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ stockoplossing per 10 ml testoplossing in de testpotjes en mix deze goed.
- Laat de testpotjes 1 uur staan alvorens testorganismen toe te voegen (i.v.m. evenwichtsinstellingen).

§ 3.5 Ulva Procedure

Voor het behandelen van een monster met Ulva is natuurlijk Ulva nodig en een goed belichte bak met beluchting voor de behandeling. Ulva of zeesla wordt verzameld in het veld of uit een kweek. Als de monsters behandeld worden met Ulva treedt altijd een verlies van monster op; behandel dus altijd meer monster dan nodig is.

Procedure

- Verzamel zeer veel Ulva en leg deze in een bak met ruim verdunningswater om de Ulva te laten spoelen.
- Droog de Ulva door ze tussen twee tissues te leggen en voorzichtig aan te drukken.
- Weeg Ulva af voor de behandeling van het monster, 5 gram Ulva per 60 ml te behandelen monster of verdunningswater.
- Doe in een bekerglas (met zuur en aceton schoongemaakt en met milliQ water

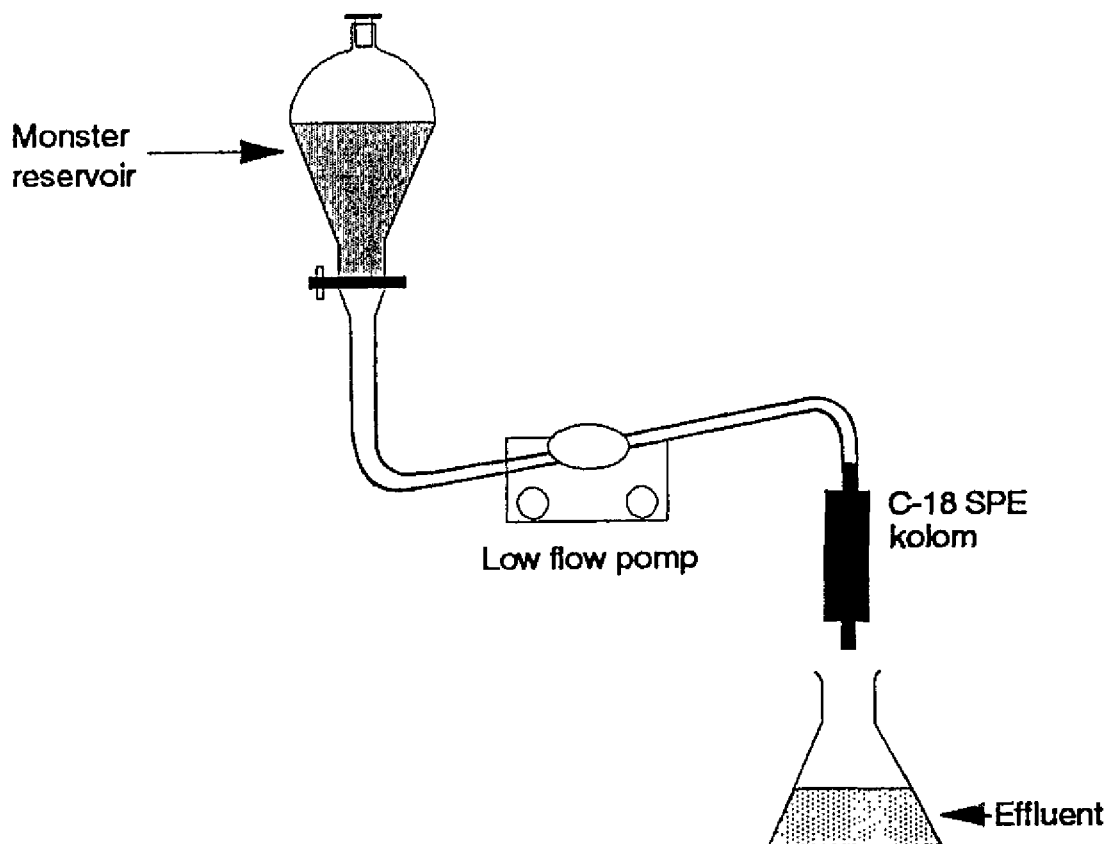
gespoeld) de Ulva en het monster. In een ander bekeerglas wordt de Ulva en het verdunningswater gedaan.

- Zet deze bekeerglazen gedurende 5 uur in een bak die direct belicht wordt (maximaal 15 cm boven de bekeerglazen) en sluit de beluchting aan met behulp van glazen pipetten.
- Schenk de bekeerglazen af, de oplossingen zijn gereed voor gebruik in een toxiciteits-test.

§ 3.6 C₁₈ SPE kolom Procedure

Voor het extraheren van een monster met behulp van een C₁₈ SPE kolom is een extractie opstelling nodig. Deze opstelling bestaat uit een reservoir om de te extraheren oplossing in te doen (een scheidtrechter voldoet zeer goed) en een olie-vrije low flow pomp met instelbare flow (~ 10ml/min) om de oplossingen door de C₁₈ SPE kolom te persen.

Wegwerp C₁₈ SPE kolom(men) van 1 gram (6 ml) en teflon slangen om alles met elkaar te verbinden (Burgess *et al.*, 1993).



Figuur 3.2 Extractie opstelling.

Procedure

- Verbind de pomp en monster reservoir met de teflon slangen (deel 1) en pomp hier 25 ml milliQ water en vervolgens 25 ml methanol (HPLC Grade) door om het geheelte spoelen.
- Verbind de kolom met de opstelling en pomp de door de fabrikant aangegeven hoeveelheid methanol (10-120 ml) door de kolom om deze te conditioneren. Deze methanol kan weggegooid worden.
- Pomp de door fabrikant aangegeven hoeveelheid milliQ water (10-120 ml) door de kolom, zonder dat deze tussendoor droog valt. Dit water kan weg gegooid worden.
- Pomp de benodigde hoeveelheid gefiltreerd verdunningswater door de kolom, zonder dat deze tussendoor droog valt. Vang de eerste 20 ml verdunningswater niet op! De kolom mag nu droog vallen.
- Conditioneer de kolom opnieuw door de door de fabrikant aangegeven hoeveelheid methanol (10-120 ml) door de kolom te pompen. Deze methanol kan weggegooid worden.
- Pomp de door fabrikant aangegeven hoeveelheid milliQ water (10-120 ml) door de kolom, zonder dat deze tussendoor droog valt. Dit water kan weg gegooid worden.
- Pomp de benodigde hoeveelheid gefiltreerd monster door de kolom, zonder dat deze tussendoor droog valt. Vang de eerst 20 ml monster niet op! De kolom mag nu droog vallen, bewaar de kolom voor een eventuele methanol eluaat procedure, of nader onderzoek.
- De geëxtraheerde oplossingen kunnen nu gebruikt worden in een toxiciteitstest.

§ 3.7 Methanol eluaat Procedure

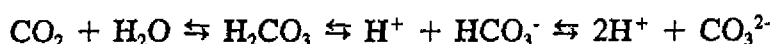
Voor deze procedure is dezelfde extractie opstelling nodig als voor de C₁₈ SPE kolom procedure. Het is zelfs handig om dezelfde kolom te gebruiken. De kolom waarover juist het monster is geleid bevat namelijk de mogelijke toxicanten. In dezelfde opstelling wordt nu een klein volume 100 % methanol over de kolom gepompt dit wordt direct opgevangen. Door een klein volume te kiezen worden de toxicanten geconcentreerd. Indien het volume nog te groot is kunnen we de methanol oplossing nog concentreren door deze in een waterbad te plaatsen of er stiftstofgas overheen te leiden (Norberg-King *et al.*, 1992).

Procedure

- Gebruik de extractie opstelling van figuur 3.2 en verbind de in procedure van § 3.6 gebruikte kolom hieraan.
- Pomp een klein volume (max. 10 ml) methanol over deze kolom en vang deze op in drie fracties (b.v. 3*3ml).
- Laat deze fracties eventueel indampen met behulp van een waterbad (25-30 °C) of stikstofgas.
- Verdun de methanol fracties met verdunningswater voor het gebruik in toxiciteitstesten. Het percentage methanol in de toxiciteitstesten mag niet hoger zijn dan de NOEC waarde voor methanol van het gebruikte testorganisme.

§ 3.8 pH Procedure

Als we de pH van een oplossing willen veranderen voegen we gewoon wat zuur of base toe en de pH is veranderd, helaas werkt dit niet zo. Bij zeewater waar de pH gecontroleerd wordt door de concentratie opgelost CO₂:



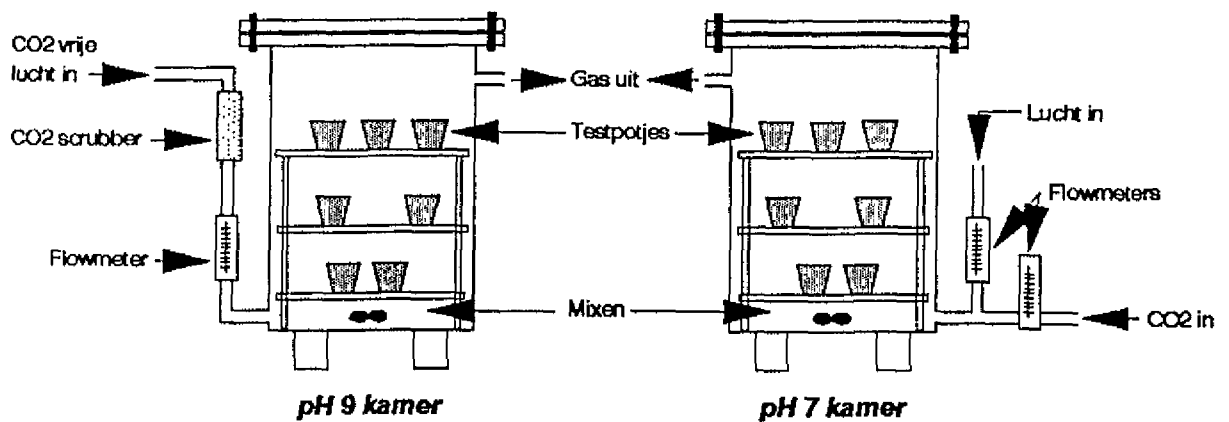
Als de CO₂ concentratie in het water stijgt zal de reactie naar rechts gaan, hierdoor wordt de concentratie waterstofionen in het water hoger waardoor de pH daalt. Als de CO₂ concentratie in het water daalt zal de reactie naar links gaan wat een pH verhoging tot gevolg heeft.

De CO₂ concentratie in het water is gerelateerd aan de CO₂ concentratie in de bovenstaande lucht. Willen we de pH van een monster dus continue veranderen zullen we de CO₂ concentratie in de lucht moeten veranderen. Dit kan alleen als de testen uitgevoerd worden in van de omgeving afgesloten kamers waarin de luchtsamenstelling geregeld kan worden, pH-kamers (Burgess *et al.*, 1993).

De pH van zeewater ligt normaal rond de 8 voor de testen gebruiken we pH waarden van 7 en 9, om dit te bewerkstelligen zijn dus twee pH kamers benodigd. Een voor pH 7 waarbij de de CO₂ concentratie in de lucht verhoogd wordt en een voor pH 9 waarbij de CO₂ concentratie in de lucht verlaagd wordt, zie figuur 3.3.

De CO₂ concentratie van de pH 7 kamer wordt verhoogd door 98% lucht en 2% CO₂ in deze kamer te leiden met een gasflow van ~ 200 ml/min. De pH 9 kamer wordt gevoed

met CO₂ vrije lucht (gasflow 200-300 ml/min), dit kunnen we verzekeren door tussen de gasfles en de pH kamer een CO₂ scrubber te plaatsen. De pH kamers moeten niet geheel afgesloten zijn zodat in de pH kamers een kleine overdruk is. Door de respiratie of fotosynthese van de organismen kan de pH toe of afnemen van de ingestelde waarden; deze fluctuaties mogen niet meer bedragen dan $\pm 0,3$ pH units.



Figuur 3.3: Gecontroleerde pH kamers.

Procedure pH 7

- Zet de gasflow (98% lucht en 2% CO₂, flow ~ 200 ml/min) van de kamer ongeveer 24 uur voor het begin van de toxiciteitstest aan om de luchtsamenstelling in de kamer alvast te veranderen.
- Plaats ongeveer 18 uur voor het begin van de toxiciteitstesten het monster en verdunningswater in de pH kamer om deze op de gewenste pH te laten komen.
- Controleer regelmatig (om de 6 uur) de pH. Als deze te hoog (> 7,3) blijft stel dan de flow van het CO₂ wat hoger in; als de CO₂ flow meer dan 5% van de luchtflow wordt stel dan de pH van de oplossingen in met 1 molair zoutzuur (let op zeer weinig nodig!).
- Als de pH van het monster en verdunningswater is ingesteld (± 18 uur) kunnen deze gebruikt worden in de toxiciteitstesten.
- Maak de test verdunningen aan en voeg de testorganismen toe aan de testpotjes en plaats deze terug in de pH kamer. De gevulde testpotjes mogen niet langer dan 5-10

minuten buiten de pH kamers worden geplaatst.

- Controleer de gasflow en de pH elke 24 uur en stel deze bij indien nodig ($\text{pH} \neq 7 \pm 0,3$), met behulp van de CO_2 flow (zie punt 3).

Procedure pH 9

- Zet de gasflow (CO_2 vrije lucht, flow 200-300 ml/min) van de kamer ongeveer 24 uur voor het begin van de toxiciteitstest aan om de luchtsamenstelling in de kamer alvast te veranderen.
- Stel de pH's van het monster en het verdunningswater in op $\text{pH} 9 \pm 0,3$ met 1 molair natronloog. Let op er is zeer weinig natronloog nodig om de pH van 8 naar 9 te veranderen!
- Plaats deze dan ongeveer 18 uur voor het begin van de toxiciteitstesten in de pH kamer om deze te laten stabiliseren.
- Controleer regelmatig de pH als deze te laag ($\leq 8,7$) wordt stel dan de flow van CO_2 vrije lucht wat hoger in.
- Als de pH van het monster en verdunningswater is ingesteld (± 18 uur) kunnen deze gebruikt worden in de toxiciteitstesten.
- Maak de test verdunningen aan en voeg de testorganismen toe aan de testpotjes en plaats deze terug in de pH kamer. De gevulde testpotjes mogen niet langer dan 5-10 minuten buiten de pH kamers worden geplaatst.
- Controleer de gasflow en de pH elke 24 uur en stel deze bij indien nodig ($\text{pH} \neq 9 \pm 0,3$), door middel van de gas flow (zie punt 4).

...

§ 4 Materiaal en Methoden toxiciteitstesten

§ 4.1 Materiaal

Verdunningswater

Als verdunningswater wordt gefiltreerd zeewater (saliniteit 29-33‰) gebruikt. Dit wordt opgepompt uit de Oosterschelde en gefilterd over een zandbedfilter om deeltjes te verwijderen. Dit water is relatief schoon en constant van samenstelling. De temperatuur, pH, saliniteit en het zuurstof percentage van het water wordt voor gebruik gemeten.

Poriewater of Effluent

Tijdens de testen waarvan de resultaten in dit rapport vermeld staan is gebruik gemaakt van poriewater verkregen, door afdraaien, van een door bio-assays toxisch bevonden sediment. Dit sediment is afkomstig van vak M16 van de lokatie Den Helder (Nederland).

Testorganismen

In dit rapport wordt een vergelijking gemaakt tussen de amphipode *Corophium volutator* en de mysidacea *Mysidopsis bahia*.

Corophium volutator

Corophium volutator is een sediment-bewonende kreeftachtige van de orde amphipoda, welke in U-gevormde holen leeft. De amphipode heeft een lichaamslengte van 1 tot 8 mm, en kan gevonden worden in een saliniteits bereik van 2 tot 50 ‰ (McLusky, 1967).

Corophium kan eenvoudig worden verzameld op de referentie lokatie Oesterput in de Oosterschelde, door het sediment te zeven over een 500 µm zeef. De organismen zijn ook gemakkelijk onder laboratorium omstandigheden te houden. De amphipode wordt o.a. daarom door de Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) aanbevolen voor gebruik in mariene sediment bio-assays (Hill *et al.*, 1993). *Corophium* is vooral gevoelig voor metalen 72h LC₅₀ Cd ≈ 3,9 mg/l (Hannewijk, 1995) 7d LC₅₀ Cd ≈ 1,0 mg/l (Schot, 1995) maar ook voor pesticiden (Ciarelli, 1995).

Tabel 4.1: Tolerantie van *Corophium volutator* voor verschillende stoffen.

Stoffen	72h NOEC	72h LOEC	72h LC ₅₀ (95% betrouwbaarheid)
Aceton	3 ml/l	30 ml/l	-
Methanol	2 % v/v	2,5 % v/v	2,7 % v/v (2,6-2,8 % v/v)
DMSO	20 ml/l	25 ml/l	28,9 ml/l (27,0-30,9 ml/l)
EDTA	1 mM	10 mM	-
Na ₂ S ₂ O ₃	≥ 6,4 mM	-	-
Hexaan	0,1 % v/v	0,2 % v/v	0,20 % v/v (0,16-0,26 % v/v)

Resultaten uit het eerste deel van dit rapport.

Tabel 4.2: Tolerantie van *Corophium volutator* voor verschillende factoren.

Factor	Tolerantie
pH	7,0-8,5 ¹
O ₂ %	> 60% ¹
Temperatuur	5-25°C. ²
Testvolume	≥ 10 ml ³



¹ Resultaten uit Aquasense, 1995a.

² Resultaten uit Bryant *et al.*, 1985.

³ Resultaten uit eerste deel van dit rapport.

Figuur 4.1: *Corophium volutator*

Mysidopsis bahia

Mysidopsis bahia is een kleine vrij-zwemmende kreeftachtige van de orde mysidacea. Deze soort wordt vaak opossum garnaal genoemd; ze hebben deze naam waarschijnlijk te danken aan de broedbuidel bij de vrouwtjes en de nachtelijke activiteiten van de soort (Makings, 1977).

De mysid heeft een lichaamslengte van 2 tot 7 mm, en kunnen worden gekweekt in een saliniteits bereik van 15 tot 30 ‰ (Widdows, 1993). De mysids zijn gevoelig voor plotseling veranderingen in lichtintensiteit, saliniteit en temperatuur. De mysids moeten gedurende een test gevoerd worden met artemia nauplii om kannibalisme tegen te gaan (> 150 artemia nauplii/mysid/dag)(Widdows, 1993). De mysids worden in Amerika gekweekt, en zijn 2 dagen voor de test uit de kweek gehaald en naar Nederland getransporteerd. *Mysidopsis* is vooral gevoelig voor metalen 96h LC₅₀ Cd ≈ 0,11 mg/l (Lussier *et al.*, 1985) maar ook voor organofosfaten en pyrethroïde pesticiden (Clark *et al.*, 1987, 1989).

Tabel 4.3: Tolerantie van *Mysidopsis bahia* voor verschillende stoffen.

Stoffen	48h NOEC	48h LOEC	48h LC ₅₀ (95 % betrouwbaarheid)
Aceton	-	-	-
Methanol	-	-	2,35 % v/v (2,14-2,50 % v/v)
DMSO	-	-	-
EDTA	-	-	1,07 mM (1,03-1,11 mM)
Na ₂ S ₂ O ₃	-	-	1,04 mM (0,98-1,07 mM)

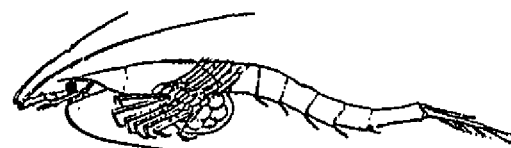
Resultaten uit Burgess *et al.*, 1993.

Tabel 4.4: Tolerantie van *Mysidopsis bahia* voor verschillende factoren.

Factor	Tolerantie
pH	6,8-8,8 ¹
O ₂ %	> 60 % ²
Temperatuur	15-35 °C. ²
Testvolume	≥ 10 ml ¹

¹ Resultaten uit Burgess *et al.*, 1993.

² Resultaten uit Widdows, 1993.



Figuur 4.2: *Mysidopsis bahia*

§ 4.2 Methoden

Algemene testcondities Water-Only toxiciteits testen.

Alle testen worden uitgevoerd in een kamer met een gecontroleerde temperatuur. Aan het begin en einde van de testen wordt de pH, de saliniteit, de temperatuur en het zuurstof percentage gemeten. Alle testen worden uitgevoerd in polystyreen cups van 30 ml, deze cups worden afgedekt met een plastic zak of parafilm om verdamping van het monster tegen te gaan. De testen met een gecontroleerde pH worden uitgevoerd in pH kamers, deze cups worden niet afgedekt.

De 72-uurs toxiciteitstesten met *Corophium volutator* worden uitgevoerd bij $15^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. De testcups bevatten 10 ml monster en 8 testorganismen. Deze testen worden uitgevoerd in duplo.

De 48-uurs toxiciteitstesten met *Mysidopsis bahia* worden uitgevoerd bij $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. De testcups bevatten 10 ml monster en 5 testorganismen welke worden gevoerd met artemia nauplii (> 150 nauplii\mysid\dag). De testen worden uitgevoerd in triplo.

Test procedure TIE

Een TIE procedure wordt altijd vooraf gegaan door een *initial test*, tijdens deze test wordt bekeken of het te onderzoeken poriewater of effluent toxisch is voor de testorganismen waarmee gewerkt wordt. Is dit niet het geval dan hoeven we natuurlijk geen TIE procedure uit te voeren. Als het poriewater of effluent wel toxisch is kunnen we doorgaan met een TIE procedure.

Een initial test wordt ingezet met de volgende verdunningen van het monster; 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% monster als test en 0% monster (is dus 100% verdunningswater) als controle.

Een TIE procedure bestaat uit een aantal verschillende toxiciteits testen, met gemanipuleerd en ongemanipuleerd poriewater of effluent. De testen met ongemanipuleerd poriewater of effluent noemen we *baseline testen*, de *gemanipuleerde* testen zijn genoemd naar hun manipulaties als beschreven in § 2 en § 3. De resultaten van de testen met gemanipuleerd poriewater of effluent worden vergeleken met de baseline om te zien of de manipulatie een verandering in toxiciteit heeft veroorzaakt.

De testverdundingen van de baseline en gemanipuleerde monsters is afhankelijk van de *initial test*, is het monster zeer toxisch dan moet er meer verdund worden en is het monster minder toxisch dan kan met lagere verdundingen worden gewerkt. Meestal worden 4-5 verdundingen gemaakt voor de baseline testen en 3-4 verdundingen voor de gemanipuleerde testen, dit is exclusief de controle van verdunningswater die bij elke test gedaan moet worden. Ook is de verdunding afhankelijk van de manipulatie van het monster. Als een manipulatie alleen de toxiciteit kan verlagen worden iets hogere concentraties monster gebruikt dan in de baseline testen. Als de verwachting is dat de toxiciteit wordt verhoogd na een manipulatie moeten lagere concentraties monster gebruikt worden dan in de baseline testen. We doen dit omdat het de bedoeling is van alle testen een LC_{50} te berekenen en dan is het nodig een goede opbouw te hebben van toxiciteit in de testen.

Berekeningen

De LC_{50} berekeningen zijn uitgevoerd met een programma van het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwater beheer en Afvalwater behandeling (RIZA). Dit programma is gebaseerd op de trimmed Spearman-Kärber methode (Hamilton *et al.*, 1977).

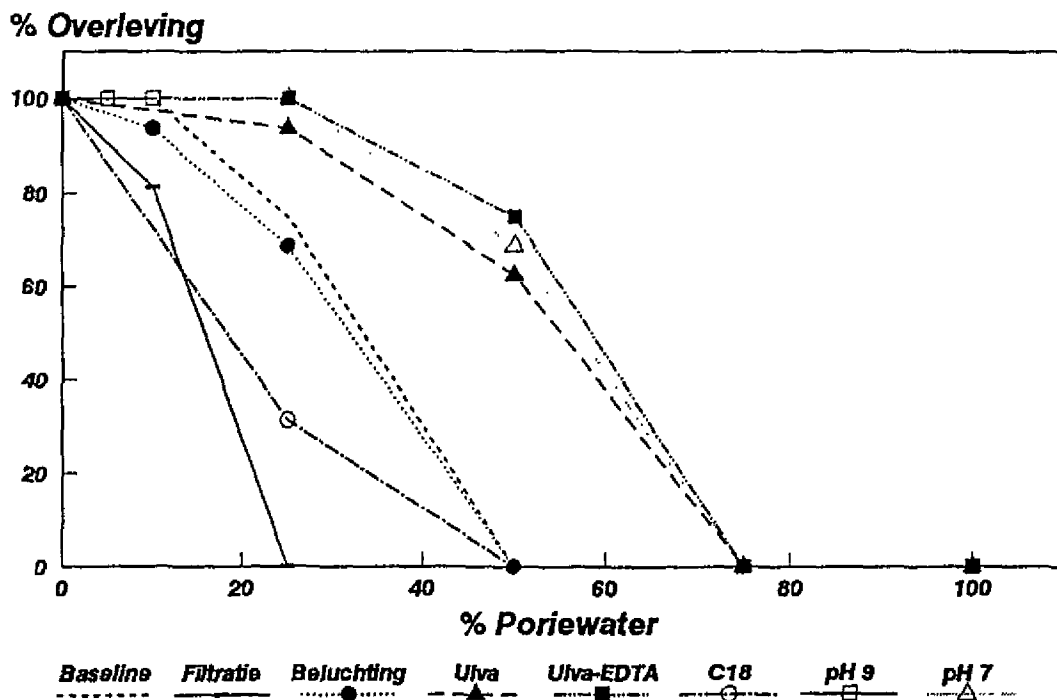
§ 5 Resultaten

§ 5.1 Resultaten van de TIE testen met *Corophium volutator*

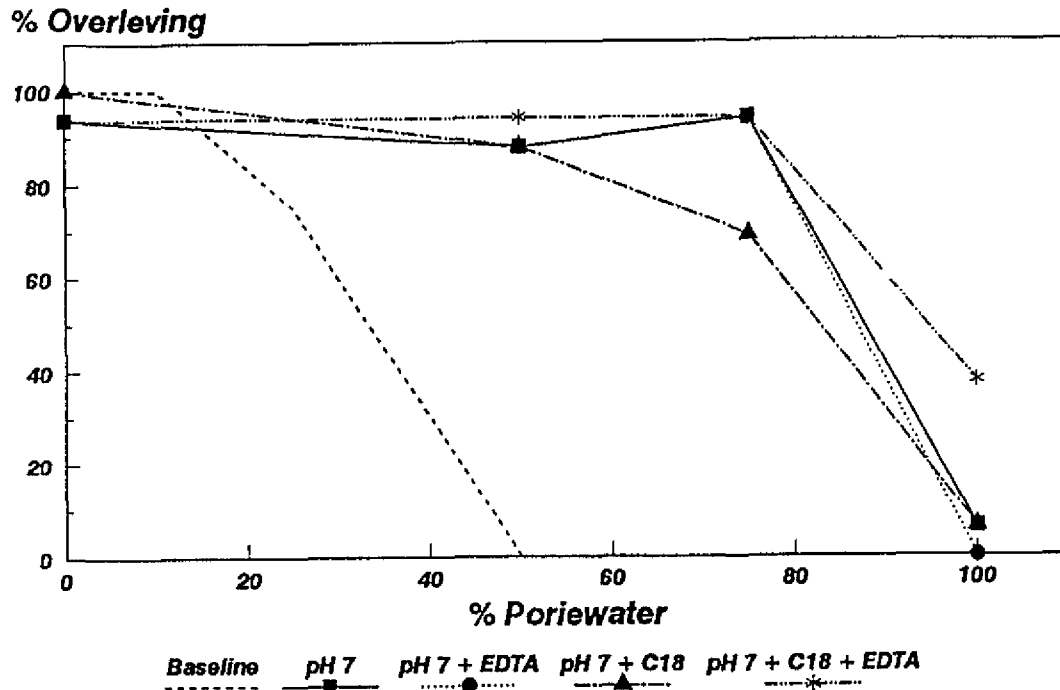
De initial toxiciteitstest in bijlage I geeft aan dat het poriewater van lokatie M16 toxisch is voor *Corophium volutator* dus kunnen we doorgaan met het uitvoeren van een TIE.

Gedurende de eerst fase van deze TIE is gewerkt met verschillende manipulaties en combinaties van manipulaties. De resultaten van deze eerste toxiciteits testen zijn vermeld in bijlage II. Omdat het manipuleren van de pH 7 niet helemaal goed is verlopen is besloten deze manipulaties nogmaals uit te voeren. Resultaten hiervan zijn vermeld in bijlage III.

In de figuren 5.1 en 5.2 zijn de resultaten van de 72 uren toxiciteitstesten na de verschillende manipulaties weergegeven. De gestippelde lijn is het resultaat van de baseline toxiciteit test. Als de lijnen van een manipulatie onder de lijn van de baseline liggen is de toxiciteit van het monster verhoogd door de manipulatie. Als de lijnen van een manipulatie boven de lijn van de baseline liggen is de toxiciteit van het monster verlaagd door de manipulatie.



Figuur 5.1: Resultaten van de eerste TIE toxiciteits testen met *Corophium volutator*.



Figuur 5.2: Resultaten van de tweede TIE toxiciteits testen met *Corophium volutator*.

Figuur 5.1 laat zien dat de behandeling van het monster met Ulva een grote afname van de toxiciteit van het monster veroorzaakt. Als bovendien na de Ulva ook nog EDTA wordt geaddereerd neemt de toxiciteit nog verder af.

Bij deze eerste testen zien we dat het verlagen van de pH wel al effect heeft op de toxiciteit maar dit resultaat is niet geldig als zijnde een pH7 resultaat gezien de pH nog veel te hoog was. Dit wordt duidelijk als we de lijn van de tweede pH7 bekijken in figuur 5.2 hierbij is de toxiciteit veel sterker verminderd dan bij de eerst pH7 toxiciteits test.

Het beluchten van het monster heeft volgens figuur 5.1 geen invloed op de toxiciteit van het monster. De filtratie van het monster heeft wel een effect, de toxiciteit van het monster is toegenomen door de filtratie, dit werkt natuurlijk door in de resultaten van de C₁₈ SPE kolom behandeling omdat deze vooraf wordt gegaan door een filtratie. Bij deze behandeling zien we dan ook bij de lagere concentraties poriewater een gelijke toxiciteit ten opzichte van de filtratie maar bij de hogere concentraties poriewater een lagere toxiciteit van de filtratie.

Waar mogelijk zijn van de verschillende manipulaties LC_{50} waarden berekend, deze staan vermeld in tabel 5.1.

Uit tabel 5.1 blijkt dat het filtreren van het monster een verhoging van de toxiciteit tot gevolg heeft maar dit is pas het geval bij 3 dagen en niet bij 2 dagen. Deze hogere toxiciteit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat er door het wegfiltreren van alle deeltjes uit het monster geen voedingsstoffen meer zijn voor de testorganismen. Dit zelfde geldt ook voor de C18-SPE kolom manipulatie welke na 3 dagen een iets hogere toxiciteit geeft maar na twee dagen een lagere toxiciteit. De hogere toxiciteit na 3 dagen is hier waarschijnlijk ook veroorzaakt door een tekort aan voedingsstoffen. De verlaging van de toxiciteit na 2 dagen kan duiden op toxiciteit veroorzaakt door organische stoffen of metalen.

In tabel 5.1 komt zeer duidelijk naar voren dat het verlagen van de pH naar 7 en de Ulva behandeling een significante verlaging van de toxiciteit tot gevolg hebben. Het is zeer duidelijk dat de toxiciteit verlaging het gevolg is van een verandering in het ammonia, NH_3 gehalte in het monster. Maar ook de vermindering van het percentage organische stoffen door de Ulva behandeling kan voor een afname in de toxiciteit zorgen.

Uit de toxiciteits testen met Ulva en Ulva + EDTA blijkt dat het toevoegen van EDTA na de Ulva behandeling een verlaging van de toxiciteit tot gevolg heeft. Dit kan duiden op toxiciteit die veroorzaakt wordt door metalen. Uit de toxiciteits testen bij pH 7 zien we een verhoging van de toxiciteit na toevoeging van EDTA; een verhoging van de toxiciteit na C18-SPE kolom behandeling maar een duidelijke verlaging van de toxiciteit na een behandeling met beide. Dit kan wederom duiden op toxiciteit veroorzaakt door metalen en organische stoffen.

De toxiciteit van metalen is niet goed zichtbaar in de manipulaties met EDTA. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat de toxiciteit van het ammonia zo groot was in deze testen dat deze volledig de toxiciteit van de metalen overheerste. In de testen waar de ammonia toxiciteit is verlaagd zien we wel een effect van de EDTA behandeling.

Tabel 5.1 Resultaten verschillende TIE toxiciteits testen uitgevoerd met *Corophium volutator*.

Toxiciteits test	48h LC ₅₀ (95% interval)	Toxiciteits verandering t.o.v. Baseline	72h LC ₅₀ (95% interval)	Toxiciteits verandering t.o.v. Baseline
Baseline	28,91% (11-,57-72,19)	-	26,52% (18,24-38,55)	-
Filtratie	28,65% (8,39-97,84)	Gelijke toxiciteit	10,77% (5,53-20,97)	Hogere toxiciteit
Beluchting	33,31% (27-,84-39,84)	Lagere toxiciteit	26,17% (22,42-30,55)	Gelijke toxiciteit
EDTA	35,18% (29-,47-42,00)	Lagere toxiciteit	26,99% (23,48-31,02)	Gelijke toxiciteit
C18-SPE kolom	35,36% (0,43-2881,53)	Onzin LC ₅₀	24,45% (18,37-32,54)	Gelijke toxiciteit*
Ulva	74,23% (66-,51-82,84)	Significant lagere toxiciteit	50,65% (44,51-57,64)	Significant lagere toxiciteit
Ulva + EDTA	70,55% (64-,41-77,28)	Significant lagere toxiciteit	56,06% (50,73-61,95)	Significant lagere toxiciteit
pH 9	-	-	-	-
pH 7	99,12% (94-,00-104,53)	Significant lagere toxiciteit	87,30% (79,75-95,57)	Significant lagere toxiciteit
pH 7 + EDTA	-	-	80,08% (50,91-125,97)	Significant lagere toxiciteit
pH 7 + C18	93,99% (83-,26-106,11)	Significant lagere toxiciteit	76,65% (68,60-85,64)	Significant lagere toxiciteit
pH 7 + C18 + EDTA	-	-	96,35% (88,67-104,70)	Significant lagere toxiciteit

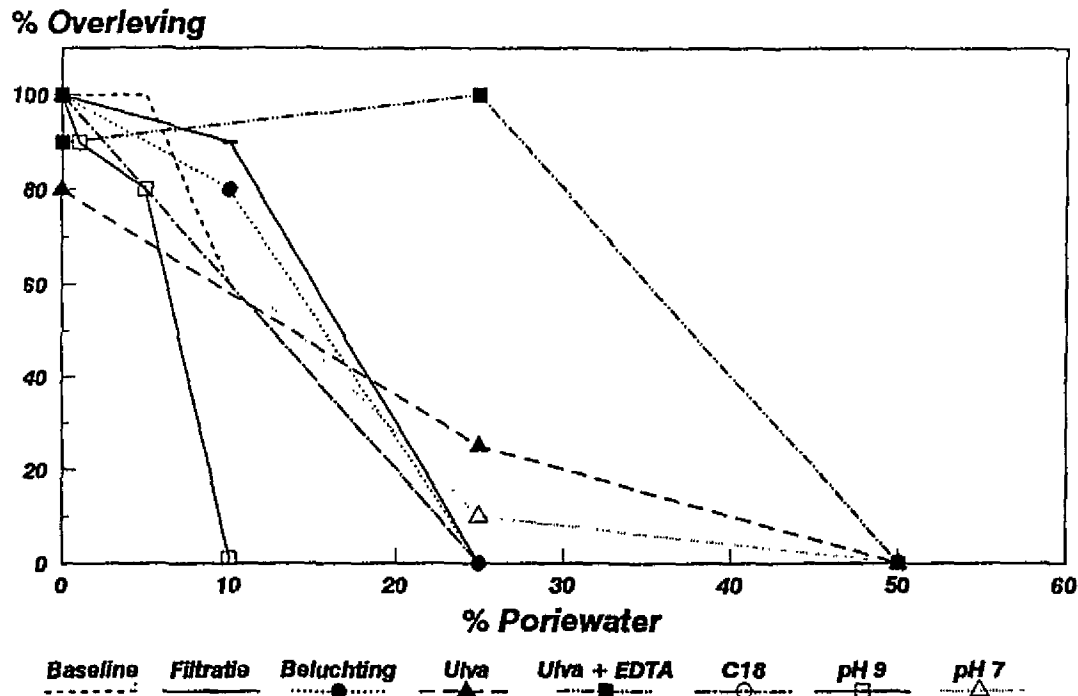
* Volgens berekeningen, niet volgens figuur 5.1.

§ 5.2 Resultaten van TIE testen met *Mysidopsis bahia*

De initial toxiciteitstest in bijlage IV geeft aan dat het poriewater van lokatie M16 zeer toxisch is voor *Mysidopsis bahia* dus kunnen we doorgaan met het uitvoeren van een TIE.

Gedurende de eerst fase van deze TIE is gewerkt met verschillende manipulaties en combinaties van manipulaties. De resultaten van deze toxiciteits testen staan vermeld in bijlage V. Omdat het manipuleren van de pH 7 niet helemaal goed is verlopen zijn de resultaten van de pH 7 toetsen niet geldig. Door4 een gebrek aan mysids zijn deze testen niet herhaald.

In figuur 5.3 zijn de resultaten van de 48 uurs toxiciteitstesten na de verschillende manipulaties weergegeven. De gestippelde lijn is het resultaat van de baseline toxiciteit test. Als de lijnen van een manipulatie onder de lijn van de baseline liggen is de toxiciteit van het monster verhoogd door de manipulatie. Als de lijnen van een manipulatie boven de lijnen van de baseline liggen is de toxiciteit van het monster verlaagd door de manipulatie.



Figuur 5.3: Resultaten van de TIE testen met *Mysidopsis bahia*.

Figuur 5.3 laat zien dat de behandeling van het monster met Ulva en EDTA een grote afname van de toxiciteit van het monster veroorzaakt. De ULVA behandeling alleen veroorzaakt een lichte afname in de toxiciteit.

Bij deze eerste testen zien we dat het verlagen van de pH een klein effect heeft op de toxiciteit maar dit resultaat is niet geldig als zijnde een pH7 resultaat gezien de pH nog veel te hoog was. Het is jammer dat deze experimenten niet meer herhaald konden worden door gebrek aan mysids. De pH9 behandeling geeft een duidelijke verhoging van de toxiciteit wat een aanwijzing is voor een ammonia geïnduceerde toxiciteit.

Het beluchten van het monster heeft volgens figuur 5.3 geen invloed op de toxiciteit van het monster. De filtratie van het monster heeft geen effect, de toxiciteit van het monster is gelijk gebleven na de filtratie. De C₁₈ SPE kolom behandeling heeft een licht effect maar verhoogd de toxiciteit van het monster ten opzichte van de baseline en de filtratie lijn licht.

Waar mogelijk zijn van de verschillende manipulaties LC₅₀ waarden berekend, deze staan vermeld in onderstaande tabel 5.2.

Uit tabel 5.2 blijkt dat het filtreren van het monster geen verandering van de toxiciteit tot gevolg heeft bij de twee dagen test, bij de 1 daagse test geeft het een verlaging van de toxiciteit. Voor de *mysids* geldt niet het voedingsstoffen argument wat voor de *corophium* opgaat omdat deze worden bijgevoerd met *artemia* nauplii. We kunnen dit niet controleren met de resultaten van de C18-SPE kolom behandeling omdat het concentratie bereik bij deze testen verkeerd was gekozen, wat tot gevolg had dat er van deze testen geen LC₅₀ waarden kunnen worden berekend. De verlaging van de toxiciteit door filtratie na 1 dag kan duiden op toxiciteit veroorzaakt door filtreerbare stoffen (deeltjes of suspensies) of metalen.

In tabel 5.2 komt verder zeer duidelijk naar voren dat het verhogen van de pH naar 9 een verhoging van de toxiciteit tot gevolg heeft. Dit samen met het feit dat een behandeling met Ulva een verlaging van de toxiciteit tot gevolg heeft, is een duidelijke indicator dat de toxiciteit het gevolg is van ammonia, NH₃ gehalte in het monster. Dit zelfde vonden we ook al bij de toxiciteits testen met *corophium*, zie § 5.1.

Uit de toxiciteits testen met Ulva en Ulva + EDTA blijkt dat het toevoegen van EDTA na de Ulva behandeling een verlaging van de toxiciteit tot gevolg heeft hetgeen kan

duiden op toxiciteit veroorzaakt door metalen.

De toxiciteit van metalen is een klein beetje zichtbaar in de manipulaties met alleen EDTA, in tegenstelling tot de manipulaties met Ulva + EDTA. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de toxiciteit van ammonia welke zo groot was in deze testen dat deze volledig de toxiciteit van de metalen overheerste. In de testen waar de ammonia toxiciteit is verlaagd zien we wel een duidelijk effect van EDTA. De verlaging van de toxiciteit na de behandeling met Ulva kan ook een gevolg zijn van de afname van organische stoffen.

Tabel 5.2 Resultaten verschillende TIE toxiciteits testen uitgevoerd met *Mysidopsis bahia*.

Toxiciteits test	24h LC ₅₀ (95% interval)	Toxiciteits verandering t.o.v. Baseline	48h LC ₅₀ (95% interval)	Toxiciteits verandering t.o.v. Baseline
Baseline	10,95% (3,58-33,50)	-	10,27% (7,33-14,38)	-
Filtratie	15,80% (0,05-4660,54)	Iets lagere toxiciteit	10,91% (3,70-32,15)	Gelijke toxiciteit
Beluchting	11,71% (2,62-52,38)	Gelijke toxiciteit	11,05% (4,28-28,49)	Gelijke toxiciteit
EDTA	21,49% (6,21-74,36)	Lagere toxiciteit	11,63% (3,36-40,24)	Iets lagere toxiciteit
C18-SPE kolom	*		*	-
Ulva	49,67% (45,83-53,83)	Significant lagere toxiciteit	26,14% (19,23-35,54)	Significant lagere toxiciteit
Ulva + EDTA	60,96% (53,03-70,06)	Significant lagere toxiciteit	31,55% (25,52-39,01)	Significant lagere toxiciteit
pH 9	12,77% (6,76-24,09)	Gelijke toxiciteit	5,66% (3,68-8,70)	Hogere toxiciteit
pH 7	-		-	-
pH 7 + C18	-		-	-

* Concentraties verkeerd gekozen er kunnen geen LC₅₀ waarden worden berekend.

§ 6 Conclusies

Uit de toxiciteits testen uitgevoerd met *Corophium volutator* kunnen we concluderen dat de toxiciteit voornamelijk wordt veroorzaakt door ammonia. Als we deze vorm van toxiciteit wegnemen zien we dat er nog een klein gedeelte overblijft wat verdwijnt na behandeling met EDTA en een C18-SPE kolom. Dit duidt er op dat een gedeelte van de toxiciteit wordt veroorzaakt door organische stoffen en/of metalen. Daar de beluchting geen verandering in de toxiciteit veroorzaakt kunnen we zeggen dat de eventuele organische toxische stoffen niet vluchtig zijn.

Uit de toxiciteits testen uitgevoerd met *Mysidopsis bahia* kunnen we dezelfde conclusies trekken; de toxiciteit wordt voornamelijk veroorzaakt door ammonia. Een gedeelte van de toxiciteit wordt veroorzaakt door niet vluchtige organische stoffen en/of metalen.

De conclusies van de toxiciteits testen zijn dus hetzelfde voor beide testorganismen. *Mysidopsis bahia* bleek echter veel gevoeliger dan *Corophium volutator*. Maar voor de uitkomst van deze TIE maakt het niet uit welk testorganismen gebruikt wordt, omdat beide testorganismen gevoelig zijn voor soortgelijke stoffen.

Het is wel wenselijk verder onderzoek uit te voeren om de werkelijke toxische groep stoffen aan te wijzen. Uit de chemische analyses van het sediment M16 (bijlage VI) en de chemische analyses van het poriewater (bijlage VII) blijkt dat dit verontreinigd is met metalen maar gezien er maar weinig organische stoffen zijn gemeten bestaat er een mogelijkheid dat deze ook toxische effecten kunnen veroorzaken.

De test met *Corophium volutator* is eenvoudig uit te voeren, het is een makkelijk organisme om mee te werken, om te houden in het laboratoria en te verzamelen. De test met *Mysidopsis bahia* is ook eenvoudig uit te voeren maar het dier is wat lastiger te houden en mee te werken omdat deze drie maal per etmaal gevoerd moet worden met *artemia* nauplii. Het is ook moeilijk plannen met *Mysidopsis bahia* omdat deze soort geleverd moet worden door een derde, in tegenstelling tot *Corophium volutator* welke verzameld kan worden in het veld. Het inbrengen van een extra instelling kan voor extra fouten, vertragingen en mislukkingen leiden wat vervelend is gezien het vele werk een TIE procedure met zich meebrengt.

Literatuurlijst

- Aquasense (1995a)** De toxiciteit van ammonia, nitriet en sulfide voor *Corophium* en *Echinocardium* o.i.v. het zuurstofgehalte en de pH. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee. Rapportnr.: 95.0565. 47p.
- Aquasense (1995b)** Beoordeling van zoute baggerspeciemonsters met behulp van bio-assays, IMPLETO II. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee. Rapportnr.: 95.0815.
- Bryant, V., Newbery, D.M., McLusky, D.S., Campbell, R.** (1985) Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to two estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*). Marine Ecology Progress Series, Vol 24, 139-153.
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Morrison, G.E.** (1993) Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Guidance document phase I (Draft). 70p.
- Clark, J.R., Borthwick, P.W., Goodman, L.R., Patrick, J.M.Jr, Loes, E.M., Moore, J.C.** (1987) Comparison of laboratory toxicity test results with responses of estuarine animals exposed to Fenthion in the field. Environmental Toxicology & Chemistry, 6, 151-160.
- Ciarelli, S.** (1994) Guideline for conducting 10-day static sediment toxicity tests using marine or estuarine amphipods. RIKZ Internal report, RIKZ-94.031. 17pp.
- Ciarelli, S., Vonck, W.A.P.M.A., van Straalen, N.M.** (1995) Reproducibility of spiked-sediment bio-assays using the marine benthic amphipod, *Corophium volutator*. Submitted to Marine Environmental Research.
- Gerringa, L.J.A., Rijstenbil, J.W., Poortvliet, T.C.W., van Drie, J., Schot, M.E.** (1995) Speciation of copper and responses of the marine diatom *Ditylum brightwellii* upon increasing copper concentrations. Aquatic Toxicology, 31, 77-90.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V.** (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science & Technology, 11, 714-719. Correction 12, 417-422 (1978).

- Hannewijk, A.** (1995) Onderzoek naar de seizoensinvloed op standaard toxiciteitstesten met de slijkgarnaal (*Corophium volutator*). In de periode augustus 1994 tot en met oktober 1995. NIOO-CEMO/ RIKZ 40p.
- Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F.** (1993) Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the "workshop on sediment toxicity assesment" held from 8-10 November 1993 at Renesse, the Netherlands. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe) 105p.
- Kester, D.R.** (1986) Equilibrium Models in Seawater: Applications and Limitations. In: Berhard, M., Brinckman, F.E., Sadler, P.J. (editors) The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes, Dahlem Konferenzen. Springer Verlag Berlin, ISBN 3-540-15362-4. 763p, pp 337-363.
- Lide, D.R.** (Editor in Chief)(1992) Handbook of chemistry and physics, 73rd edition (1992-1993). CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-0473-3.
- Lussier, S.M., Gentile, J.H., Walker, J.** (1985) Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (Crustacea: Mysidacea). Aquatic Toxicology 7, 25-35.
- Makings, P.** (1977) A guide to the British Coastal Mysidacea. Field Studies, 4, 575-595.
- McLusky, D.S.** (1967) Some effects of salinity on the survival, moulting and growth of *Corophium volutator*. Journal of Marine Biology Association of the U.K., 47, 607-617.
- Morisson, G.M.P., Batley, G.E., Florence, T.M.** (1989) Metal speciation and toxicity. Chemistry in Britain August 1989, 791-796.
- Norberg-King, T.J., Mount, D.I., Amato, J.R., Jensen, D.A., Thompson, J.A.** (1992) Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I. United States Environmental Protection Agency. EPA/600/6-91/005F. 50p

- Schot, M.E. (1995)** Influence of salinity on the bioavailability of heavy metals from sediments: A risk assessment approach. RIKZ, internal report RIKZ\OS-95.061, 150p.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1988)** *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 5th edition, Saunders College Publishing, New York. ISBN 0-03-14828-6. 830p
- Smith, R.M., Martell, A.E. (1981)** *Critical Stability Constants. Volume 4: Inorganic Complexes*. Plenum Press, New York. pp 87.
- TNO, Gerritsen, A.A.M., Bowmer, C.T., Henzen, L., Kauffman-van Bommel, H. (1995)** Toxiciteit van 36 zoutwater sedimenten in 3 toxiciteitstoetsen. TNO-Delft, TNO-Rapport V95.516. 23p.
- Widdows, J. (1993)** Marine and Estuarine Invertebrate Toxicity Tests. In: Calow, P. (editor) *Handbook of Ecotoxicology*, volume one. Blackwell Scientific Publications, Oxford. ISBN 0-632-03573-0, 600p, pp 145-163.

