

januari 2001

Biotesten, een bruikbaar instrument voor de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewater?



ing. E.J.M. Penders, WRK, Nieuwegein
dr. W. Hoogenboezem, PWN, Haarlem

januari 2001

Biotesten, een bruikbaar instrument voor de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewater?

Auteurs

ing. E.J.M. Penders, WRK, Nieuwegein
dr. W. Hoogenboezem, PWN, Haarlem

Eindredactie

Projectgroep 'Inventarisatie en evaluatie van
biotests voor waterkwaliteitsbewaking'

dr. W. Hoogenboezem, PWN, Haarlem (voorzitter)
ing. E.J.M. Penders, WRK, Nieuwegein (secretaris)
mevr. H. Maas, RIZA, Lelystad
drs. D. de Zwart en dr. A. Sterkenburg, RIVM, Bilthoven
dr. H. Witters, VITO, Mol
drs. M.N. Mons, Kiwa, Nieuwegein
dr. P.G.M. Stoks, WRK, Nieuwegein
drs. J. Postma, AquaSense, Amsterdam
drs. Y. Dullemond, GWA, Amsterdam
drs. H.A.M. Ketelaars, WBB, Werkendam
ir. A. Visser, DZH, Den Haag
ir. L.R.M. de Poorter, Koeman en Bijkerk bv, Haren

Uitgever

Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA

Inhoudsopgave

AFKORTINGEN.....	4
VOORWOORD.....	5
SAMENVATTING.....	6
SUMMARY	8
1. INLEIDING	10
2. SAMENSTELLING TESTBATTERIJ BIOTESTS MET CONCENTRERINGSTECHNIEKEN	12
2.1. WELKE BIOTESTEN ZIJN ER BESCHIKBAAR?.....	12
2.1.1. <i>Bioassays</i>	12
2.1.2. <i>Genotoxiciteitstesten</i>	12
2.1.3. <i>Werkingsspecifieke biotesten</i>	13
2.2. DE SELECTIECRITERIA VOOR DE SAMENSTELLING VAN EEN TESTBATTERIJ.....	14
2.3. DE SAMENSTELLING VAN DE TESTBATTERIJ.....	15
2.3.1. <i>Bioassays</i>	15
2.3.2. <i>Genotoxiciteitstesten</i>	16
2.3.3. <i>Werkingsspecifieke testen</i>	17
2.4. HET CONCENTREREN VAN DE MONSTERS.....	18
3. BESCHRIJVING VAN DE GEBRUIKTE METHODIEKEN EN DE LOGISTIEK	21
3.1. LOGISTIEK VAN DE MONSTERNEMING EN VERWERKING MONSTERS	21
3.2. BESCHRIJVINGEN VAN DE GEBRUIKTE CONCENTRERINGSTECHNIEKEN	22
3.2.1. <i>Concentratieprocedure voor de bioassays</i>	22
3.2.2. <i>Concentratieprocedure voor de genotoxiciteitstesten</i>	24
3.2.3. <i>Concentratieprocedure voor de ER-Calux</i>	25
3.3. BESCHRIJVINGEN VAN DE GEBRUIKTE BIOASSAYS	25
3.4. BESCHRIJVINGEN VAN DE GEBRUIKTE GENOTOXICITEITSTESTEN.....	27
3.4.1. <i>Beschrijving gebruikte genotoxiciteitstesten Kiwa-onderzoek</i>	28
3.5. BESCHRIJVINGEN VAN DE GEBRUIKTE WERKINGSSPECIFIEKE TESTEN.....	32
3.6. GEBRUIKTE REKENMETHODEN/RESULTATENVERWERKING.....	34
3.6.1. <i>Evaluatie bioassays</i>	34
3.6.2. <i>Evaluatie genotoxiciteitstesten</i>	35
3.6.3. <i>Bepaling van het ecotoxicologisch risico</i>	36
4. RESULTATEN EN ANALYSE	39
4.1. BIOASSAYS.....	39
4.2. GENOTOXICITEITSTESTEN	49
4.2.1. <i>Resultaten genotoxiciteitstesten Kiwa-onderzoek</i>	52
4.3. WERKINGSSPECIFIEKE TESTEN.....	53
5. DISCUSSIE EN CONCLUSIES	55
5.1. BIOASSAYS.....	55
5.1.1. <i>De meest geschikte bioassays voor onderzoek in de Nederlandse rivieren</i>	55
5.1.2. <i>De waterkwaliteit van Rijn en Maas</i>	55
5.2. GENOTOXICITEITSTESTEN	56
5.2.1. <i>De meest geschikte genotoxiciteitstesten voor onderzoek in de Nederlandse rivieren</i>	56
5.2.2. <i>De waterkwaliteit van Rijn en Maas</i>	57
5.3. WERKINGSSPECIFIEKE BIOTESTEN	58
5.3.1 <i>De waterkwaliteit van Rijn en Maas</i>	58
6. AANBEVELINGEN	60
LITERATUUR.....	61
BIJLAGEN	65

Afkortingen

De gebruikte afkortingen zijn in alfabetische volgorde met de betekenis in de onderstaande lijst opgenomen.

AchE	=	Acetylcholineesterase
CLN	=	Confidence Limit
DMSO	=	DiMethylSulfOxide
DZH	=	Duinwaterbedrijf Zuid-Holland
ECf ₅₀	=	Effect Concentratiefactor bij 50% van de ingezette organismen
ERE	=	Estrogen Responsive Element
ER	=	Estrogen Receptor
EEQ	=	Estradiol Equivalenten
GW	=	Gemeentewaterleidingen Amsterdam
HPLC	=	hogedrukvlloeistofchromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)
IVM	=	Instituut voor Milieuvraagstukken
LCf ₅₀	=	Letale Concentratiefactor bij 50% van de ingezette organismen
LOECf	=	Lowest Observed Effect Concentration factor
NOEC	=	No Observed Effect Concentration
NECf	=	No Effect Concentration factor
pT	=	Toxic potency
PAF	=	Potentially Affected Fraction
PAM	=	Puls-Amplitude-Modulatie
PCA	=	Principal Component Analysis
PTFE	=	Polytetrafluorethyleen
PWN	=	N.V. PWN Waterleidingbedrijf Noord-Holland
RIVM	=	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
RIWA	=	Vereniging van Rivierwaterbedrijven
RIZA	=	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling
TMoA	=	Toxic Mode of Action
VITO	=	Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek
WBB	=	N.V. Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch
WRK	=	N.V. Watertransportmaatschappij Rijn-Kennemerland
XAD	=	Kunsthars met een macroreticulaire structuur op basis van styreen en divinylbenzeen

Voorwoord

De menselijke samenleving produceert duizenden stoffen voor de meest uiteenlopende doeleinden. In de jaren zestig werd duidelijk dat teveel van deze verbindingen in het oppervlaktewater terecht kwamen met ernstige gevolgen voor de planten en dieren die in dat water leefden. Een ernstige verstoring van het aquatisch milieu was het gevolg, zo ernstig dat watervlooiën die met onverdund rivierwater in contact werden gebracht, binnen enkele minuten stierven! Sinds de jaren 70 is de waterkwaliteit van de Rijn en in mindere mate van de Maas geleidelijk aan verbeterd. De gehalten van met chemische technieken meetbare verbindingen zijn, mede dankzij regelgeving en overleg met de industrie, aanzienlijk teruggedrongen. Er zijn echter allerlei verbindingen die met de huidige meetapparatuur niet bepaald kunnen worden. Daarnaast is de vertaling naar de betekenis van de aanwezigheid van allerlei meetbare stoffen voor de organismen in het water is moeilijk en nog lastiger is de vertaling naar mogelijke gevolgen voor de consument van het drinkwater dat van het oppervlaktewater wordt geproduceerd.

Voor een aantal individuele verbindingen is de betekenis wel bekend, maar de concentraties die in het oppervlaktewater worden gemeten zijn thans laag en het is vaak niet duidelijk of die lage concentraties nog gevaren opleveren. Ook is vaak niet duidelijk of gelijktijdige belasting met verschillende stoffen een groter risico oplevert dan de individuele verbindingen afzonderlijk teweeg zouden brengen, een verschijnsel dat men synergie noemt. Omdat de betekenis van bekende en onbekende verontreinigingen uiteindelijk vertaald moet worden naar effecten op organismen is het beter een zogenaamde effectgerichte meting te hanteren. Met behulp van biotesten wordt direct gemeten of er effecten op organismen zijn. In dit soort testen kunnen alle aanwezige verbindingen een rol spelen, ook die verbindingen die met de huidige chemisch analytische technieken niet bepaald kunnen worden. Verschillende verbindingen kunnen verschillende effecten op organismen hebben. Sommige stoffen beschadigen het erfelijk materiaal van een organisme terwijl andere stoffen enzymatische processen in de cel verstoren. Om die reden is het nodig een batterij van biotesten te gebruiken voor de beoordeling van het te onderzoeken water. Deze benadering is vergeleken met chemische analyses weliswaar directer, maar lost toch nog niet alle vragen op. Een belangrijke vraag is bijvoorbeeld hoe een waargenomen effect op een bacterie of een watervlo naar risico's voor de mens vertaald moet worden.

Uit het bovenstaande blijkt wel dat effectgerichte metingen een ingewikkeld vraagstuk is, waarvoor een veelzijdige aanpak nodig is. De RIWA-projectgroep Biotesten kan zich gelukkig prijzen met het samenwerkingsverband dat voor dit project is gevormd. Dankzij de inbreng en medewerking van instituten zoals RIVM, RIZA, AquaSense, VITO, Kiwa, Koeman en Bijkerk en een aantal waterleidingbedrijven (GW, WRK, PWN, WBB, DZH) is het mogelijk geweest dit onderzoek uit te voeren, de verkregen gegevens te interpreteren en het rapport samen te stellen. Door de meetprogramma's van de verschillende deelnemers goed op elkaar af te stemmen is het gelukt een aantal extra biotesten in het programma op te nemen. Op die wijze zijn waardevolle gegevens verzameld die ieder instituut afzonderlijk niet had kunnen verkrijgen.

Er is voor gekozen dat twee auteurs de eindversie van het rapport hebben geschreven maar dit is gebeurd met gegevens, interpretaties en hulp van alle leden van de werkgroep.

Wim Hoogenboezem (Projectleider RIWA-werkgroep Biotesten)

Samenvatting

Inleiding

Als aanvulling op het reguliere RIWA-meetnet heeft RIWA de behoefte om de directe effecten van verontreinigingen in de Rijn en Maas op organismen te toetsen. Om de bruikbaarheid van biotesten na te gaan, is een batterij biotesten onderzocht op twee monsterpunten in de rivieren Maas (Eijsden) en Rijn (Lobith). Het onderzoek (1998-1999) werd als een gezamenlijk RIWA-project uitgevoerd met: RIVM, RIZA, Kiwa, Vito en een aantal RIWA-lidbedrijven. Elke twee maanden werd een monster genomen van elke rivier, waaruit organische verontreinigingen werden geëxtraheerd door gebruik van XAD-harsen (figuren 1, 2, en 3 pagina's 22-24). De extracten werden getest met de volgende batterij testen (tabel 2, pagina 17):

- Bioassays (concentratiefactor 1000 *): Microtox[®], Microtiterplaatstest met twee algensoorten, de PAM-algentest, de Rotoxkit, Thamnotoxkit, de Daphnia IQ test
- Genotoxiciteitstesten (concentratiefactor 25000 *): Ames-test, UMU-test, VITOTOX[®], en twee komeettesten.
- Werkingsspecifieke testen: Acetylcholine-esterase remming (concentratiefactor: 1000 *), ER-Calux-test (concentratiefactor: 10000-100000 *)

Bioassays

De resultaten van dit onderzoek wijzen uit, dat vrijwel uitsluitend de sterker geconcentreerde monsters een positief resultaat gaven (tabel 6, pagina 39). De test met de sterkste respons verschilde nogal per monster. De evaluatie van alle meetresultaten laat zien dat de verschillende testen slechts weinig onderling overlappende informatie opleverde (figuur 14, pagina 44), en geeft hiermee de noodzaak van het gebruik van een testbatterij duidelijk aan. De meest geschikte bioassays voor onderzoek in de Nederlandse rivieren lijken te zijn: Microtox[®], Microtiterplaatstest met één algensoort, de PAM-algentest, Thamnotoxkit en de Daphnia IQ test. De Rotoxkit vertoonde alleen in monsters met een hogere concentratiefactor soms een reactie, voor de contaminanten aanwezig in Rijn en Maas lijkt deze test minder geschikt. De algemene toxiciteit van de Rijn is volgens deze testen lager dan de Maas (figuren 11, 12, en 13 pagina's 42-43). Het concentratiegebied, waarin positieve monsters werden bevonden, varieerde meer in de Maas, hetgeen een minder constante waterkwaliteit impliceert. Gebaseerd op het ecotoxicologisch risico/toxische druk model van het RIVM, zijn twee monsters van de Maas (september 1998 en juni 1999) toxisch te noemen (tabel 9, pagina 45). Op basis van chemische metingen en de berekende 'Toxic Units', zijn er zes relevante organische verbindingen in de Maas gevonden. Hoewel het gemiddelde gehalte van deze verbindingen lager dan 0,1 µg/l is dragen ze voor een aanzienlijk deel bij aan de verklaarbare toxiciteit van het Maaswater (tabel 12, pagina 48). Het type effect dat deze verbindingen kunnen uitoefenen op organismen is voornamelijk gericht op de fotosynthese met daarnaast mogelijk een neurotoxisch effect.

Uit de bepaling van de Combi-pT (tabel 10, pagina 46), waarmee de ecotoxicologische kwaliteit van de rivieren voor alle soorten organismen via resultaten van bioassays wordt weergegeven, blijkt dat de Maas ongeveer 7,5 maal toxischer is dan de Rijn. De relatie tussen de pT-waarden (toxische druk via metingen uit bioassays) en de PAF-waarden (toxische druk via chemische metingen) is niet aanwezig (figuur 15, pagina 46). Dit blijkt vooral uit het sterk afwijkende punt waarbij een hoge PAF-waarde niet correspondeert met de bij behorende pT-waarde, waarmee de meerwaarde voor het gebruik van biotests extra wordt benadrukt. Aanpassing van het gebruikte model voor de berekening van de toxische druk/ecotoxicologisch risico wordt dan ook aanbevolen. Om het pT-model aan te vullen

met gegevens uit genotoxiciteitstesten, is onderzoek gewenst voor het verkrijgen van een combinatie-eindparameter van bioassays en genotoxiciteitstesten. Het voorspellen van de toxische druk uit chemische metingen via modellen is op dit moment niet mogelijk, daar de biotesten de effecten weergeven die het gevolg zijn van vaak zeer complexe interacties tussen chemische stoffen met de organismen. Vandaar de meerwaarde om de biotesten (minimaal 1 test per trofisch niveau) te gebruiken voor het bepalen van de kwaliteit van oppervlaktewater.

Genotoxiciteitstesten

Met betrekking tot de genotoxiciteitstesten, toonde de Ames-test het meest frequent mutagene activiteit aan (tabel 13 & 14, pagina 49). Deze test geeft ook de beste dosis-respons curven met de duidelijkste resultaten en valt hiermee nog steeds te verkiezen boven de overige genotoxiciteitstesten. Gebruik van de VITOTOX[®]-test en de UMU-test leverde minder vaak positieve resultaten. De waarden waarbij met deze twee testen een respons werd verkregen lagen vaak in de buurt van de detectiegrens. Bovendien is gebleken dat bij de laatstgenoemde testen de hoeveelheid extractiemiddel in het testmedium laag gehouden moest worden vanwege storende toxiciteitproblemen bij de test-organismen. Bruikbare resultaten werden verkregen met twee additionele testen: SOS-Chromotest en de Mutatox-test. De Mutatox-test kon bij relatief lage concentratiefactor een genetisch respons genereren. Voor het gebruik van de komeetttest, zijn er nog geen eenduidige criteria vastgelegd om tot een goede evaluatie te komen. Als gevolg van minder betrouwbare resultaten van een aantal genotoxiciteitstesten, is verificatie van het kwaliteitsbeeld dat de Ames-test genereert nog noodzakelijk in een vervolgonderzoek. Bovendien is het van belang in toekomstig genotoxiciteitsonderzoek te trachten mogelijke relaties tussen gedetecteerde toxicanten en risico's voor de mens in beschouwing te nemen.

De Rijn heeft een significant hoger niveau van genotoxiciteit dan de Maas (tabel 15, pagina 50), wanneer puntmutaties (b.v. Ames-test) en de activatie van het SOS-DNA reparatiesysteem (b.v. VITOTOX[®]) worden beschouwd. Wanneer men chromosoombeschadigingen (komeetttest) in beschouwing neemt, scoort de Maas weer hoger dan de Rijn. Een verklaring voor dit opmerkelijk verschil kan (nog) niet worden gegeven.

Werkings specifieke testen

Met betrekking tot de werkings specifieke testen, bevat de Rijn gemiddeld gezien 2 keer minder choline-esteraseremmers dan de Maas (figuur 18, pagina 53). Bovendien blijkt deze parameter in de Maas veel sterker te variëren.

Uit de effectmeting naar het voorkomen van stoffen met oestrogene activiteit met behulp van ER-Calux-test (figuur 19, pagina 54) bleek dat slechts één monster van de Maas (september 1998) een duidelijk verhoogde activiteit vertoonde.

Summary

Introduction

In addition to the regular RIWA monitoring network, a more effect oriented approach to measure the water quality is needed. To test the suitability of bioassays, a battery of tests has been used on water samples from one location on the River Rhine and one at the River Meuse. This investigation (1998-1999) was performed as a joint project of RIWA with: RIVM, RIZA, Kiwa, Vito and several RIWA-associates. Every two months, a sample was taken from each river, from which organic micro-pollutants were extracted using XAD resins (figures 1, 2 and 3, page 22-24). These extracts were tested by the following battery of tests (table 2, page 17):

- General bioassays (concentration factor 1000*): Microtox[®], Microtiterplate test with two strains of algae, the PAM algae test, the Rotoxkit, Thamnotoxkit, Daphnia IQ test.
- Genotoxicitytests (concentration factor 25000*): Ames test, UMU test, VITOTOX[®], and two Comet assays.
- Effect specific test: Acetylcholine-esterase (concentration factor 1000*), ER-Calux assay (concentration factor: 10000-100000*)

Bioassays

This investigation showed that only stronger concentrated samples had a positive effect (table 6, page 39). The bioassay with the strongest response differed from sample to sample. Evaluation of all the measurements presents little overlap in information (figure 14, page 44), thus clearly demonstrating the need to use a test battery. The bioassays most suited for research on Dutch rivers are: Microtox[®], Microtiterplate test with only one strain of algae, PAM algae test, Thamnotoxkit and Daphnia IQ test. The Rotoxkit gave a response only in samples with a high concentrationfactor. For the level of contaminants present in the rivers Rhine and Meuse, this test is not suitable. The general toxicity of the River Rhine was lower than the River Meuse (figures 11, 12 and 13, page 42-43). The range of concentrationfactors, in which positive samples were obtained, varied more in the River Meuse, implying a less constant water quality. Based on the Ecotoxicological risk/toxic pressure model of RIVM, two samples of the river Meuse (September 1998 and June 1999) were considered as toxic (table 9, page 45). Using chemical measurements and the calculated 'Toxic Units', six organic compounds were found in the River Meuse. Although the mean concentration of these compounds was below 0.1 µg/l, they contribute significantly to the toxicity of water from the Meuse (table 12, page 48). The type of effect these compounds can exercise, is mainly on the photosynthetic pathways next to a possible neurotoxic effect.

By estimating the Combi-pT (table 10, page 46), which presents (via results from the bioassays) the ecotoxicological quality of the rivers for all organisms, the toxic response of the River Meuse was 7.5 times stronger than the River Rhine. The relationship between the pT-values (toxic pressure via bioassays) and PAF-values (toxic pressure via chemical analysis) is not present (figure 15, page 46). The strongly diverged point in the graph, in which the high PAF-value did not correspond with the accompanied pT-value, stresses the added value of using biotests. Modification of the model is therefore recommended. To supplement this pT-model with values from genotoxicity tests, research is needed to obtain a combination end result of bioassays and genotoxicity tests. At the moment, predicting the toxic pressure from analytic chemical measurements via models is not possible due to the very

complex interactions between chemicals with organisms (as an effect measured by biotests). Using biotests for measuring the quality of surface water (1 test for each trophic level), thus provides important additional information.

Genotoxicity tests

With respect to the genotoxicity tests, the Ames test frequently showed mutagenetic activity (table 13 and 14, page 49). This test also did produce the best dose-response curves and the best results and is herewith the most suitable genotoxicity test compared to the other genotoxicity tests applied in this study. Using the VITOTOX[®] and UMU test, less positive results were obtained. The values, in which a response was observed, were close to the level of detection. Moreover, in these tests, the level of extraction solution had to be minimized to prevent toxic effects on the used test organisms. Usefull results could be obtained from two additional test: the SOS-Chromo test and the Mutatox test. The Mutatox test could generate a genetic respons by relatively low concentration factor. No unambiguous characteristic is at the moment available for a good evaluation of the results from the Comet assays. As a result of less reliable measurements of a number of genotoxicity tests, verification of the quality produced by the Ames-test is required. In addition, in future research using genotoxicity tests, possible relations between detected toxic compounds and risc's for the human should be considered. The River Rhine has a significantly higher level of genotoxic activity than the River Meuse (table 15, page 50), when point mutations (i.e. Ames-test) and activation of the SOS-DNA repair system (i.e. VITOTOX[®]) are considered. Using chromosomal damage as an endpoint (Comet assay), the River Meuse shows more genotoxic response than the River Rhine.

Effect specific tests

Using mean values from effect specific tests, the concentration of acetylcholine-esterase inhibiting compounds in the River Rhine is twice that of the River Meuse (figure 18, page 53). Besides, this parameter strongly fluctuates in the River Meuse. Using effect measurements related to the oestrogenic activity (ER-Calux-test)(figure 19, page 54), one sample of the River Meuse displayed a significant higher level.

1. Inleiding

Als aanvulling op het reguliere meetprogramma heeft RIWA de behoefte om naast chemische, fysische en biologische parameters ook biotesten in het meetprogramma op te nemen. In 1994 heeft RIWA een uitvoerige studie verricht naar de toxicologische gesteldheid van de Rijn (De Noij & Meerkerk, 1995). Ten behoeve van dat onderzoek werden monsters genomen uit een groot deel van het Rijnstroomgebied en o.a. getest m.b.v. enkele biotesten. Tevens werd een studie gedaan naar de samenstelling van de insectenfauna op diverse locaties. Daarnaast wordt door RIWA al geruime tijd onderzoek gedaan naar de mate van mutageniteit in het Rijn- en Maaswater, met behulp van de Ames-test. Ondanks, dat de meetbare vervuilinglast in de Maas vaak hoger is dan die van de Rijn, wordt met deze test een hogere mutageniteit van het Rijnwater gevonden (o.a. Veenendaal & Van Genderen, 1997). Verder is er voor de stroomgebieden van beide grote rivieren een aantal studies uitgevoerd naar welke stoffen nader onderzoek behoeven (Van Genderen & Noordsij, 1998), en een aantal stofstudies o.a. over biociden (Groshart & Balk, 1998) en xeno-oestrogenen (Denneman *et al.*, 1998).

Biotesten zijn experimenten waarmee effecten van verontreinigingen op organismen zichtbaar gemaakt kunnen worden. In biotesten worden organismen of delen daarvan (b.v. bacteriën, algen, dieren, celcultures of weefsels) aan het te onderzoeken water, of een concentraat daarvan, blootgesteld, waarna reacties van de proeforganismen (b.v. vermindering van de activiteit, reproductie, groei of zelfs sterfte) worden geregistreerd, die worden vergeleken met eventuele reacties waargenomen in controle-testen. Het gebruik van biotesten is in vergelijking met de gebruikelijke chemische bepalingen waardevoller, omdat eventuele effecten op organismen of delen hiervan direct zichtbaar gemaakt worden. Op deze manier kunnen ook effecten worden gemeten van verbindingen of mengsels van verbindingen die niet of onvoldoende nauwkeurig bepaald kunnen worden.

Als er op een bepaalde plaats bij herhaling belangrijke effecten worden gemeten met een of een aantal biotesten kan het van belang zijn om de oorzaak van die effecten op te sporen. Immers pas als bekend is welke verbinding dat effect veroorzaakt, kan men trachten de bron ervan op te sporen. Alleen dan is het mogelijk de oorzaak weg te nemen en daarmee de waterkwaliteit te verbeteren.

De ervaring met biotesten tot nu toe heeft geleerd dat het nodig is voor watermonsters verschillende biotesten tegelijk te gebruiken. Dergelijke batterijen zijn nodig omdat verschillende stoffen verschillende werkingsmechanismen kunnen hebben. Zo zijn er verbindingen die enzymatische reacties beïnvloeden en weer andere leiden tot beschadiging van het erfelijk materiaal. Dergelijke verschillen maken het noodzakelijk een testbatterij te gebruiken. Daarom wordt aangeraden een batterij samen te stellen uit testen die gebruik maken van organismen uit allerlei verschillende hoofdgroepen en functies in het ecosysteem (trofische niveau's). Zo'n batterij bevat dan testen met bacteriën, dierlijke en plantaardige organismen en bij voorkeur ook gewervelde dieren, of cellen of weefsels daarvan.

De werkgroep is in 1997 gestart met een inventarisatie van mogelijk bruikbare testen. De volgende randvoorwaarden bij de keuze van de te gebruiken testen zijn gebruikt:

1. Het dienen (breedspectrum)testen te zijn waarmee al goede resultaten zijn behaald, dus geen testen die nog in ontwikkeling zijn, of zich nog in een experimenteel stadium bevinden.
2. Bij voorkeur die testen gebruiken die geen concentratie behoeven voor het onderzoek in de Nederlandse rivieren.
3. Het moeten betrekkelijk eenvoudige laboratoriumtesten zijn zodat ze gemakkelijk en relatief goedkoop kunnen worden uitgevoerd.

Ten aanzien van het gebruik van concentratietechnieken bleek al snel dat er naar verwachting geen testen beschikbaar zijn die zonder concentratie gebruikt zouden kunnen worden. Randvoorwaarde 2 is daarom vervallen. Ten behoeve van dit project is een evaluatie gemaakt van de beschikbare concentratie-technieken waarbij de voor- en nadelen van elke techniek kort zijn weergegeven (zie tabel 3).

In het tweede gedeelte van dit project zijn de genoemde testen uitgetest op een monsterpunt in zowel Maas als Rijn. De resultaten van dit onderzoek worden in dit rapport besproken en geëvalueerd, waarbij een antwoord op de volgende vragen is gegeven.

1. Welke biotesten zijn het meest geschikt voor onderzoek in de Nederlandse rivieren?
2. Met welke testbatterij kan het best gemeten worden?
3. Waar kan het best worden gemeten en met welke frequentie?
4. Is er op grond van de nu verzamelde gegevens al iets te zeggen over de waterkwaliteit van Rijn en Maas?
5. Is er verschil tussen beide rivieren meetbaar?
6. Varieert de toxiciteit gedurende het seizoen?

De resultaten zijn simultaan geëvalueerd, o.a. met behulp van principal component analysis (PCA). Hiermee is nagegaan in hoeverre de verschillende testen dezelfde of verschillende toxische componenten detecteren. Tevens zijn alle resultaten onderworpen aan een analyse van ecotoxicologische risico's. Met deze analyse kunnen alle afzonderlijke testen objectief worden vergeleken en kan een uitspraak worden gedaan over de toxicologische gesteldheid van beide rivieren.

In het kader van het gezamenlijk onderzoek van de waterleidingbedrijven werd in 1998 bij Kiwa een onderzoek gestart waarin een aantal genotoxiciteitstesten werden vergeleken. Omdat dit onderzoek deels overlapt met het onderzoek van deze RIWA-projectgroep, is bij Kiwa besloten hun onderzoek een deel te laten zijn van dit onderzoeksprogramma.

2. Samenstelling testbatterij biotests met concentreringstechnieken

2.1. Welke biotesten zijn er beschikbaar?

De bepaling van de toxiciteit van een watermonster is mogelijk door gebruik van biotesten gericht op algemene effecten op cellen of organismen (de bioassays), specifiek op verandering van het DNA (genotoxiciteitstesten) en/of specifiek op een bepaald effect (werkings specifieke testen). In de volgende paragrafen wordt beschreven, welke biotesten voor onderzoek op oppervlaktewater beschikbaar zijn.

2.1.1. *Bioassays*

In de huidige praktijk worden vrij veel bioassays toegepast voor het onderzoek van oppervlaktewater, industriële effluenten en voor het toetsen van de toxiciteit van individuele verbindingen. Meestal worden bij het onderzoek drie groepen van testorganismen gebruikt (bacteriën als destruenten, algen als producenten en watervlooien of andere meercellige dierlijke organismen als consumenten) om een breed beeld te krijgen omtrent de toxiciteit van het monster. Een aantal van deze bioassays is inmiddels gestandaardiseerd. De testen worden regelmatig aangepast (door gebruik van andere testorganismen) en nieuwe ontwikkelingen (verbeteringen in hanteerbaarheid) zijn er frequent. In een testbatterij worden bioassays gekozen uit de drie genoemde trofische niveau's. Omdat er nogal veel verschillende testen zijn en de gevoeligheid van die testen meestal onvoldoende omschreven is, blijkt het samenstellen van een betrouwbare en gevoelige combinatie niet eenvoudig.

2.1.2. *Genotoxiciteitstesten*

Een van de eerste beschikbare genotoxiciteitstests is de welbekende Ames-test (Maron & Ames, 1983). Deze test wordt wereldwijd als standaard test (OECD471) gebruikt voor het bepalen van de mutageniteit van monsters uit verschillende matrices. De test is echter bewerkelijk en tijdrovend, zodat al snel in universiteiten/instellingen werd gezocht naar een bruikbaar alternatief voor deze test. Op dit moment zijn er snellere genotoxiciteitstesten te vinden, die daarnaast meer informatie kunnen geven omtrent de aard van de afwijkingen in het gen/chromosoom. Een selectie is vermeld in tabel 1. Veel van de nieuw ontwikkelde testen maken gebruik van hetzelfde mechanisme, waardoor de verscheidenheid aan testen kleiner is dan het lijkt. Hoewel er nu verschillende genotoxiciteitstesten zijn ontwikkeld, zijn er slechts enkele testen beschikbaar, die gestandaardiseerd of commercieel verkrijgbaar zijn.

Tabel 1: Een selectie van beschikbare genotoxiciteitstesten.

Genotoxiciteitstest	Responstijd	Opmerking
Ames	3 dagen	**
Mutachromo Plate test	5 dagen	**
Ames fluctuatie test	2 dagen	**
Mutatox test	1 dag	
Microsome rec-assay	1 dag	
UMU-test	4 uur	*
VITOTOX ^(®)	4 uur	*
SOS chromotest	1 dag	*
SCE-test	3 dagen	
Komeettest	2 uur	Test op andere celmaterialen mogelijk

* = SOS respons na DNA schade (verklaring zie pagina 17)

** = Soort bacterie gelijk

2.1.3. *Werkingspecifieke biotesten*

Bij een aantal stoffen van niet natuurlijke oorsprong is het werkingsmechanisme op cellen van dieren, mensen en planten bekend (Berndt, 1995). Door het meten van de remming van enzymen of door het meten van de activatie/blokking van receptoren t.b.v. bepaalde reacties in het metabolisme, kan men de hoeveelheid van deze stoffen (meestal in de vorm van het aantal equivalenten van een bekende remmer/activator) in het monster vaststellen. In het verleden zijn werkingspecifieke testen om de kwaliteit van het oppervlaktewater te bepalen zelden uitgevoerd.

2. De selectiecriteria voor de samenstelling van een testbatterij

De volgende selectiecriteria zijn gehanteerd:

- De test dient eenvoudig toepasbaar te zijn voor een regulier meetnet.
De biotest moet eenvoudig door de analist na enige training uit te voeren zijn in een 'water' laboratorium. De resultaten uit de biotest dienen eenduidig te zijn.
- Kortdurend.
Om veranderingen in het toetsmedium gedurende de blootstellingstijd zo veel mogelijk te minimaliseren, heeft een kortdurende toets de voorkeur.
- Klein volume toetsmedium.
Vanwege het feit dat de toxiciteit wordt gemeten in geconcentreerde monsters, waarbij het extract volume zeer klein is, dienen de testen uitgevoerd te kunnen worden met een zeer klein volume (enkele milliliters) aan testmedium.
- Lage kosten.
Omdat op meerdere locaties met een batterij van tests gemeten zal worden, verdienen goedkope tests, met vergelijkbare resultaten, de voorkeur.
- Standaardiseerbaar.
De testen moeten uitgevoerd worden volgens (inter)nationaal gestandaardiseerde richtlijnen of volgens duidelijke richtlijnen van de leverancier.
- Gevoeligheid.
De gevoeligste testen zijn gekozen van de beschikbare biotesten. Verder zijn verschillende detectiemechanismen en trofische niveau's bij de selectie betrokken.

2.3. De samenstelling van de testbatterij

2.3.1. *Bioassays*

Het vermogen van een stof om schade of een vergiftiging te veroorzaken is afhankelijk van de aard van de stof, de dosis, de duur van de blootstelling en de route waarlangs de stof wordt opgenomen in het lichaam. Met behulp van bioassays is het mogelijk vast te stellen of het oppervlaktewater verbindingen of combinaties van verschillende verbindingen bevat die een toxische werking hebben op organismen in het oppervlaktewater. Hierbij is het mogelijk dat verschillende verbindingen op verschillende celonderdelen (enzymen, receptoren, DNA) hun nadelige werking kunnen uitoefenen, dat als gezamenlijk effect, sterfte van het organisme tot gevolg kan hebben. Bij het samenstellen van bioassays met organismen uit verschillende trofische niveau's is het mogelijk vast te stellen of er verbindingen in het monster zijn die een werking hebben op een specifieke groep van aangrijppunten (targets) (bijvoorbeeld de enzymen betrokken bij de fotosynthese bij gebruik van algen als testorganismen). In dit project werd gekozen voor drie bioassays met algen als testorganismen (producenten), drie bioassays met ongewervelde testorganismen (consumenten) en de enige bioassay met een bacterie als testorganisme (destruent) (tabel 2, pagina 18). Doordat gewerkt werd met concentraten met kleine volumina, werden voor een aantal testen microtiterplaten gebruikt (voor 2 testen met algen en ongewervelden). Het feit dat bij de microtiterplaten testen alleen sterfte of groeiremming waar te nemen is, waarbij een relatief lange incubatietijd noodzakelijk is, zijn er ook twee testen (de PAM en de Daphnia IQ) meegenomen die een subleetaal effect kunnen weergeven met een wezenlijk kortere incubatietijd. Door het gebruik van drie testen bij de algen en ongewervelden is het mogelijk vast te stellen wat de gevoeligste testen zijn. Omdat van de destruenten alleen de Microtox[®] beschikbaar was, kon voor deze groep van organismen geen vergelijking van de gevoeligste test worden gedaan.

Alle gekozen bioassays zijn acute toxiciteitstesten, die het schadelijk effect van verbindingen laten zien in een kort tijdsbestek (binnen 72 uur). Chronische testen, waarbij effecten op langere termijn kunnen worden vastgesteld, werden niet in dit project meegenomen, vanwege het feit dat deze een complexe uitvoering en hoge kosten vergen. Chronische effecten zijn vaak het gevolg van de aanwezigheid van verbindingen in zeer lage concentraties waarvan hun nadelige werking pas na langere tijd kan worden aangetoond. Door het gebruik van concentratietechnieken is het mogelijk met acute bioassays vast te stellen of een belangrijk deel van deze verbindingen in het te onderzoeken water aanwezig zijn.

2.3.2. Genotoxiciteitstesten

Genotoxiciteitstesten tonen de aanwezigheid van verbindingen aan, die een effect hebben op het DNA (zie tabel 2). De aanwezigheid van bepaalde verbindingen in de cel kan leiden tot een verandering van het DNA (mutatie) die irreversibel is en tot uiting kan komen in het blootgestelde organisme of zelfs pas in de volgende generaties. Er zijn verschillende typen mutaties:

- Puntmutaties: Hierbij verandert een basepaar in het DNA. Puntmutaties kunnen het resultaat zijn van fouten tijdens de replicatie van het DNA, recombinatie of reparatie. Bij puntmutaties wordt een ander aminozuur in een eiwitketen ingebouwd, waardoor er een kans bestaat dat het gewenste enzym of eiwit niet meer goed functioneert.
- Frameshiftmutaties: Dit type mutatie vindt plaats indien een basepaar of een aantal baseparen worden verwijderd of toegevoegd aan het DNA. Vanwege het feit dat een code voor een aminozuur bestaat uit een sequentie van 3 baseparen (tripletten), leidt een verwijdering of toevoeging van een basepaar tot de vorming van een geheel ander eiwit, dat meestal niet meer functioneel is voor de cel.
- Deletiemutaties: Hierbij worden duizenden baseparen en mogelijk vele genen uit het DNA verwijderd.
- Inversiemutaties: Soms vindt er een inversie van een DNA sequentie plaats, waardoor alle genen in deze regio in de tegengestelde richting zijn georiënteerd.
- Duplicatiemutaties: In een duplicatie mutatie, wordt een sequentie gekopieerd van de ene regio van het DNA naar een andere regio.
- Insertiemutaties: Insertie mutaties worden veroorzaakt door toevoeging van een groot DNA deel in een genregio.

Een groot percentage van alle spontane mutaties zijn de frameshiftmutaties. Gebruik van de Ames-test met stam TA98, toont de aanwezigheid van stoffen die frameshiftmutaties veroorzaken. Omdat het Nederlandse oppervlaktewater al enige jaren m.b.v. de Ames-test wordt gemonitord, is deze test als referentie in de testbatterij opgenomen.

De cel heeft een groot aantal mechanismen beschikbaar om de schade aan het DNA als gevolg van de aanwezigheid van mutagene verbindingen te repareren. In de testbatterij zijn de VITOTOX[®]- en de UMU-test opgenomen, die specifiek de inductie van het SOS reparatiemechanisme (als gevolg van ernstige DNA schade door mutagene stoffen) detecteren. Voor detectie van DNA enkel- en dubbelstrengbreuken als ook de alkali-labiele plaatsen in het DNA, wordt de Komeetttest ingezet. Alkali-labiele plaatsen in het DNA zijn 'kwetsbare' delen van het DNA, die onder alkalische omstandigheden tot breuken in het DNA leiden, die nog niet als zodanig aanwezig waren en vermoedelijk in een afwijking zullen resulteren. Hierbij zijn twee verschillende testen ingezet, een test waarbij humane lymfocyten blootgesteld worden aan het extract en een test waarbij *Daphnia* cellen worden blootgesteld aan het extract. Bovenstaande genotoxiciteitstesten werden ook uitgevoerd op een monster waaraan een hoeveelheid lever-extract (S9-preparaat) werd toegevoegd. Het S9-preparaat bevat een aantal leverenzymen die (een deel van) het metabolisme in een zoogdier simuleren. Dit preparaat kan laten zien dat bepaalde mutagene verbindingen geïnactiveerd worden of dat omzettingen in de lever juist kunnen leiden tot de vorming van genotoxische verbindingen.

2.3.3. Werkingspecifieke testen

Gebruik van de werkingsspecifieke acetylcholine-esterase test geeft de aanwezigheid van organofosfaat (inclusief thiofosfaten) en carbamaatpesticiden in extracten van oppervlaktewater weer. De ER-Calux wordt gebruikt om specifiek stoffen te detecteren die het hormonenstelsel in dieren en mensen kunnen verstoren.

Tabel 2: De gekozen biotesten voor het meetprogramma.

Biotest	Voorschrift	Blootstellingsduur	Benodigd volume [@] (ml)	Kosten per analyse [#] (Euro)
<u>Bioassays</u>				
Microplate algentest (Raphidocelis sp./Scenedesmus sp.)	DIN 38412	72 uur	5	180,-
PAM algentest (Selenastrum sp.)	Huisvoorschrift RIVM	4,5 uur	3	250,-
Microtox [®]	NVN 6516	30 minuten	3	250,-
Rotokit F	Handleiding leverancier	24 uur	2.5	200,-
Thamnotokit F	Handleiding Leverancier	24 uur	4	200,-
Daphnia IQ test	Handleiding leverancier	1,25 uur	10	250,-
<u>Genotoxiciteitstesten</u>				
Ames-test	Huisvoorschrift KIWA	72 uur	2	355,-
UMU-test	DIN 38415	2,5 uur	3	155,-
VITOTOX [®]	Huisvoorschrift VITO	4 uur	3	140,-
Komeetttest	Huisvoorschrift VITO	2 uur	3	250,-
<u>Werkingspecifieke biotesten</u>				
AchE-remming	Huisvoorschrift GWA	15-20 minuten	5-10	115,-
ER-Calux	Huisvoorschrift LU Wageningen	24 uur	1 liter oppervlakte- water	340,-

Legenda: # = geschatte kosten per analyse, exclusief het concentreren van oppervlaktewater

geschatte kosten voor concentreren van monster voor bioassays/werkingspecifieke testen Euro 4300,- per monster

geschatte kosten voor concentreren van monster voor genotoxiciteitstesten Euro 2700,- per monster

@= volume berust op gebruik van 1000 voudig geconcentreerde monsters

Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de testen, wordt verwezen naar paragraaf 3.1.

2.4. Het concentreren van de monsters

Om een trend van toxiciteit te kunnen vaststellen en een goed vergelijkbare effectparameter (L(E)Cf50-waarde met behulp van een verdunningsreeks) te kunnen verkrijgen, is het noodzakelijk de monsters voor de bioassays te concentreren tot een factor 1000. Bij de Ames-test is het noodzakelijk het watermonster 25000 keer te concentreren. Om de resultaten van de andere genotoxiciteitstesten (UMU-test, Komeetest, VITOTOX[®]) enigszins te kunnen vergelijken met de Ames-test, zijn alle genotoxiciteitstesten uitgevoerd op hetzelfde concentraat. Door de lage concentratie aan oestrogene stoffen in oppervlaktewater (pg/l) is het voor het gebruik van de ER-Calux noodzakelijk gebleken de monsters eveneens te concentreren.

Het gebruik van concentratietechnieken wordt bij chemische analyses als geruime tijd toegepast om verbindingen te detecteren. Concentratietechnieken t.b.v. biotesten dienen aan bepaalde voorwaarden te voldoen omdat ze gebruikt worden in testen met levende organismen(delen). Tabel 3 geeft een overzicht van de beschikbare concentratie/isolatie technieken weer met de soort stoffen die de techniek isoleert/concentreert en de voordelen en nadelen t.a.v. het gebruik van de techniek voor biotesten.

Tabel 3: Beschikbare concentratietechnieken t.b.v. biotesten.

(D. de Zwart, persoonlijke mededeling)

	Hulpstoffen	Soort stoffen	Voordelen	Nadelen
Isolatie van contaminanten d.m.v. adsorptie/elutie: Vaste fase extractie gevolgd door elutie met oplosmiddel				
XAD 2/4/8 [#]	Elutiemiddelen: Aceton, DMSO of ethanol/methanol	Organische verbindingen met uiteenlopende polariteit en hydrofobiteit	Breed spectrum w.o. "moderne toxicanten"; goed "model" voor biologisch werkzame stoffen; uitputtingsextractie mogelijk; binding is in hoge mate reversibel; humeuze verbindingen worden maar zeer gedeeltelijk meegeconcentreerd (te polair)	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water; kosten verschoning XAD
Polyurethaanschuim	Elutiemiddelen: Hexaan, e.d.	Hydrofobe organische verbindingen met lage polariteit		Batchverschillen in materiaal; soms verontreinigingen in materiaal & zie XAD
Siliciumdioxide (SiO ₂) [#]	Elutiemiddelen: Aceton, ethanol/methanol	Hydrofiele organische verbindingen met hoge polariteit	Snel	Onbekende affiniteit met lage beladingsgraad; geen uitputtings-extractie mogelijk & zie XAD
Aktieve kool [#]	Elutiemiddelen: Organische oplosmiddelen	Onbekend spectrum organische verbindingen	Organische lipofiele microverontreinigingen worden zeer goed gebonden	Recovery laag door deel irreversibele binding & zie XAD; vaak veel onzuiverheden aanwezig
Chelex	Elutiemiddelen: Zuren/zouten	Metaalionen	Selectief voor zware metalen	Zoutlast in toxtest

	Hulpstoffen	Soort stoffen	Voordelen	Nadelen
Isolatie van contaminanten d.m.v. partitie: Vaste fase extractie gevolgd door elutie met oplosmiddel				
C18 [#]	Elutiemiddelen: Hexaan, cyclohexaan	Hydrofobe organische verbindingen	Reversibele uitputtingsextractie mogelijk	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water. Humuszuren komen mee met extractie
Isolatie van contaminanten d.m.v. partitie: Vloeistof/vloeistof extractie				
Hexaan/water [#]	Toegepast oplosmiddel	Hydrofobe organische verbindingen	Uitputtingsextractie mogelijk	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water.
Cyclohexaan/water [#]	Toegepast oplosmiddel	Hydrofobe organische verbindingen	Uitputtingsextractie mogelijk	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water.
MeCl/water [#]	Toegepast oplosmiddel	Minder hydrofobe organische verbindingen	Uitputtingsextractie mogelijk	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water.
etc. bijv. octanol [#]	Toegepast oplosmiddel	Over het algemeen sterk hydrofobe organische verbindingen	Uitputtingsextractie mogelijk	Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water.
Verwijdering van water				
Vriesdrogen [#]	Geen	Alle niet vluchtige verbindingen	Weinig selectief	
Uitvriezen	Geen	Alle verbindingen	Weinig selectief	
Reverse osmose/hyperfiltratie [#]	Geen	Alle verbindingen met minimum-molecuulgrootte	Weinig selectief	
Dialyse: Concentrerend van stoffen d.m.v. dialyse				
Dialysemembraan	Dialysemiddelen: water, hexaan, dichloormethaan, etc.	Alle verbindingen met een minimum-molecuulgrootte	Reversibele uitputtingsreactie mogelijk	Zeer lange tijdsduur voordat evenwicht is ingesteld. Verliezen bij vervanging/verwijdering toxisch elutiemiddel door water

= In het verleden zijn bij het voormalige RID deze technieken uitprobeerde, waarbij bleek dat de XAD-techniek in termen van geconcentreerde DOC het minst effectief was, maar in termen van waargenomen toxiciteit het meest effectief.

Voor de genotoxiciteitstesten, bioassays en de AchE-test is gekozen voor de XAD 4/8 concentreringstechniek. De redenen hiervoor zijn:

- Op dit moment de enige techniek waarmee een breed spectrum aan organische stoffen geconcentreerd kan worden.
- Een goed 'model' voor biologisch werkzame stoffen.
- Jaren ervaring en data aanwezig met deze techniek bij het RIVM en Kiwa.
- Gehalten en aanwezigheid aan organische stoffen zijn in het oppervlaktewater zeer variabel i.t.t. de zware metalen en andere zouten.
- Organische stoffen zijn mogelijk de oorzaak van de veranderde (gen)toxiciteit in het water.

T.g.v. het gebruik van deze concentreringstechniek, is het alleen mogelijk een uitspraak te doen omtrent de toxiciteit van de **organische** verbindingen in oppervlakte water. Geen uitspraak is mogelijk t.a.v. de totale toxiciteit van het watermonster (combinatie organische verbindingen met metalen).

Ten behoeve van de ER-Calux is een afzonderlijk en specifieke concentreringstechniek toegepast (zie § 3.2.3.) om contaminatie door verbindingen uit plastics met (xeno)oestrogene eigenschappen te voorkomen. De concentratiefactoren zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: De gebruikte concentratiefactoren bij de verschillende typen biotests.

Soort biotest	Gebruikte concentratiefactor	Zuurgraad bij opwerking
Bioassays en AchE	1000	7
Genotoxiciteitstesten	25000	2 en 7
ER-Calux	10000-100000	7

3. Beschrijving van de gebruikte methodieken en de logistiek

3.1. Logistiek van de monsterneming en verwerking monsters

Als monsterneming lokaties werden Eijsden (Maas) en Lobith (Rijn) genomen, vanwege:

- De beschikbaarheid van een uitgebreid pakket aan chemisch analytische gegevens.
- De toxiciteitstesten van RIVM/RIZA voor 1998/1999 waren voor beide lokaties al gepland.
- Verdere uitbreiding van het aantal monsterpunten is te duur (de opwerking van monster tot extract vormt het grootste deel van het kostenplaatje).
- Historische data van beide lokaties t.a.v. eerdere (gen)toxiciteitsmetingen zijn beschikbaar.

Voor elke bemonstering werd een volume van 100 liter oppervlaktewater naar het RIVM te Bilthoven getransporteerd, waar de concentratie van dit monster binnen 48 uur plaatsvond. Een etmaal voordat de extracten naar de uitvoerende laboratoria werden verstuurd, werd het extract met het gewenste verdunningsmedium op volume gebracht.

Voor de genotoxiciteitstesten werd ter plekke of na transport naar Kiwa Nieuwegein 300 l oppervlaktewater geconcentreerd. Extracten in ethanol werden daarna verstuurd naar de laboratoria.

Het monster (1 liter) voor de ER-Calux werd op de dag van monsterneming naar IVM getransporteerd voor concentratie. Het extract werd onderzocht door de Landbouwwuniversiteit Wageningen. Een aparte monsternemingsprocedure werd bij deze test uitgevoerd, om contaminatie met (xeno)oestrogene verbindingen uit de apparatuur te voorkomen.

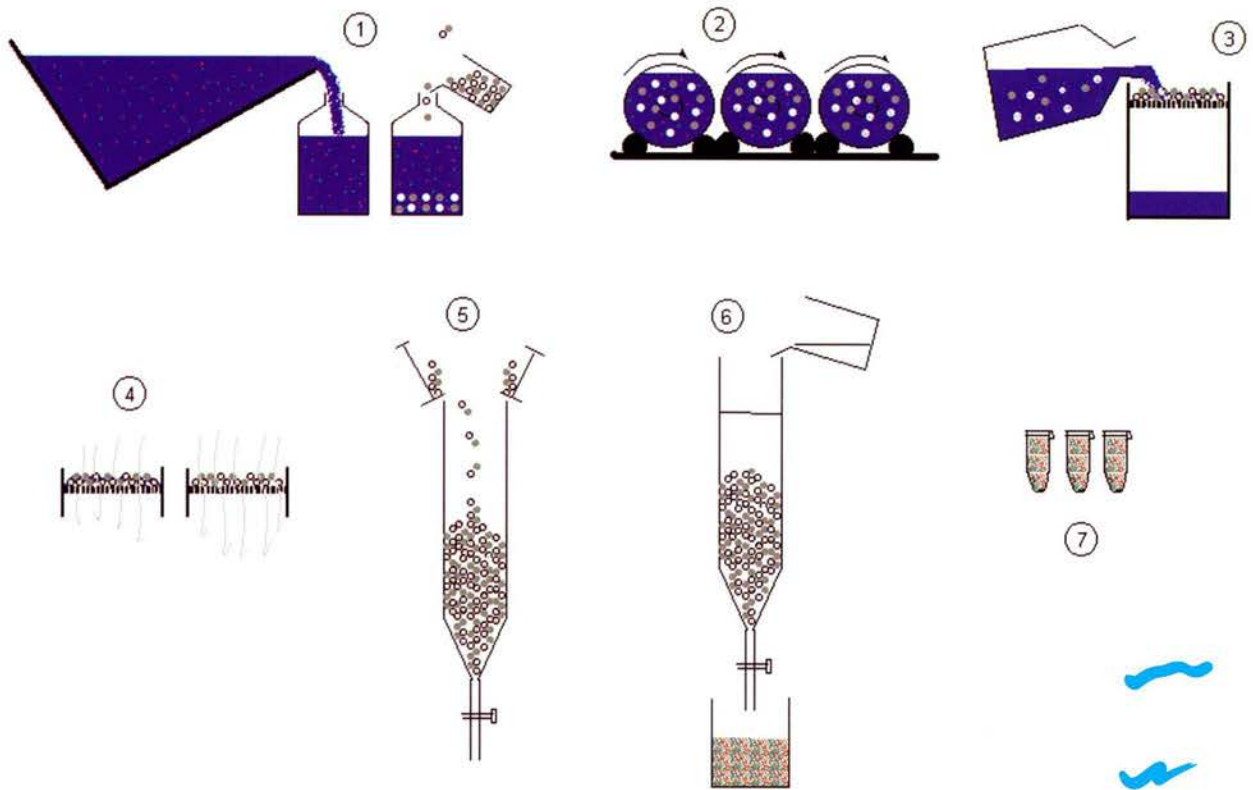
Tabel 5: Monsternemingsdata van het biotestprogramma 1998-1999 met monstercodes.

Datum	Monstercode	
	Maas	Rijn
juli 1998	Eijs9804	Lob9804
september 1998	Eijs9805	Lob9805
november 1998	Eijs9806	Lob9806
februari 1999	Eijs9901	Lob9901
april 1999	Eijs9902	Lob9902
juni 1999	Eijs9903	Lob9903

3.2. Beschrijvingen van de gebruikte concentreringstechnieken

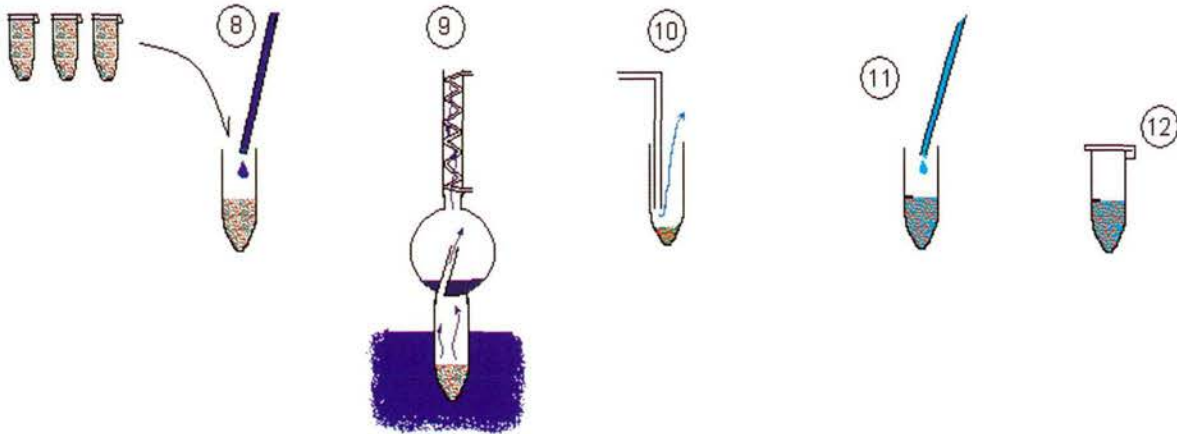
3.2.1. Concentratieprocedure voor de bioassays

De gebruikte XAD-4 (Rohm & Haas, Antwerpen) en XAD-8 (DAX-8, Supleco) harsen werden grondig gezuiverd voordat deze gebruikt werden voor het concentreren van de monsters (RIVM, 1998). Met behulp van deze harsen worden apolaire of zwak polaire componenten geïsoleerd. Binnen 48 uur na monsterneming werd het niet-gefilterde monster overgebracht naar 10 l borosilicaat flessen, waaraan een hars mengsel (verhouding XAD4/XAD8 1:1) werd toegevoegd met een concentratie van 2 ml mengsel per liter water (zie 1, figuur 1). Menging vond plaats door de flessen te rollen gedurende 24 uur bij 20 °C in het donker (2), waarna de harskorrels uit de flessen werden gezeefd (3). De korrels werden gedroogd via een luchtstroom totdat het gewicht van de korrels was gestabiliseerd tot < 6 gram per 20 ml (4). Na het drogen werden de verschillende XAD-batches van 1 monster gemengd en in een elutiekolom gebracht (5), waarna met een bed volume aceton de elutie plaatsvond (6). Het verkregen 500* geconcentreerde concentraat werd verdeeld in 20 ml vials, afgesloten met crimp caps en bewaard bij -20 °C tot verdere verwerking (7).



Figuur 1: Opwerking monster.

Voordat dit concentraat gebruikt kon worden voor de test, werd eerst het acetongehalte van het extract teruggebracht tot $<0.1\%$ (v/v) (zie figuur 2). Hiertoe werd het aceton-concentraat van de 20 ml vial overgebracht naar een konische buis van een Kuderna-Dänisch destillatieopzet, en werd 2 ml mineraal water (Spa Monopole B.V., Spa, België, 'Spa Reine') hieraan toegevoegd (8). Het aceton werd verdampt bij $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (9), totdat de volumereductie en kooksymptomen niet meer plaatvonden. Het residu werd belucht met een stikstofstroom, die precies werd afgesteld tot het gewenste acetongehalte van $<0.1\%$ (v/v) (10). Na stikstofbeluchting werd er verdunningsmedium (type afhankelijk van de te gebruiken test) toegevoegd tot een totaal volume van 10 ml. De concentratiefactor van het waterconcentraat bedroeg hierna 1000 keer (11). Dit waterconcentraat werd bewaard bij $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ totdat de test werd uitgevoerd (binnen 24 uur) (12).

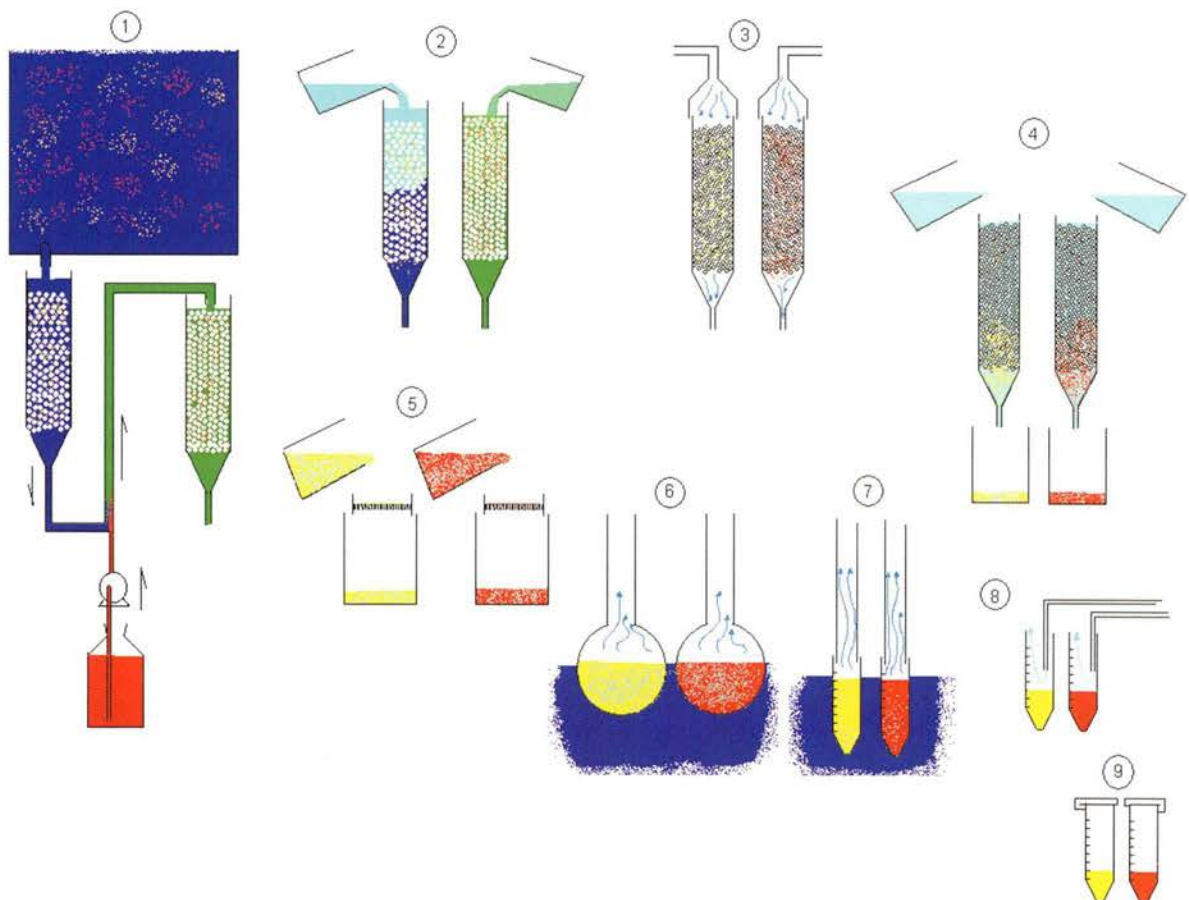


Figuur 2: Opwerking van het concentraat tot een testoplossing.

Als procedure-blanco werd Spa-water gebruikt. De resultaten van de toxiciteitstesten op deze procedure-blanco's staan vermeld in bijlage (tabel B2).

3.2.2. Concentratieprocedure voor de genotoxiciteitstesten

Als hars werd in deze procedure, die ontwikkeld is door Kiwa (Noordsij *et al.*, 1983, 1984), XAD-4 (Amberlite) gebruikt in een kolom met een bedhoogte van 20 cm en een bedvolume van 300 ml. Via een siphon systeem werd het monster (300 liter) uit een reservoir naar de verticale harskolom gevoerd met een snelheid van 1 bed volume per minuut (zie 1, figuur 3). Nadat het neutrale monster (pH=7) uit de eerste kolom werd verkregen, werd dit in-line tot een pH=2 gebracht met zoutzuur, en naar een tweede XAD kolom gevoerd. Beide beladen XAD kolommen werden gespoeld met 10 bedvolumes ultra puur water (bij de zure kolom werd eerst het water tot pH=2 gebracht) (2). Nadat de kolommen gedroogd waren met stikstof (3), vond er elutie plaats met 5 bedvolumes pure ethanol en vijf bedvolumes azeotrofisch mengsel van 30 % puur ethanol in cyclohexaan (4). Bij deze elutie werd het eluaat gefiltreerd over een 0.45 µm PTFE filter, waarmee sporen van bacteriën werden verwijderd (5). Het eluaat van beide fracties werd geconcentreerd tot eerst 250 ml in de eerste stap (6) en daarna tot 15-20 ml in de tweede destillatiestap (7). Bij de tweede destillatiestap werd een gecalibreerde buis gebruikt. Tot slot werd het volume aan extract teruggebracht tot 12 ml door het ethanol verder te verdampen met stikstof, waardoor de uiteindelijke concentratiefactor 25000 keer bedraagt (8). De hoeveelheden extract nodig voor de verschillende genotoxiciteitstesten werden uit deze fractie gehaald (9).



Figuur 3: Opwerking van een monster voor de genotoxiciteitstesten.

3.2.3. Concentratieprocedure voor de ER-Calux

Het water werd bij binnenkomst op het laboratorium gefiltreerd over 1.2 µm en 0.45 µm glasfilters (Whatman, GF/C filters) en geëxtraheerd met een SDB-XC disk (een poly-styreen divinyl benzeen empore disk)(Murk *et al.*, 2000). De stoffen op de disk werden geelueerd met 3 x 5 ml methanol, waarna het extract werd ingedampt en opgenomen in DMSO. Per (maximaal) 1.5 liter werd 1 disk gebruikt. Al het glaswerk wordt vooraf gespoeld met ethanol van HPLC-kwaliteit om achtergrondcontaminatie te voorkomen.

3.3. Beschrijvingen van de gebruikte bioassays

Microplate-algentest

Bij deze test worden algen van de soorten *Raphidocelis subcapitata* en *Scenedesmus subspicatus* toegediend aan een verdunningsreeks van het monster. Tijdens de 72 uur incubatie wordt de populatiegroei gemeten door op verschillende tijdstippen het aantal cellen te bepalen via de cytofluorimeter. Via de verkregen getallen wordt de ECF₅₀ waarde bepaald (zie 3.6.1.), waarbij 50% groeïnhibitie optreedt t.o.v. de controle (yield). Een aantal jaren terug was het alleen mogelijk deze test uit te voeren met erlenmeyers of andere glaswerk, waardoor een grote hoeveelheid monster nodig was. Gebruik van microtiterplaten heeft het mogelijk gemaakt om ook kleine monsterhoeveelheden in te zetten. Er moet echter rekening gehouden worden met het feit, dat adsorptie kan plaatsvinden van organische verontreinigingen aan de wand van deze microtiterplaten.

PAM-algentest

Algen van de soort *Raphidocelis subcapitata* worden toegediend aan een verdunningsreeks, waarna een incubatie van 4.5 uur plaatsvindt onder continue belichting bij 20 °C. Na deze incubatieperiode wordt de fotochemische efficiëntie of de fotonen-opbrengst bepaald met de Puls-Amplitude-Modulatie (PAM) fluorometer (Genty, 1998; Hofstraat, 1994). De fotochemische efficiëntie wordt uitgedrukt als een percentage t.o.v. de controle waarden. De ECF₅₀ waarde wordt bepaald als zijnde de concentratiefactor waarbij 50 % reductie van de fotochemische efficiëntie optreedt.

Microtox[®]

Bij deze test worden gevriesdroogde bacteriën gebruikt van de soort *Vibrio fischeri* en na 1,5 uur reconstitutie (na vriesdrogen weer levensvatbaar maken), toegediend aan een verdunningreeks van het extract. Deze bacteriesoort zendt bij een normaal metabolisme licht uit. Na 5 tot 15 minuten incubatie bij 15 °C, wordt via een luminometer de luminescentie bepaald (Bulich, 1979; Bulich & Isenberg, 1981). Wanneer de bacteriën zich in een toxicologische stresssituatie bevinden, wordt een verlaging van de lichtemissie geconstateerd. Voor de EC₅₀ waarde wordt de laagste concentratiefactor genomen waarbij de licht emissie met 50 % is gereduceerd t.o.v. de blanco. De EC₅₀ waarden en betrouwbaarheidsintervallen werden verkregen via een dosiseffect curve uit een logistiek respons model (Haanstra *et al.*, 1985).

Rotoxkit F

Raderdierjes van de soort *Brachionus calyciflorus* worden gebruikt als testorganisme en worden verkregen wanneer de cysten uit deze kit (Rotoxkit F, Janssen *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1989,1991) geplaatst worden in EPA medium met gedurende 16-18 uur licht. De raderdierjes worden binnen 2 uur toegediend aan een verdunningsreeks van het extract in polystyreen multititerplaten. Na een incubatie gedurende 24 uur in het donker, worden de overlevenden geteld met behulp van een microscoop.

Met behulp van de Spearman-Kärber methode (Hamilton *et al.*, 1977) wordt de LC₅₀ waarde bepaald. Ook hier moet er rekening gehouden worden, dat adsorptie kan plaatsvinden van organische verontreinigingen aan de wand van deze microtiterplaten.

Thamnotoxkit F

Kreeftjes van de soort *Thamnocephalus platyurus* worden gebruikt als testorganisme en worden verkregen wanneer de cysten uit deze kit (Thamnotoxkit F, Centeno *et al.*, 1993) geplaatst worden in medium met gedurende 24 uur licht. Acclimatisatie van deze organismen aan het verdunningsmedium vindt plaats gedurende 4 uur, waarna het extract wordt toegevoegd volgens een bepaald verdunningsschema. De testen worden uitgevoerd in glazen af te sluiten vials. Na 24 uur incubatie in het donker, wordt via de microscoop het aantal levende organismen geteld. Ook hier wordt de LC₅₀ waarde bepaald.

Daphnia IQ test

Niet gevoerde jonge *Daphnia magna*'s (minder dan 24 uur oud) worden blootgesteld aan een verdunningsreeks van het waterextract. Na 1 uur incubatie, wordt er een tracer verbinding toegediend (4- methyl-umbelliferyl-β-D-galactoside) (Daphnia IQ, Aqua Survey Inc., 1993). Na 15 minuten incubatie, wordt de fluorescentie van iedere *Daphnia* m.b.v. UV-licht gemeten. De toxiciteit wordt bepaald uit de remming van de enzymatische splitsing van de galactoside uit de tracer. Hoe minder licht gemeten wordt, hoe toxischer het monster is. Via de verkregen gegevens wordt de EC₅₀ waarde bepaald.

3.4. Beschrijvingen van de gebruikte genotoxiciteitstesten

Ames-test

De Ames genotoxiciteitstest wordt uitgevoerd met gemuteerde *Salmonella typhimurium* bacteriën. Deze mutanten groeien niet op een histidine-vrije voedingsbodem. Alleen individuen, waarbij het histidine-gen door terugmutaties is hersteld door aanwezigheid van een mutagene stof, zijn in staat op dit medium kolonies te vormen (revertanten). Na een incubatietijd van 3 dagen kunnen deze revertanten als kolonies worden geteld. Een monster wordt als mutageen beschouwd wanneer het aantal getelde revertanten per plaat tenminste 2 keer het aantal spontane revertanten bedraagt en indien er sprake is van een dosis-effect relatie. Er kunnen verschillende stammen van de gemuteerde soort *Salmonella typhimurium* gebruikt worden (zoals TA98, TA100, TA1535, TA1538 etc.). Sommige teststammen detecteren basepaar (kleinste stukje DNA) substituties, terwijl andere de verwijdering of toevoeging van een basepaar detecteren. In dit project is de stam TA98 gebruikt, waarmee frameshiftmutaties worden geregistreerd.

UMU-test

Bij de UMU genotoxiciteitstest (Oda *et al.*, 1985; Reifferscheid *et al.*, 1991; Reifferscheid & Heil, 1996) wordt gebruik gemaakt van een gemodificeerde *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 bacterie, waarin een enzymgen (β -galactosidase) gekoppeld is aan het SOS-DNA-herstelsysteem. Bij DNA-beschadiging wordt het SOS-DNA-herstelsysteem geïnduceerd, waarbij tevens productie van het enzym plaatsvindt. Naarmate er meer DNA-beschadiging optreedt, wordt er ook meer β -galactosidase geproduceerd. Na een incubatietijd van anderhalf uur wordt door toediening van het substraat 0-Nitrofenylgalactopyranoside de hoeveelheid geproduceerd enzym bepaald (β -galactosidase vormt een gele kleurstof, die spectrofotometrisch gekwantificeerd kan worden). Voor het vaststellen van de spontane mutaties, wordt de gemeten extinctie gecorrigeerd met de metingen van de blanco. De hoeveelheid gemeten enzymproduct is een maat voor de mutageniteit van het monster. Hierbij wordt rekening gehouden met de groeisnelheid van de teststam. Indien deze te laag is, is het monster eerder toxisch dan mutageen.

VITOTOX[®]

Bij de VITOTOX[®] genotoxiciteitstest (Van der Lelie *et al.*, 1997) wordt gebruik gemaakt van een gemodificeerde *Salmonella typhimurium* bacterie, dat een lux-gen heeft gekoppeld aan het SOS-DNA-herstelsysteem. Ook hier wordt het SOS-DNA-herstelsysteem geïnduceerd wanneer DNA beschadigingen optreden, waarbij nu echter licht wordt geproduceerd. Dit kan direct en continu gemeten worden, waarbij de hoeveelheid geproduceerd licht een maat is voor de mutageniteit van het monster. Via gebruik van een andere teststam wordt nagegaan of het monster eerder toxisch is dan mutageen. Deze stam produceert bij normale condities licht. Wanneer deze stam geen of te weinig licht produceert bij een bepaalde verdunning van het monster en de VITOTOX[®] stam nog geen licht heeft geproduceerd, is het monster eerder toxisch dan genotoxisch.

Komeetest

De komeetest (Tice, 1995), een zeer recente techniek, meet heel andere genetisch eindpunten. De alkalische komeetest, die in dit onderzoek gebruikt is, spoort DNA enkel- en dubbelstrengbreuken op, alsook alkali-labele plaatsen. Alkali-labele plaatsen in het DNA zijn 'kwetsbare' delen van het DNA, die onder alkalische omstandigheden tot breuken in het DNA leiden. Ze zijn nog niet als zodanig aanwezig en zullen vermoedelijk in een afwijking resulteren.

In de komeet test worden cellen (bij VITO worden lymfocyten uit menselijk bloed na een 2 uur blootstellingstijd met het monster gebruikt, bij het RIZA cellen van levende *Daphnia*'s na 48 uur blootstellingstijd) op een microscopglaasje in een gel gelyseerd, om DNA vrij te maken en te denatureren, en onderworpen aan een gelelectroforese. Onder invloed van het aangelegde elektrisch veld zal het DNA een zekere migratie ondergaan, waarbij kleine DNA fragmenten verder migreren dan grotere fragmenten of intacte DNA-okaden. Er ontstaat een "komeetachtige" figuur waarbij de lengte en de inhoud van de komeetstaart een maat zijn voor de DNA schade. Analyse van "kometen" kan na kleuring met een fluorochroom (b.v. ethidiumbromide) met behulp van een fluorescentiemicroscop.

3.4.1. Beschrijving gebruikte genotoxiciteitstesten Kiwa-onderzoek

In het kader van het gezamenlijk onderzoek van de waterleidingbedrijven werd in 1998 bij Kiwa een onderzoek gestart waarin een aantal biotesten werden vergeleken. Het betrof hier een aantal genotoxiciteitstesten. Omdat dit onderzoek deels overlapt met het onderzoek van de RIWA is besloten de krachten te bundelen en is aangesloten bij het onderzoeksprogramma van de projectgroep Biotests van de RIWA.

Het Kiwa-onderzoek had twee doelen:

- onderzoeken welke testen additioneel op de Ames-test zouden moeten worden uitgevoerd, ter verificatie van de resultaten van de Ames-test (additionele genotoxiciteitstesten);
- onderzoeken welke nieuw ontwikkelde testen de Ames-test eventueel zouden kunnen vervangen (alternatieve genotoxiciteitstesten).

Additionele genotoxiciteitstesten

Voor de detectie van genotoxische verbindingen in (drink)water wordt meestal de Ames-test met *Salmonella typhimurium* uitgevoerd. De Gezondheidsraad (1995) stelt echter dat geen enkele genotoxiciteitstest afzonderlijk als voldoende betrouwbaar kan worden beschouwd. Omdat de Ames-test bij het voorspellen van carcinogene effecten een niet te verwaarlozen percentage vals negatieve en vals positieve resultaten geeft, stelt de Gezondheidsraad dat naast de Ames-test ook testen moeten worden uitgevoerd met eukaryotische cellen voor de detectie van genmutaties en chromosoomafwijkingen.

Op basis van het advies van de Gezondheidsraad is voorgesteld om naast de Ames-test een *in vitro* genmutatietest of een *in vitro* cytogenetische test uit te voeren, afhankelijk van de uitslag in de Ames-test.

1. Als de resultaten uit de Ames-test positief zijn dan moeten ze worden bevestigd in een tweede *in vitro* genmutatietest. In dit project is de TK-test met L5178Y mouse lymfoma cellen uitgevoerd.
2. Als de resultaten uit de Ames-test negatief zijn dan moet een *in vitro* chromosoomaberratietest worden uitgevoerd om na te gaan of de stof wellicht chromosoomaberraties veroorzaakt. In dit geval is de chromosoomaberratietest uitgevoerd met humane lymfocyten.

Alternatieve genotoxiciteitstesten

Voor de uitvoering van de Ames-test dienen watermonsters geconcentreerd te worden. Dit kan leiden tot de introductie van artefacten, maar ook is het niet geheel uitgesloten dat relevante verbindingen hierbij kunnen worden verwijderd. Het is dus te prefereren om een genotoxiciteitstest te hebben waarin niet hoeft te worden geconcentreerd. De afgelopen jaren zijn diverse testen ontwikkeld waarbij geclaimd wordt dat het water niet hoeft te worden geconcentreerd en/of dat ze meer informatie geven, of gevoeliger, sneller of eenvoudiger dan de Ames-test zijn. Dit zijn de UMU-test, de VITOTOX[®] test, de SOS-Chromotest, de Mutatox-test en de MutaChromoPlate test. Niet van al deze testen is precies bekend wat de voordelen ten opzichte van de Ames-test zijn en daarom werd aangeraden om deze testen nader te onderzoeken.

In het onderzoeksprogramma van de projectgroep Biotests van de RIWA werden reeds de VITOTOX[®] test en de UMU-test uitgevoerd. Aanvullend hierop heeft Kiwa een *in vitro* genmutatietest (TK-test), een *in vitro* chromosoomaberratietest, de SOS-Chromotest, de Mutatox-test en de MutaChromoPlate-test uitgevoerd.

Vier monsters uit de Rijn zijn onderzocht (juli 1998, september 1998, november 1998 en maart 1999). Dit was telkens de pH 7 fractie van de monsters.

Uitzondering hierop vormen de additionele genotoxiciteitstesten en de SOS-Chromotest. De additionele genotoxiciteitstesten werden uitgevoerd als pilot-experiment en zijn daarom elk op slechts 2 monsters uitgevoerd. In de SOS-Chromotest zijn zowel de pH 2- als de pH 7-fractie zijn getest van monsters uit Rijn en Maas (juli 1998, september 1998, november 1998 en maart 1999).

Genmutatietest met lymphoma cellen van muizen(OECD guideline 476)

Cellen deficiënt in thymidinekinase (TK) zijn resistent voor de cytotoxische effecten van trifluorothymidine (TFT). TFT veroorzaakt een remming van het celmetabolisme en houdt verdere celdeling tegen. In deze test wordt een bekend aantal cellen blootgesteld aan het te onderzoeken monster, zowel met als zonder metabole activatie (S9-mix). Vervolgens worden ze in een medium met TFT gebracht. Gemuteerde cellen zullen in staat zijn om te groeien in de aanwezigheid van TFT, terwijl normale, niet-gemuteerde cellen (die thymidinekinase bevatten), daartoe niet in staat zijn. Cytotoxiciteit wordt vastgesteld door de overleving van de cultures vast te stellen na de behandeling.

Chromosoomaberratie test met humane lymfocyten (OECD guideline 473)

Met de *in vitro* chromosoom aberratie test worden stoffen geïdentificeerd die structurele chromosoomschades veroorzaken in gecultiveerde zoogdiercellen. Celcultures worden blootgesteld aan de stof met en zonder metabole activatie (S9-mix).

Op vastgestelde intervallen na blootstelling aan de teststof worden de celcultures behandeld met een stof die de metafase remt. Vervolgens worden de cellen geoogst, gekleurd en geanalyseerd op de aanwezigheid van chromosoomaberraties.

SOS-Chromotest

De SOS-Chromotest is ontwikkeld door Quillardet *et al.* (1982) als een alternatief voor de Ames-test. De SOS-Chromotest meet de expressie van bepaalde genen die geïnduceerd worden door genotoxische stoffen. Bacteriën zoals *Escherichia coli* hebben een zeer gevoelig enzymstelsel om DNA-schade te detecteren, het SOS-systeem. In de SOS-Chromotest is de *E. coli* stam gemodificeerd en in plaats van de SOS-genen is het gen voor het enzym β -galactosidase ingevoegd achter de SOS-promoter. Op deze manier kan activatie van het SOS-reparatiesysteem door genotoxische stoffen worden gemeten door een fotometrische bepaling van het product dat door β -galactosidase is gevormd uit zetmeel.

MutaChromoPlate test

De MutaChromoPlate test is een aangepaste versie van de Ames-test voor het evalueren van mutageniteit en mutagene potentie van monsters uit het milieu en chemische stoffen. De test maakt gebruik van een (of meer) gemuteerde stam(men) van *Salmonella typhimurium* die mutaties bevat(ten) in het operon dat codeert voor de biosynthese van histidine. Van oudsher wordt de Ames-test uitgevoerd op agar platen. Een alternatieve test die volledig in vloeibaar medium wordt uitgevoerd is de 'Ames fluctuation test' (Le Curieux *et al.*, 1996) die gebaseerd is op meerdere ja/nee gekleurde eindpunten. Dit test principe wordt ook toegepast in de MutaChromoPlate test en een kleurreactie is ook hier het eindpunt waar –in principe– een niet-mutageen monster paars is en een mutageen monster geel kleurt.

Het voordeel van de MutaChromoPlate kit, zoals wordt genoemd door de distributeur, is dat hij gevoeliger zou zijn voor mutagene verbindingen. Dit is voornamelijk gebaseerd op het feit dat een relatief groot volume water kan worden getest in elke well.

De MutaChromoPlate test is uitgevoerd volgens de procedure zoals weergegeven door de producent. Om de test beter vergelijkbaar te maken met de Ames-test is *Salmonella typhimurium* stam TA98 gebruikt in plaats van de aangeleverde stam TA100.

Mutatox

De MutatoxTM test is een relatief nieuwe test (Microbics Corporation, U.S.A.). In deze test wordt gebruik gemaakt van een speciale donker-variant van de luminiserende bacterie *Vibrio fischeri* (M169). Evenals de SOS-Chromotest detecteert deze test DNA-schade.

De bacterie vertoont een toegenomen luminescentie wanneer hij groeit in de aanwezigheid van subletale concentraties van mutagene verbindingen. De mate van luminescentie geeft de relatieve genotoxiciteit van het monster weer. De test wordt uitgevoerd zowel in de af- als in aanwezigheid van S9-mix.

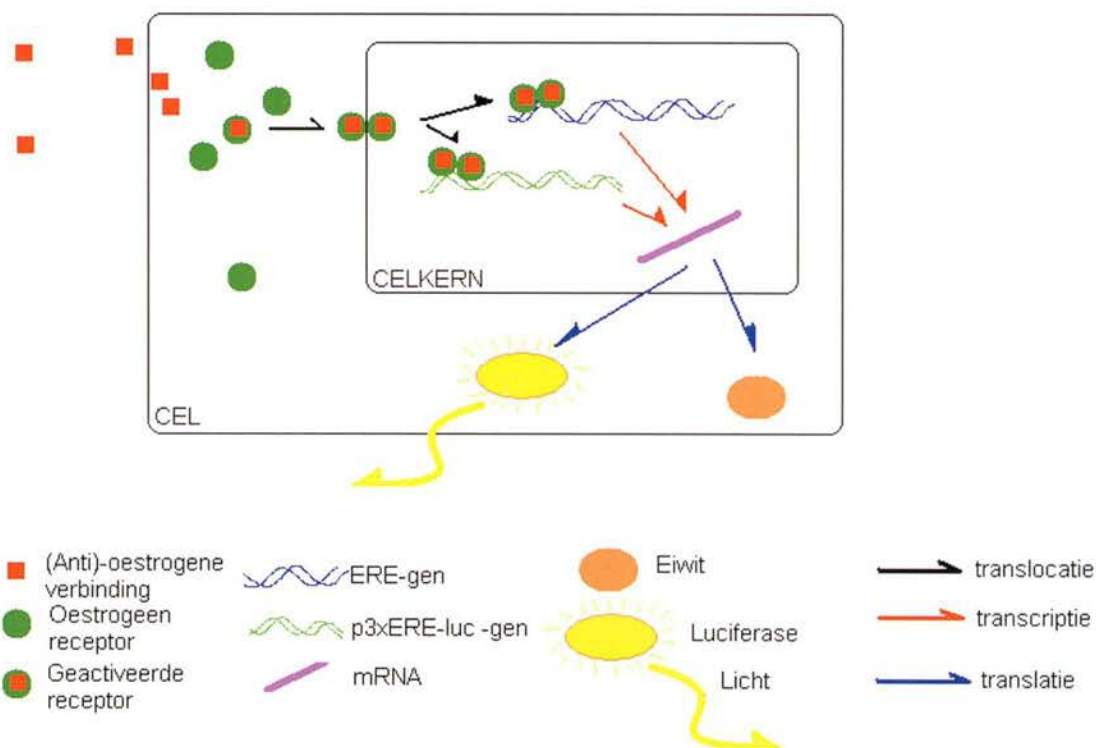
3.5. Beschrijvingen van de gebruikte werkingsspecifieke testen

AchE-remming

Met deze bepaling wordt de remming van de activiteit van het enzym cholinesterase gemeten. Het aandeel van elke remmende verbinding in het monster t.o.v. de totale remming is hierbij afhankelijk van zowel de concentratie als het remmend vermogen van die stof. De extracten en verschillende concentraties aan ethylparathion (standaarden) worden behandeld met broom om zo diverse stoffen in hun "actieve" vorm te krijgen (ethylparathion wordt door broom omgezet in paraoxon). De overmaat aan broom wordt vervolgens door het eiwit albumine gebonden. Aan de behandelde extracten en standaarden wordt het enzym acetylcholinesterase toegevoegd bij 37 °C en na bepaalde tijd het substraat butyrylthiocholinejodide. Het niet geremde enzym zet dit substraat om tot thiocholine. Deze stof wordt gedialyseerd, waarna met het chromogeen (2,2-dinitro-5,5-dithio-dibenzoëzuur) een geel gekleurde verbinding wordt gevormd, die spectrofotometrisch bij 420 nm gemeten kan worden. De hoeveelheid remmende stoffen in het extract wordt uitgedrukt als hoeveelheid paraoxon equivalenten ($\mu\text{g/l}$).

ER-Calux

De ER-Calux assay is gebaseerd op het werkingsmechanisme van oestrogene stoffen (zie figuur 4)



Figuur 4. Schema van ER-receptor gerelateerde effecten en luciferase expressie.

Wanneer (pseudo)oestrogene stoffen uit een concentraat van het oppervlaktewatermonster een cel binnen komen, kunnen deze binden aan de oestrogenreceptor (ER) in het plasma van de cel. Vervolgens wordt de receptor geactiveerd waarna een complex ontstaat van 2 beladen receptoren aan elkaar. Dit complex

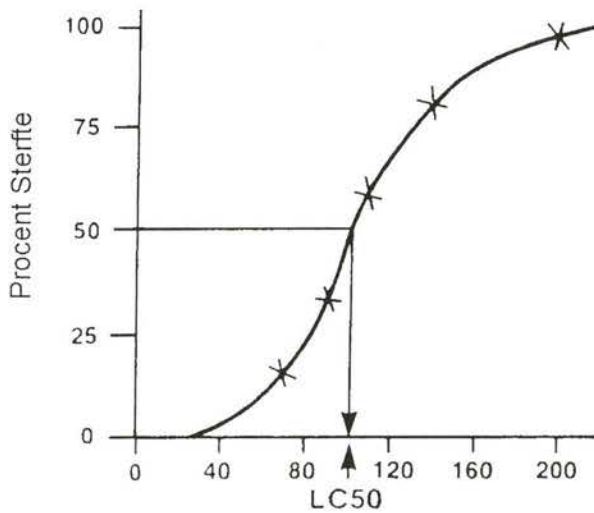
migreert naar de celkern, waar het bindt aan een specifiek stukje DNA, het ERE ('estrogen responsive element') gen. Hierna wordt het aflezen van genen gestimuleerd waardoor uiteindelijk de gehele reactie van een organisme op (pseudo)oestrogene verbindingen uit het concentraat wordt gestuurd. Bij de ER-Calux assay wordt het gehele proces van binding aan de receptor tot en met de activatie van de genen gemeten in een humane borstkankercellijn. Binding aan en activatie van de ER gekoppeld aan een Lux-gen resulteert in dosis gerelateerde vorming van luciferase. Dit luciferase kan eenvoudig gemeten worden met een luminometer.

De respons is een resultante van zowel oestrogene als anti-oestrogene activiteit, d.w.z. in het concentraat kunnen naast oestrogene stoffen ook anti-oestrogene stoffen zitten, die de respons weer onderdrukken. De uiteindelijke respons van de ER-Calux assay wordt uitgedrukt in estradiol equivalenten (EEQ) in $\mu\text{g/l}$. Achtergrond informatie over de ER-Calux assay en de karakteristieken hiervan in vergelijking tot andere assays voor oestrogeniteit zijn te vinden in Legler *et al.* (1999).

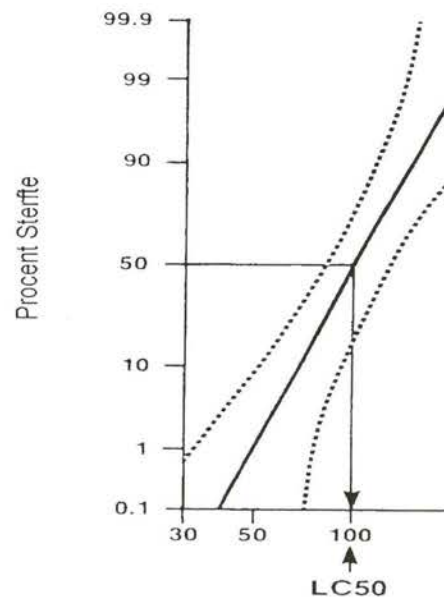
3.6. Gebruikte rekenmethoden/resultatenverwerking

3.6.1. Evaluatie bioassays

In bioassays worden gegevens verzameld in de vorm van het aantal overlevende of dode organismen voor elke blootstellingsconcentratie (Rand, 1995). Deze gegevens leveren een karakteristieke S-vormige (sigmoïde) curve (figuur 5 A). Ieder punt in de curve geeft een gemiddelde cumulatieve respons weer bij een specifieke concentratie, waarbij ieder gemiddelde een geassocieerde variatie heeft ten gevolge van de verschillende reacties van individuele organismen. De minste variabiliteit in de curve (figuur 5 B) is bij het 50% niveau van de respons. De concentratie, waarbij 50 % van de organismen reageert na een specifiek gedefinieerde tijd van blootstelling (bijvoorbeeld 24 of 48 uur) wordt daarom gebruikt als maat voor de activiteit of toxiciteit van een monster.



Figuur 5A: Dosis-response curve
(Uit: Rand, 1995)



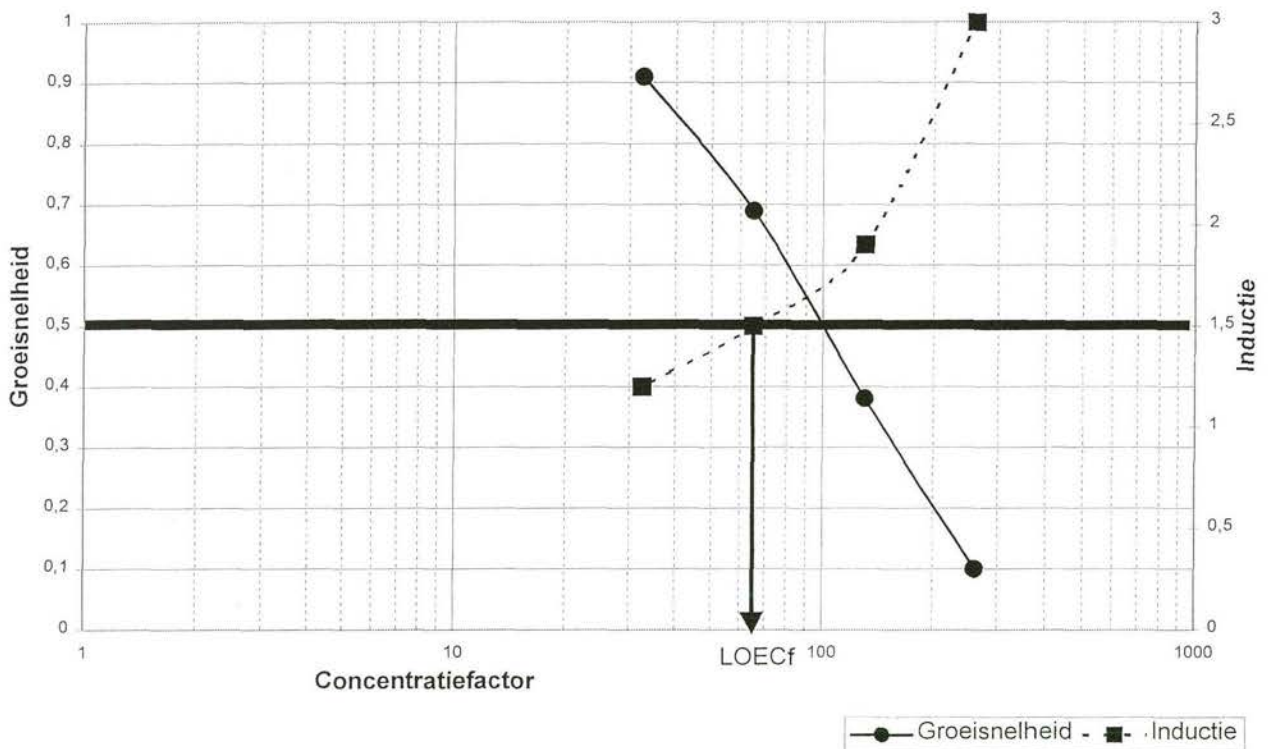
Figuur 5B: Data gelijk aan 5A
De gestippelde lijn geeft 95%
betrouwbaarheidsinterval aan.
(Uit: Rand, 1995).

De LC_{50} -waarde is de concentratiefactor, waarbij 50 % van de test-populatie na een specifieke periode niet meer levend is. De EC_{50} -waarde is de concentratiefactor, waarbij 50 % van de test populatie na een specifieke periode een specifiek effect vertoont (immobiliteit, abnormale ontwikkeling van organismen of abnormaal gedrag). Hoe lager de EC_{50} - of LC_{50} -waarden zijn, hoe toxischer het monster wordt. De

bepaling van de EC_{50} - of LC_{50} -waarden in dit project vindt meestal plaats via de Spearman-Kärber methode (Hamilton *et al.*, 1977) of via het pakket GraphPad.

3.6.2. Evaluatie genotoxiciteitstesten

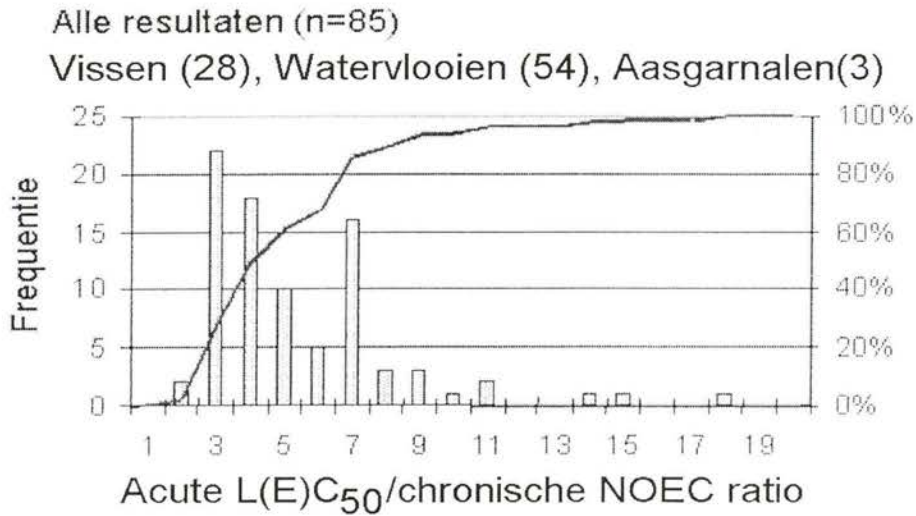
Bij testen, waarbij de te meten en gewenste eindparameter (effect) beïnvloed wordt door een ander ongewenst effect, is het vaak niet mogelijk nauwkeurig een EC_{50} waarde te berekenen. Bij de UMU-test bijvoorbeeld, wordt een additioneel toxisch effect gemeten indien de concentratiefactor te groot wordt. Om toch een uitspraak te kunnen bij welke concentratiefactor b.v. net een genotoxisch effect werd geconstateerd, wordt gebruik gemaakt van de LOECf (Lowest Observed Effect Concentration factor) (zie figuur 6 als voorbeeld).



Figuur 6: Bij de UMU-test wordt de LOECf bepaald wanneer de gestelde eis voor de inductie groter of gelijk is aan de factor 1,5 en waarbij de groeisnelheid groter of gelijk is aan 0,5.

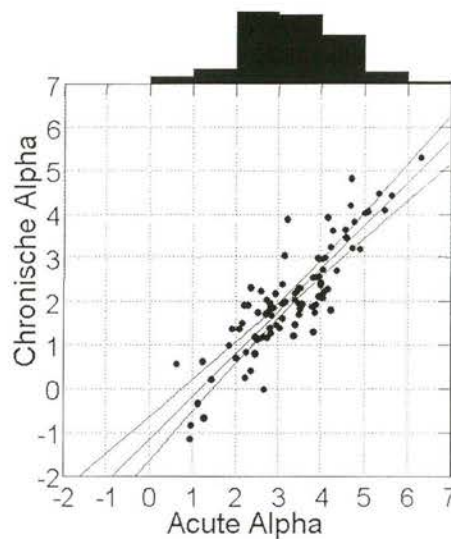
3.6.3. Bepaling van het ecotoxicologisch risico

Met de gebruikte bioassays, waarmee alleen acute effecten gemeten zijn, is het niet direct mogelijk de effecten te schatten van chronische blootstelling. Door vergelijking van de meetresultaten van acute en chronische toxiciteitstesten die uitgevoerd zijn op dezelfde complexe effluënten (US-EPA, 1991), is echter aangetoond dat het verschil in gevoeligheid aanzienlijk minder bedraagt dan een factor 10.



Figuur 7: Acute / chronische toxiciteits ratio is van complexe mengsels chemicaliën in industriële en huishoudelijke afvalwateren (US-EPA, 1991).

Voor individuele contaminanten is door middel van een uitgebreide analyse van internationaal beschikbare toxiciteitsgegevens komen vast te staan dat de over soorten gemiddelde acute L(E)C₅₀ (mediane letale of effect concentratie) ongeveer een factor 10 hoger is dan de over soorten gemiddelde chronische NOEC (no observed effect concentratie) (De Zwart, In press).



Figuur 8: Regressie van chronische en acute alpha waarden van individuele contaminanten (De Zwart, in press). Alpha is gedefinieerd als de over soorten gemiddelde ¹⁰log getransformeerde toxiciteitswaarde.

Op grond van bovenstaande bevindingen wordt op arbitraire gronden aangenomen dat een chronische NECf waarde (no effect concentration factor) kan worden geschat door de gemeten ECf_{50} of LCf_{50} waarden te delen door een factor 10. Volgens De Zwart en Sterkenburg (in press) kan het ecotoxicologisch risico worden geschat door per monster de gevoeligheidsverdeling van een generieke soortenverzameling (SSD: Species Sensitivity Distribution) log-logistisch te fitten op de berekende NECf waarden van de gemeten soorten. De log-logistische gevoeligheidsverdeling is gekenmerkt door slechts twee momenten:

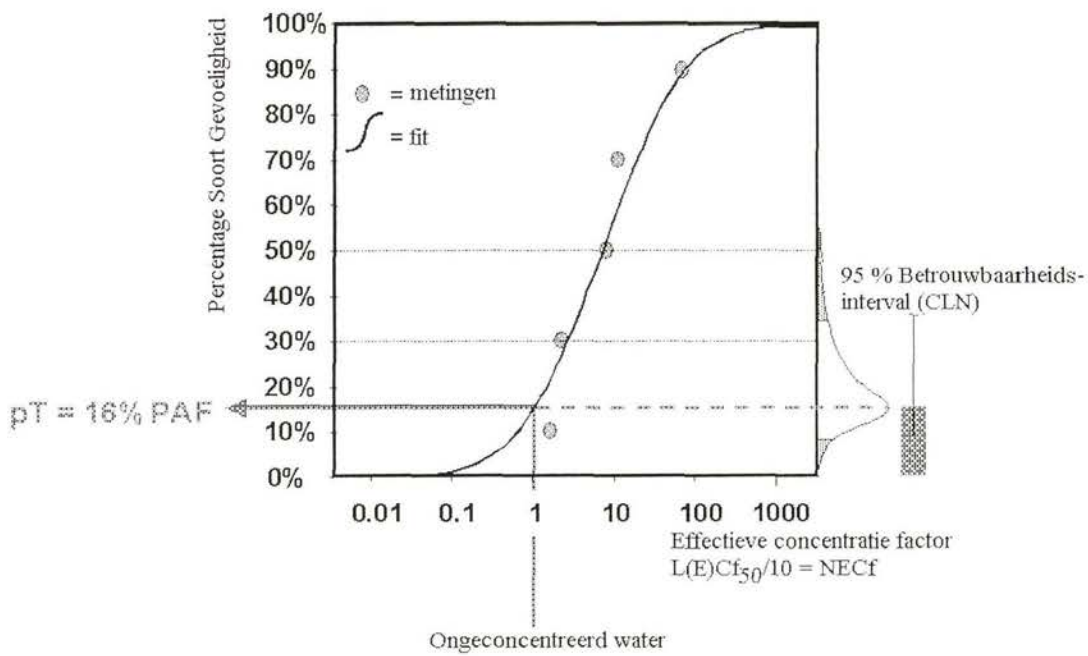
- De α (alpha), ofwel het gemiddelde van de $^{10}\log$ getransformeerde NECf waarden
- De β (beta), ofwel de hellingshoek van de gefitte curve. Beta is evenredig met de standaarddeviatie van de $^{10}\log$ getransformeerde NECf waarden ($\beta = \sqrt{3/\pi} * \text{standaard deviatie}$)

De in figuur 9 weergegeven gefitte SSD kan worden berekend met de formule:

$$F_x = \frac{1}{1 - e^{-\frac{^{10}\log C_f - \alpha}{\beta}}}$$

waarin C_f staat voor de concentratiefactor van het originele monster oppervlaktewater.

Het ecotoxicologisch risico van de in het originele monster oppervlaktewater aanwezige organische contaminanten wordt geschat door voor C_f de factor 1 in te vullen. Het berekende ecotoxicologische risico (pT =Toxic potency uitgedrukt in PAF-eenheden) staat voor de fractie van de aquatische soorten die potentieel is blootgesteld boven de NEC van de aanwezige cocktail aan organische contaminanten (PAF= Potentieel Aangetaste Fractie)



Figuur 9: Bepaling van de pT -waarde via gegevens van de bioassays (Uit: De Zwart en Sterkenburg, in press).

De betrouwbaarheidsintervallen voor de pT-waarden worden verkregen met behulp van een gecompliceerde set statistische formules berustend op de “niet centrale t verdeling” (De Zwart en Sterkenburg, in press). Omwille van de leesbaarheid wordt dit hier niet weergegeven.

pT waarden van verschillende monsterpunten en/of verschillende meetperioden kunnen worden geaggregeerd tot een combi-pT waarde door de individuele pT waarden geometrisch te middelen.

Naast het met behulp van bioassays afgeleide ecotoxicologische risico, wordt ook een ecotoxicologisch risico berekend op basis van de gemeten concentraties aan organische contaminanten. De berekening van het ecotoxicologisch risico op basis van gemeten concentraties berust op hetzelfde gedachtegoed als de bovenstaande SSD-evaluatie, met dien verstande dat de alpha en beta waarden worden verkregen uit laboratorium toxiciteitstesten die uitgevoerd zijn met zuivere stoffen. De berekeningen van het ecotoxicologisch risico zijn beperkt tot de stoffen waarvan een of meer metingen boven de detectielimiet werden verkregen. Binnen deze groep van stoffen werden concentraties beneden de detectielimiet vervangen door een kwart van de detectielimiet. Via een pivot tabel in EXCEL worden de ¹⁰log getransformeerde concentraties over monsterplaats en organische stof gemiddeld. Per component wordt in een tabel (De Zwart, in press) het gemiddelde (acute alpha) van de log getransformeerde L(E)C₅₀ waarden van een veelheid aan verschillende testorganismen opgezocht. Tevens wordt in deze tabel de bijbehorende beta waarde opgezocht, die de spreiding weergeeft van de gevoeligheidsverdeling over soorten. De tabel is geconstrueerd op basis van groot aantal internationaal beschikbare toxiciteitsgegevens. Uit de acute alpha wordt vervolgens de chronische alpha berekend (=acute alpha-1).

De gemeten concentratiewaarden kunnen met behulp van de chronische alpha worden omgezet in Toxic Units (TU):

$$TU_{\text{stof } x} = \frac{\text{concentratie}_{\text{stof } x}}{10^{\alpha_{\text{stof } x}}}$$

De Toxic Units van verschillende stoffen met hetzelfde werkingsmechanisme (TMoA=Toxic Mode of Action) worden opgeteld (ΣTU_{TMoA}). Stoffen met eenzelfde TMoA blijken een min of meer gelijke beta waarde te hebben. Per type effect wordt 1-PAF bepaald door:

$$1 - \text{PAF}_{\text{TMoA}} = 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{10 \log \sum TU_{\text{TMoA}}}{\text{gem. } \beta}}}$$

Door vermenigvuldiging van de 1-PAF waarden voor verschillende werkingsmechanismen wordt de 1-CombiPAF berekend. Per monsterplaats wordt hieruit de Combi-PAF bepaald.

4. Resultaten en analyse

Een gedetailleerd overzicht van alle resultaten die verkregen werden met de genotoxiciteitstesten, bioassays en werkingsspecifieke testen, staan beschreven in de bijlage (tabel B1 tot en met B3). In dit hoofdstuk worden de resultaten van de testen met elkaar vergeleken.

4.1. Bioassays

Van de bioassays werden de resultaten verdeeld in drie concentratiefactorgebieden: $1 \leq EC_{50} < 10$; $10 \leq EC_{50} < 100$ en $100 \leq EC_{50} < 1000$ (tabel 6). Per concentratiefactorgebied werd het aantal positieve responsen per test bepaald, waarmee aangetoond kan worden welke testen het meest gevoelig zijn.

Tabel 6: Bepaling aantal toxiciteitstesten per concentratiefactorgebied

Toxiciteitstest	Gebruikte afkorting	Aantal resultaten $1 \leq EC_{50} < 10$	Aantal resultaten $10 \leq EC_{50} < 100$	Aantal resultaten $100 \leq EC_{50} < 1000$
Daphnia IQ	DIQ	0	7	5
Thamnotoxkit	ThTox	0	8	4
Rotokit	RoTox	0	0	12
Scenedesmus sp. MTP	ScenALG	0	11	1
Raphidocelis sp. MTP	RaphALG	0	12	0
PAM- algentest	PAMALG	1	9	2
Microtox [®]	MTX	1	7	4

Alleen de PAM-algentest en de Microtox[®] test blijken een reactie te geven in het minst geconcentreerde monster. De meeste testen geven positieve reacties in het concentratiefactorgebied $10 \leq EC_{50} < 100$. De Rotokit is de enige test, die alleen respons geeft op monsters die meer dan een factor 100 zijn geconcentreerd en is hiermee waarschijnlijk de minst gevoelige test van de batterij.

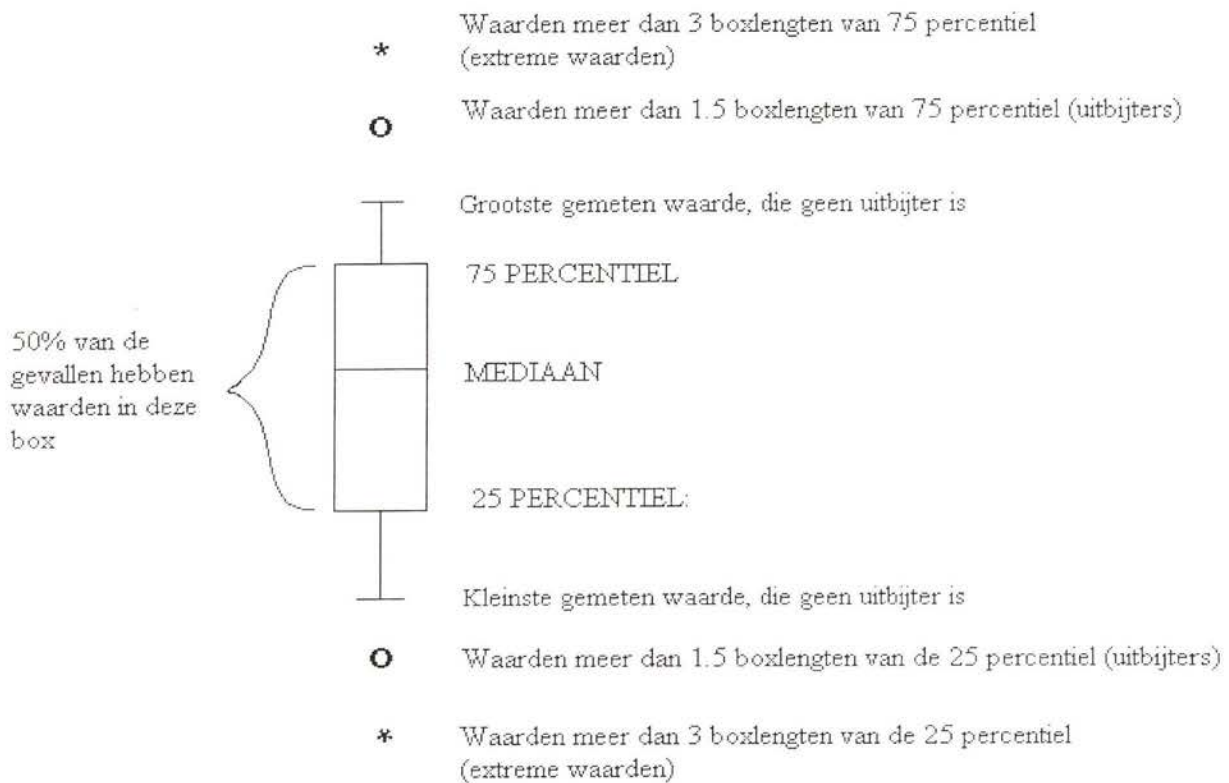
De relatieve gevoeligheid van de bioassays werd bepaald door de verkregen 12 metingen per test, logaritmisch om te zetten en hiervan de mediaan te bepalen (tabel 7). Tevens werd via de 95% betrouwbaarheidsintervallen per meting, de gemiddelde variatiecoëfficiënt van de bioassay bepaald. De tussen haakjes aangegeven getallen, geven het aantal gebruikte metingen aan waarmee de gemiddelde variatiecoëfficiënt werd berekend. Alleen L(E)Cf₅₀-metingen, waarbij een betrouwbaarheidsinterval werd verkregen en waarbij de variatiecoëfficiënt bij de meting minder dan 50% bedroeg, werden gebruikt.

Tabel 7: Bepaling van de relatieve gevoeligheid van de bioassays.

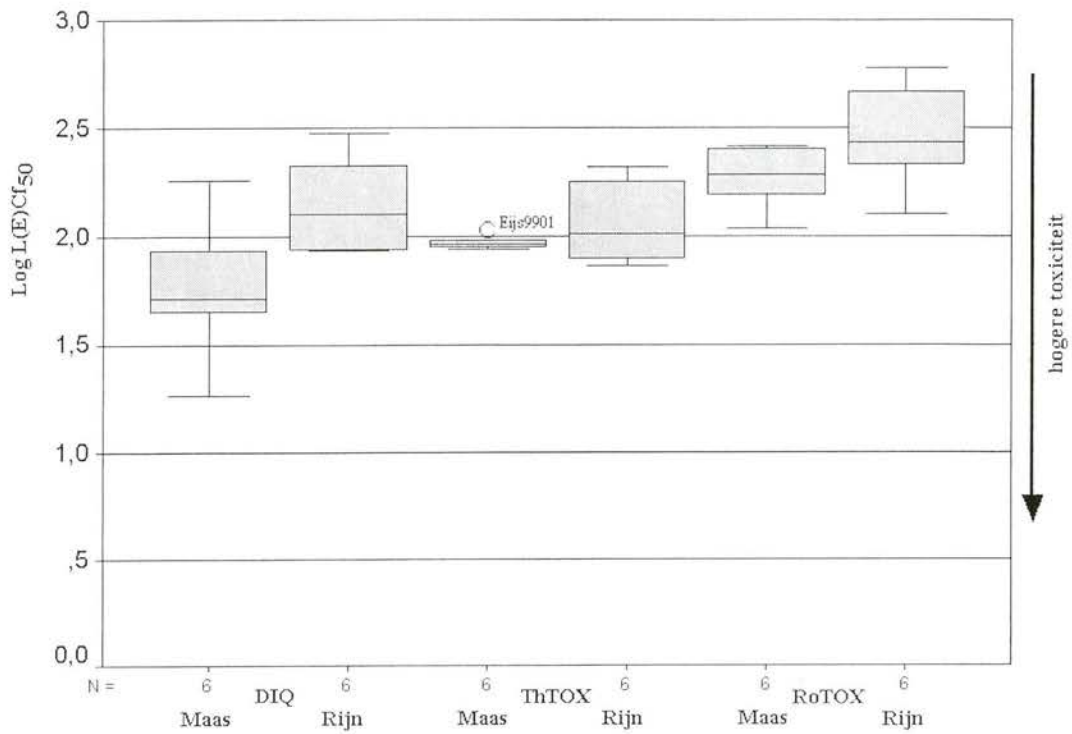
	Consumenten			Producenten			Destruenten
	DIQ	ThTOX	RoTOX	RaphALG	ScenALG	PAMALG	MTX
Eijs9804	1,260	1,958	2,419	1,719	1,754	1,326	1,776
Eijs9805	1,747	1,986	2,040	1,225	1,241	1,167	1,799
Eijs9806	1,934	1,954	2,332	1,711	1,928	1,913	0,907
Eijs9901	2,259	2,034	2,195	1,981	1,981	2,339	1,638
Eijs9902	1,685	1,939	2,406	1,815	1,929	1,737	2,180
Eijs9903	1,653	1,977	2,235	1,225	1,223	0,994	1,805
Lob9804	2,326	2,252	2,670	1,759	1,832	1,696	2,015
Lob9805	1,934	1,863	2,107	1,517	1,753	1,542	1,673
Lob9806	2,143	1,898	2,334	1,783	1,782	1,714	1,678
Lob9901	1,940	1,992	2,460	1,989	2,085	2,352	1,776
Lob9902	2,061	2,033	2,414	1,876	1,927	1,843	2,648
Lob9903	2,478	2,319	2,779	1,732	1,940	1,875	2,165
Gemiddelde	1,952	2,017	2,366	1,694	1,781	1,708	1,838
Mediaan	1,937	1,982	2,370	1,746	1,880	1,725	1,787
Variatie-coëfficiënt	14% (10)	8,6% (12)	6,1% (11)	24% (9)	22% (6)	4,3% (12)	11% (11)
Volgorde in gevoeligheid	1	2	3	2	3	1	1
Mediaan Maas	1,716	1,968	2,284	1,715	1,841	1,531	1,787
Volgorde in gevoeligheid	1	2	3	2	3	1	1
Mediaan Rijn	2,102	2,013	2,437	1,771	1,880	1,778	1,896
Volgorde in gevoeligheid	2	1	3	1	3	2	1

Op trofisch consumenten niveau bleek op basis van de mediaan van alle metingen (Maas en Rijn) de Daphnia IQ het gevoeligst te reageren. Wanneer alleen de metingen van de Rijn gebruikt werden voor de bepaling van de relatieve gevoeligheid, was de Thamnotox gevoeliger dan de Daphnia IQ. Het verschil tussen beide testen was echter minimaal te noemen. Bij de producenten bleek de PAM-algentest het gevoeligste te zijn.

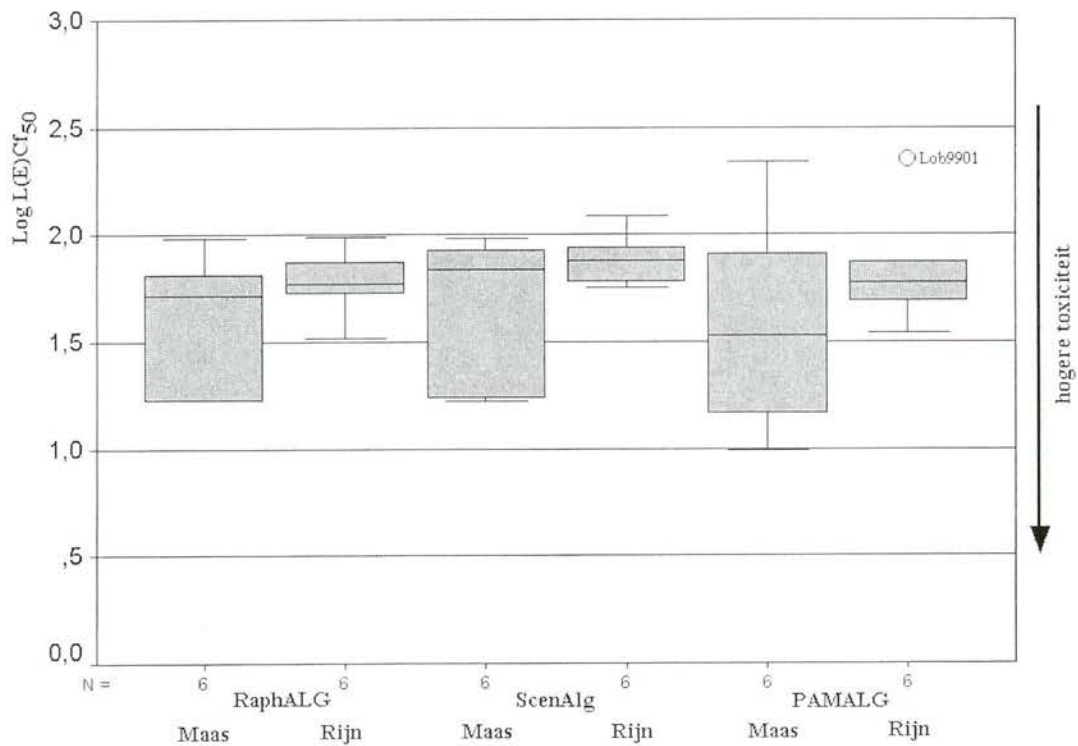
Per trofisch niveau, werden de metingen en de mediaan in een box-whiskerplot (figuren 11, 12 en 13) uitgezet. Met behulp van deze plots kan vastgesteld worden, in welk concentratiebereik de verschillende bioassays positieve reacties vertonen op de verschillende monsterpunten. Daarnaast is vast te stellen of er metingen werden verkregen die duidelijk een onderscheid laten zien. Deze worden via een ster of cirkel aangegeven (uitleg boxplot, zie figuur 10). Een lage log LC₅₀ of EC₅₀-waarde geeft aan dat het monster toxisch is. Het monster hoeft hierbij minder verdund te worden om een toxisch effect waar te kunnen nemen.



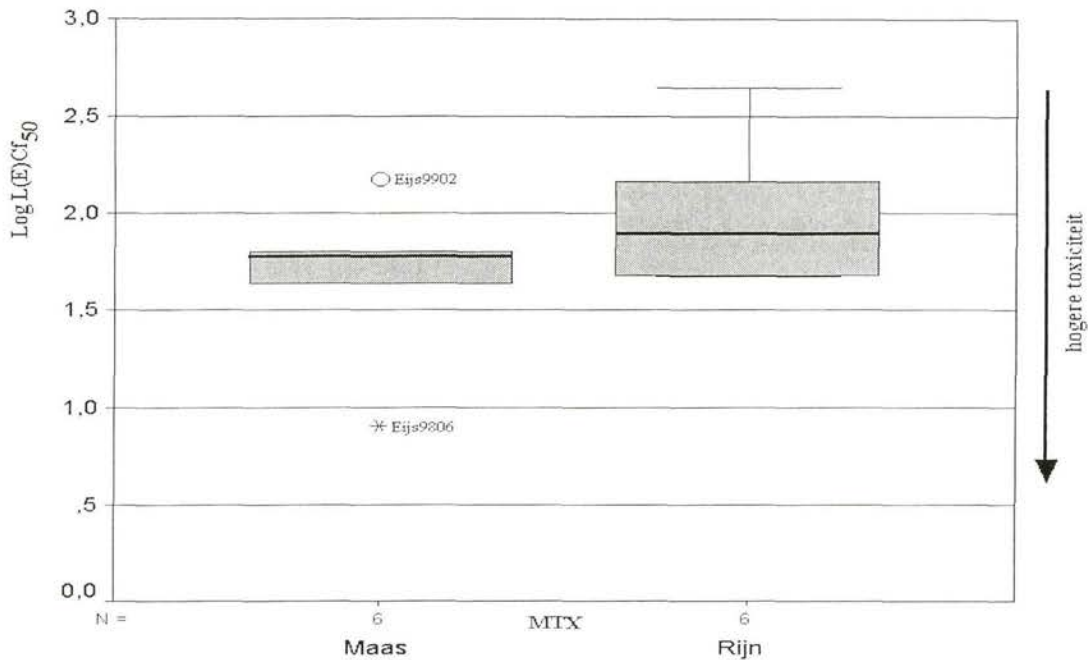
Figuur 10: Uitleg karakteristieken boxplots.



Figuur 11: Boxplot van de gegevens van de rivieren apart voor de bio-assays met ongewervelde organismen.



Figuur 12: Boxplot van de gegevens van de Maas en Rijn apart voor de bio-assays met algen.



Figuur 13: Boxplot van de gegevens van de Microtox[®]

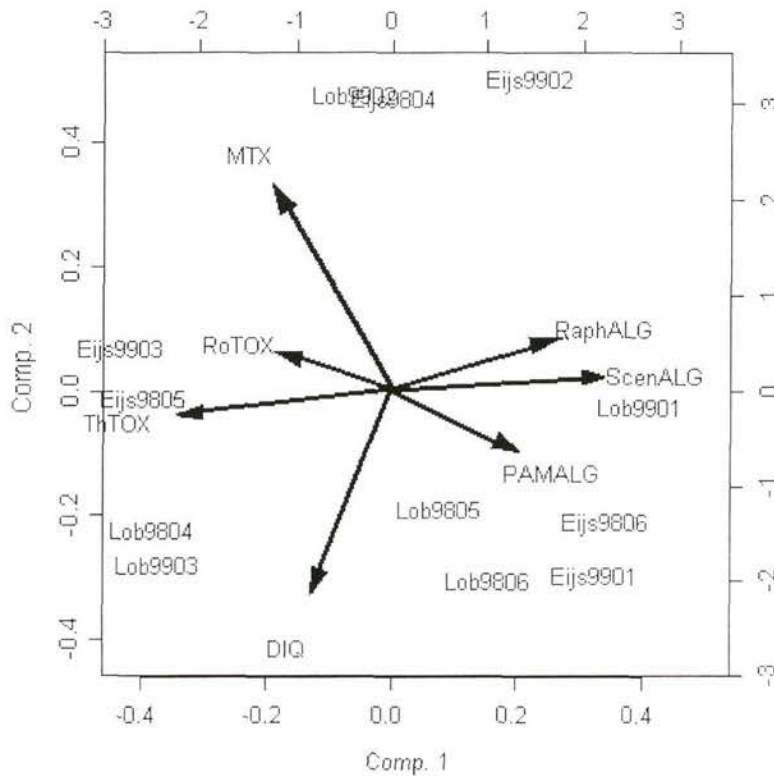
Zoals ook al uit tabel 6 blijkt, liggen de meeste resultaten in het gebied van concentratiefactor $10 < L(E)Cf_{50} < 100$ ($\log L(E)Cf_{50} = 1-2$). Eén meting, Eijs9806, ligt bij de Microtox[®] duidelijk onder het gebied waar de andere waarnemingen liggen. Dit wijst erop dat die dag duidelijk een verandering in de waterkwaliteit plaatsvond (verhoogde toxiciteit in monster)! Verder is bij de box-whiskerplots te zien dat sommige testen in een vrije nauwe concentratiefactorband liggen, terwijl andere juist een grotere variatie vertonen. Vooral de algen-metingen van de Maas vertonen een duidelijk grotere variatie dan bij de Rijn.

Voor de bepaling in hoeverre tests gebruikt worden, die gelijkwaardige en mogelijk overlappende informatie geven, werd een correlatie analyse tussen de verschillende biotesten uitgevoerd (tabel 8), met uit log getransformeerde en gecentreerde toxiciteitdata van tabel B2. De vetgedrukte getallen tonen de combinatie van testen aan die duidelijk een positieve correlatie heeft, zoals bijvoorbeeld Rotoxkit en de Thamnotoxkit. De cursieve getallen tonen een significant negatieve correlatie tussen de bioassays, zoals bijvoorbeeld PAM-algentest tegen Thamnotoxkit en de Rotoxkit.

Tabel 8. Correlatie tussen de verschillende bioassays

	DIQ	ThTOX	RoTOX	RaphALG	ScenALG	PAMALG	MTX
DIQ	1,00						
ThTOX	0,16	1,00					
RoTOX	-0,18	0,64	1,00				
RaphALG	-0,46	-0,72	-0,21	1,00			
ScenALG	-0,35	-0,76	-0,40	0,54	1,00		
PAMALG	-0,05	-0,44	-0,74	0,29	0,41	1,00	
MTX	-0,22	0,10	-0,05	-0,30	-0,36	-0,37	1,00

De Principal Component Analyses (PCA) geeft een meer gedetailleerd beeld (figuur 14).



Figuur 14: PCA van de gebruikte bioassays (co-variante analyse).

De figuur verklaart 67.3 % van de covariantie in de verkregen metingen. De pijlen in de PCA wijzen allemaal een andere kant op, dat op weinig overvloedige informatie duidt. Pijlen in tegenoverstelde richting wijzen een negatieve correlatie aan ten aanzien van de gevoeligheid van die toetsen. De meest positief gecorreleerde toetsen zijn de *Raphidocelis* en *Scenedesmus* microtiterplaten toetsen en een klein beetje de PAM-algentest. De dierlijke testen Rotoxkit en de Thamnotoxkit daarentegen wijzen in tegenovergestelde richting.

Pijlen in de richting van monstercode duiden op een relatief lage toxiciteit voor de betreffende toets, zoals bijvoorbeeld Eijs9806 voor de PAM-algentest. Pijlen in de tegenovergestelde richting van de monstercode duiden op een relatief hoge toxiciteit voor de betreffende toets, zoals bijvoorbeeld LOB9901 bij de Thamnotoxkit.

Om de algemene toxiciteit van de Maas en de Rijn te vergelijken, werden de meetwaarden van de bio-assays (Tabel B2) met behulp van de Mann-Whitney-U-test vergeleken. Hierbij werd met 95 % zekerheid vastgesteld, dat de waterkwaliteit van de Maas wezenlijk slechter is dan van de Rijn.

In tabel 9 staan de toxische druk/ecotoxicologisch risico via de berekende pT-waarden beschreven (zie paragraaf 3.6.3) met zijn betrouwbaarheidsintervallen. Tijdens de monsterneming voor de biotests, werden ook uitgebreid chemische analyses uitgevoerd. De organische parameters werden gescreend op bruikbaarheid (zie paragraaf 3.6.3.), waarmee per monster de fractie van de populatie werd bepaald, dat door de kwaliteit van het water wordt beïnvloed (PAF, toxische druk) .

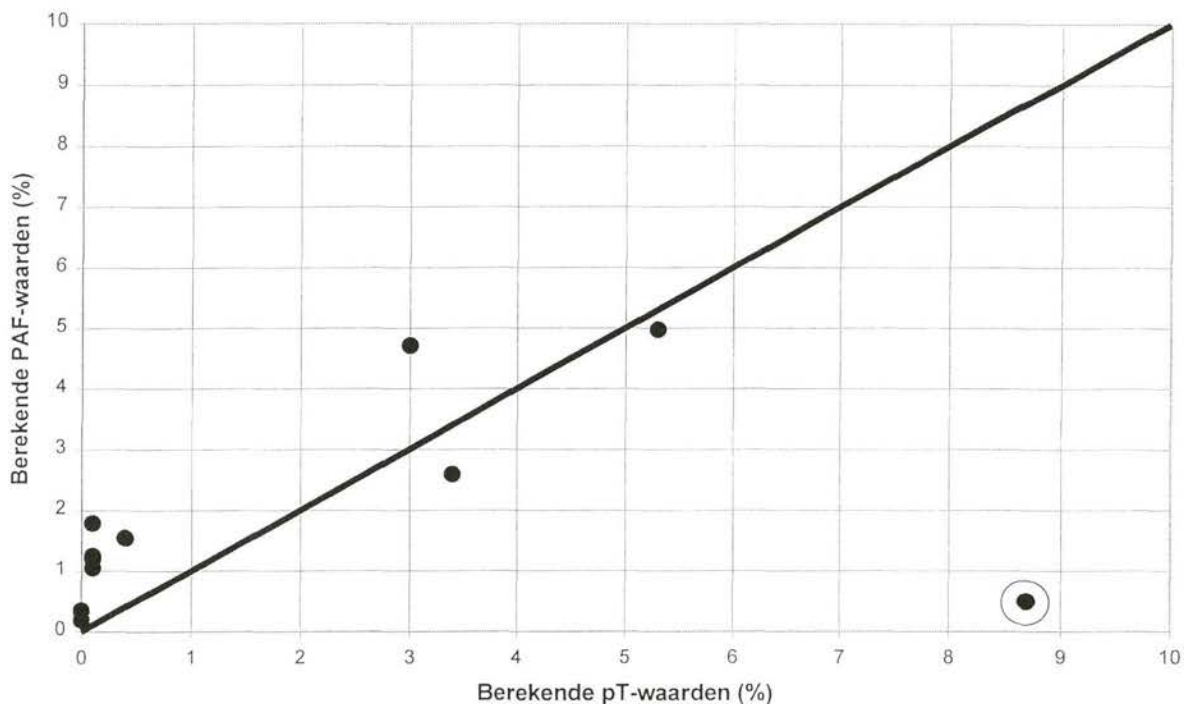
Tabel 9: Toxische druk/ecotoxicologisch risico per monsterpunt en datum.

Monstercode	pT-waarde (%) (logistisch model)	5% CLN	95% CLN	PAF (%)
Eijs9804	3,0	0,2	21,7	4,71
Eijs9805	5,3	0,6	28,0	4,97
Eijs9806	3,4	0,2	22,8	2,59
Eijs9901	0,0	0,0	1,1	0,2
Eijs9902	0,1	0,0	3,4	1,79
Eijs9903	8,7	1,7	34,7	0,49
Lob9804	0,4	0,0	7,4	1,55
Lob9805	0,1	0,0	4,0	1,05
Lob9806	0,1	0,0	3,5	1,25
Lob9901	0,0	0,0	1,2	0,35
Lob9902	0,1	0,0	3,6	1,2
Lob9903	0,3	0,0	6,2	NB

NB=Niet Bepaald

Volgens De Zwart (persoonlijke mededeling) is een pT-waarde van 5,0 % nog acceptabel. In de Maas zijn er twee monsters gevonden met een hoge pT-waarde. De pT-waarden van de Rijn zijn wezenlijk kleiner dan de pT-waarden van de Maas.

De relatie tussen de via chemische metingen berekende PAF-waarden en de biologische pT-waarden is weergegeven in figuur 15, waarin voor een aantal metingen geen duidelijke verband tussen de twee waarden is te definiëren.



Figuur 15: Verband tussen de pT-waarden en de PAF-waarden.

Vanuit de pT-waarden is de Combi-pT per locatie berekend alsook de Combi-PAF voor chemische bepalingen (zie tabel 10).

Tabel 10: Bepaling van de algemene waterkwaliteit Maas en Rijn via de Combi-PAF.

Locatie	Combi-pT (LOGISTIC-Bioassays)	Combi-PAF (chemische metingen)
Maas	1.07 %	3.0 %
Rijn	0.14 %	1.1 %

De ecotoxicologische waterkwaliteit van de Maas is wezenlijk slechter dan de Rijn, wanneer de Combi-pT waarden van de gebruikte bio-assays worden vergeleken. Dit feit is ook via de Combi-PAF van chemische metingen vast te stellen.

Op grond van de chemische metingen, uitgevoerd door het RIZA op monsters genomen op dezelfde tijdstip en lokatie als de monsters voor dit onderzoek, kon worden vastgesteld, welke organische verbindingen een wezenlijk effect sorteren op de aanwezige flora en fauna (Combi-PAF). Het is waarschijnlijk dat er ook andere stoffen in het water aanwezig waren die een belangrijk effect op de testen hadden maar niet chemisch gemeten zijn. In tabel 11 zijn de organische verbindingen in vetgedrukt weergegeven, die een hoog aandeel hebben op het toxisch eindeffect van de Rijn. In tabel 12 worden de organische verbindingen vermeld die gemeten werden in de Maas.

Tabel 11: Aanwezige giftige organische verbindingen in de Rijn.

Organische verbinding	CAS-nummer	Werkingsmechanisme	Gemiddelde concentratie (µg/l)	Relatief aandeel op toxisch eindeffect (%)
1,2-Dichloorethaan	107062	Apolaire narcose	0,049	0,3
2-(2,4-Dichloorfenoxy)propionzuur	120365	Remmer plantengroei	0,028	3,2
6,7,8,9,10,10-Hexachloor-1,5,5a,6,9,9a-hexawaterstof-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin, 3-Oxide	115297	Neurotoxicant: cyclodiene-type	0,0004	27,0
6-Chloor-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine	1912249	Remmer fotosynthese	0,016	9,8
Benzeen	71432	Apolaire narcose	0,020	0,2
3-(1-Methylethyl)-1H,2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-1, 2,2-Dioxide	25057890		0,023	0,1
(1a,2a,3b,4a,5a,6b)-1,2,3,4,5,6-Hexachloorcyclohexaan	58899	Neurotoxicant: cyclodiene-type	0,002	13,4
2-[[4-Chloor-6-(ethylamino)-S-triazin-2-yl)amino]-2-methylpropionitril	21725462	Remmer fotosynthese	0,016	1,7
Chloortoluron	15545489	Remmer fotosynthese	0,016	1,0
fosforothioic zuur, O,O-Diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl) ester	333415	Acetylcholinesterase remming: organofosfaten	0,003	15,3
N,N-Dimethyl-N'-[4-(1-methylethyl)fenyl]urea	34123596	Remmer fotosynthese	0,029	2,1
Chloorazijnzuur	79118	Alkylation or arylation reactie	0,026	16,0
2-methyl-4-chloorfenoxypropionzuur	7085190	Remmer plantengroei	0,023	0,2
Pentachloorfenol	87865	Ontkoppelaar van de oxidatieve fosforylering	0,004	6,5
Xyleen	1330207	Apolaire narcose	0,011	0,2
6-Chloor-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	122349	Remmer fotosynthese	0,006	0,4
Tetrachlooretheen	127184	Apolaire narcose	0,027	1,7
Trichlooroetheen	79016	Apolaire narcose	0,017	0,3
Trichloormethaan	67663	Apolaire narcose	0,026	0,5

Tabel 12: Aanwezige giftige organische verbindingen in de Maas.

Organische verbinding	CAS-nummer	Werkingsmechanisme	Gemiddelde concentratie (µg/l)	Relatief aandeel op toxisch eindeffect (%)
1,1,1-Trichloorethaan	71556	Apolaire narcose	0,023	0,0
1,2-Dichloorethaan	107062	Apolaire narcose	0,210	0,3
Xyleen	1330207	Apolaire narcose	0,012	0,1
2,4,5-Trichloorfenol	95954	Polaire narcose	0,030	7,7
(2,4-Dichloorfenoxy)azijnzuur	94757	Remmer plantengroei	0,044	0,2
2-(2,4-Dichloorfenoxy)propionzuur	120365	Remmer plantengroei	0,028	0,9
6-Chloor-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine	1912249	Remmer fotosynthese	0,061	10,3
Benzeen	71432	Apolaire narcose	0,020	0,1
3-(1-Methylethyl)-1H,2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one, 2,2-Dioxide	25057890	Remmer fotosynthese	0,015	0,0
(1a,2a,3b,4a,5a,6b)-1,2,3,4,5,6-Hexachloorcyclohexaan	58899	Neurotoxicant: cyclodiene-type	0,003	6,8
2-[[4-Chloor-6-(ethylamino)-S-triazin-2-yl]amino]-2-methylpropionitril	21725462	Remmer fotosynthese	0,020	0,6
Coumaphos	56724	Acetylcholinesterase remmer: organofosfaten	0,025	34,5
N'-(3,4-Dichloorfenyl)-N,N-dimethylurea	330541	Remmer fotosynthese	0,060	27,2
N,N-Dimethyl-N'-[4-(1-methylethyl)fenyl]urea	34123596	Remmer fotosynthese	0,024	0,5
Chloorazijnzuur	79118	Alkylation or arylation reactie	0,034	5,5
2-methyl-4-chloorfenoxypropionzuur	7085190	Remmer plantengroei	0,030	0,1
Chloormethaan	74873	Apolaire narcose	0,005	0,0
Pentachloorfenol	87865	Ontkoppelaar van de oxidatieve fosforylering	0,003	1,7
Xyleen	1330207	Apolaire narcose	0,013	0,1
6-Chloor-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	122349	Remmer fotosynthese	0,014	0,2
Tetrachlooretheen	127184	Apolaire narcose	0,132	2,1
Tetrachloormethaan	56235	Apolaire narcose	0,015	0,1
Trichlooretheen	79016	Apolaire narcose	0,152	0,7
Trichloormethaan	67663	Apolaire narcose	0,046	0,2
Methylbenzeen	108883	Apolaire narcose	0,017	0,1

Er werden in de Rijn 19 organische verbindingen aangetoond, die een effect kunnen veroorzaken op de flora tot fauna. In de Maas werden 26 verbindingen aangetoond. In de Rijn werden voornamelijk organische verbindingen gevonden die nadelige effecten kunnen hebben op het zenuwstelsel. 56% van het totaal effect was zenuwgerelateerd. Bij de Maas was 37.5% van het totaal effect gerelateerd aan de fotosynthese en 41.5 % aan de zenuwen gerelateerd.

4.2. Genotoxiciteitstesten

Tabel 13 en 14 geven het aantal positief bevonden ethanolextracten op basis van de LOECf-waarden (via tabel B1A en B1B), geïsoleerd bij verschillende zuurgraden, weer.

Tabel 13: Aantal positieve bevonden ethanolextracten (pH=7) per genotoxiciteitstest.

Genotoxiciteitstest	Aantal positief
Ames-test TA98 [@]	12 (9)
UMU	8
VITOTOX [®]	9
Komeet lymfocyten ¹	3
Komeet Daphnia	6

Tabel 14: Aantal positieve bevonden ethanolextracten (pH=2) per genotoxiciteitstest.

Genotoxiciteitstest	Aantal positief
Ames-test TA98 [@]	12 (3)
UMU	8
VITOTOX [®]	9
Komeet lymfocyten ¹	8
Komeet Daphnia	6

1 = In plaats van 12 extracten zijn er bij deze test 11 extracten onderzocht.

@ = Het tussen haakjes aangegeven getal is gebaseerd op overschrijding van het aantal revertanten per liter monster.

Op basis van de LOECf-waarden, waren alle monsters (pH 7 fractie en pH 2 fractie) bij de Ames-test positief. Wanneer echter niet de LOECf-waarden maar het aantal revertanten per liter als maatstaf wordt gebruikt, bedraagt het aantal positieve ethanolextracten bij de Ames-test van de 12 geteste extracten 9 en 3 (pH 7 fractie respectievelijk pH 2 fractie). De UMU-test en de VITOTOX[®] gaven in ongeveer 70 % van de monsters een positief signaal. Bij de UMU-test kon vaak geen onderscheid gemaakt worden tussen algemeen toxische werking, vanwege een te lage groeisnelheid van de bacteriecultuur. Bij de Komeet *Daphnia* test scoorde 50% van de metingen een positieve reactie. De Komeettest met lymfocyten was de enige test die onderscheid liet zien tussen de extracten. 70% van de extracten van de pH 7 fractie, werd positief bevonden door deze test, terwijl bij extracten van de pH 2 fractie, maar 25 % positief was.

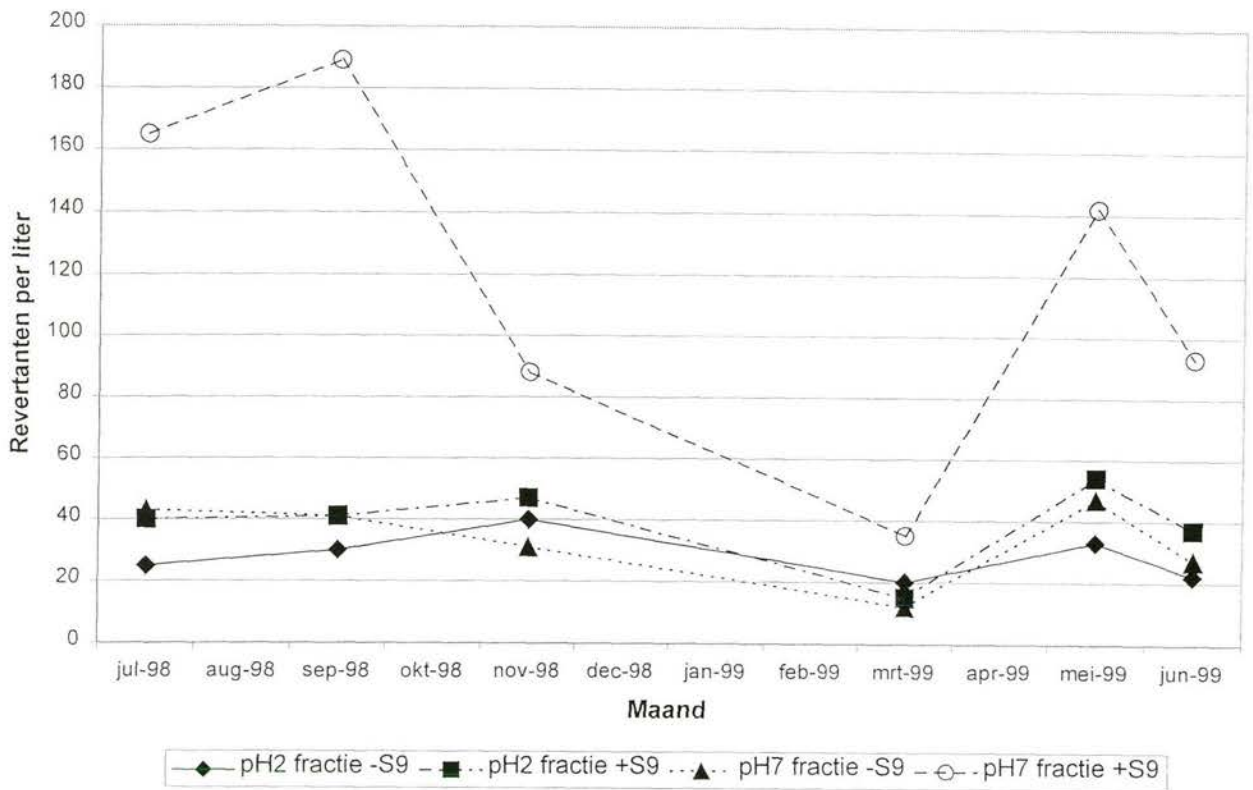
In tabel 15 worden de verschillen in respons tussen de Rijn en Maas, tussen pH2 en pH7 en tussen tests in de aan- of afwezigheid van een metaboliserende S9 fractie vermeld. Dit werd via de Mann-Whitney-U-test uitgevoerd.

Tabel 15: Significante verschillen in respons van de genotoxiciteitstesten gerelateerd naar rivier, zuurgraad en gebruik S9 fractie. Het significantieniveau staat tussen haakjes.

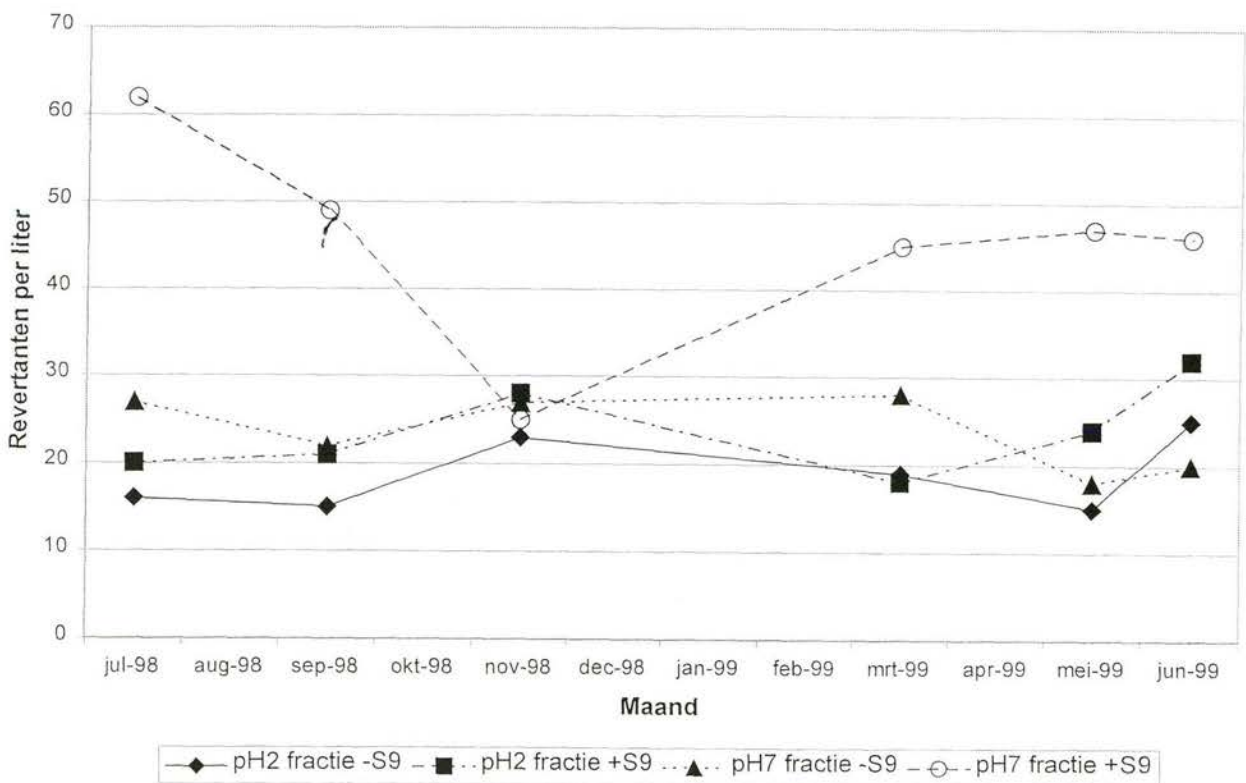
Genotoxiciteitstest	Rijn vs. Maas	+S9 vs. -S9	pH7 vs. pH2
Ames-test (TA98)	Rijn > Maas (0,0067)	+S9 > -S9 (0,001)	pH7 > pH2 (0,005)
VITOTOX [®]	-	-S9 > +S9 (0,004)	-
UMU-test	-	-	-
Komeetttest lymfocyten	Maas > Rijn (0,036)	-	pH2 > pH7 (0,031)
Komeetttest Daphnia	-	-	-

Met de Ames-test en de komeetttest met lymfocyten werd een onderscheid gevonden tussen de Maas en de Rijn. Echter de Ames-test gaf een lagere respons bij de Rijn dan de Maas, terwijl de komeetttest (lymfocyten) het tegenovergestelde liet zien. T.a.v. het gebruik van het S9-leverextract, bleek de Ames-test een hogere respons te geven wanneer de S9 mix aan het extract werd toegediend. De VITOTOX[®] daarentegen gaf meer positieve resultaten bij het extract zonder S9. De Komeetttest met lymfocyten reageerde voornamelijk op hydrofiele verbindingen (zuurgraad=2) terwijl de Ames-test op hydrofobe verbindingen meer mutageniteit detecteerde.

Met betrekking tot de mutageniteit in de loop van de tijd, gaf alleen de Ames-test voldoende positieve resultaten om een beeld te krijgen van de ontwikkeling in de Maas en de Rijn (zie figuur 16 en 17). Door de hogere mutageniteit van het Rijnwater t.o.v. het Maaswater is deze ontwikkeling ook het best in de monsters van de Rijn zichtbaar. Hier werd de laagste mutageniteit in de maand maart waargenomen. In de Maas zijn de verschillen minder duidelijk, het lijkt erop dat de laagste waarden hier in de maand november voorkomen.



Figuur 16: Verloop van de mutageniteit van de Rijn in de tijd (Ames-test).



Figuur 17: Verloop van de mutageniteit van de Maas in de tijd (Ames-test).

4.2.1. Resultaten genotoxiciteitstesten Kiwa-onderzoek

In tabel 16 is weergegeven bij welke concentratiefactoren een genotoxische respons werd waargenomen. De resultaten van de MutaChromoPlate test zijn buiten beschouwing gelaten omdat deze niet bruikbaar waren.

Tabel 16: Concentratiefactoren waarbij in de verschillende testen een genotoxische respons werd waargenomen (Rijn, pH7 fractie).

Rijn pH 7	Ames		genmutatietest (TK-test)		chromosoom-aberratietest		SOS Chromotest		Mutatoxtest	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Lob9804	42	21	-	-	ND	ND	2500	500	4	31
Lob9805	42	21	ND	ND	-	-	2500	500	1	16
Lob9806	63	21	ND	ND	-	-	-	100	1	-
Lob9901	-	63	-	-	ND	ND	2500	100	1	1

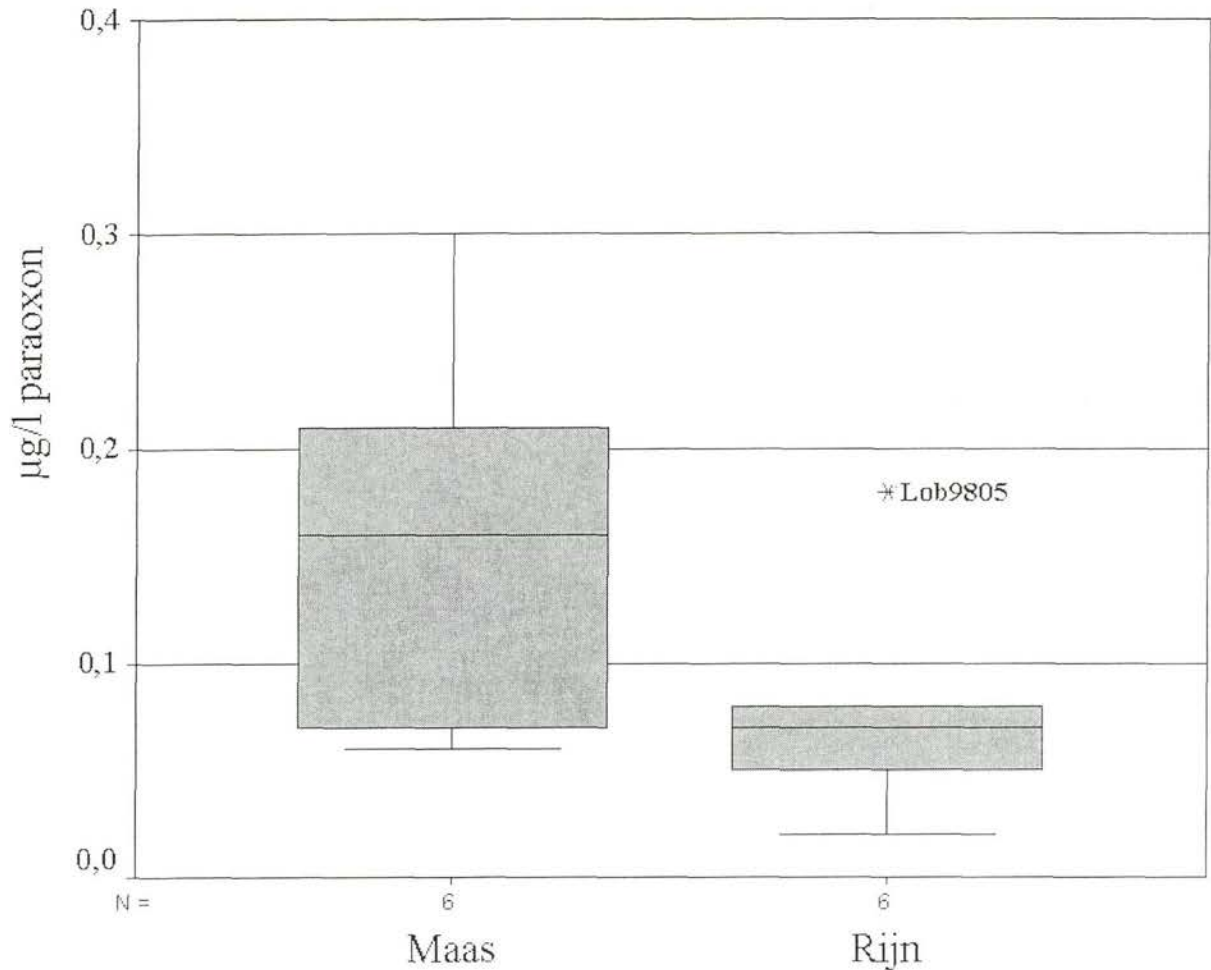
Legenda: ND = niet uitgevoerd

- = geen genotoxische respons waargenomen

Een totaal-oordeel over welke test het beste is, kan daar niet aan worden ontleend, omdat de verschillende testen op verschillende eindpunten testen en de ene test dus gevoeliger kan zijn voor een bepaalde stofgroep dan de andere test.

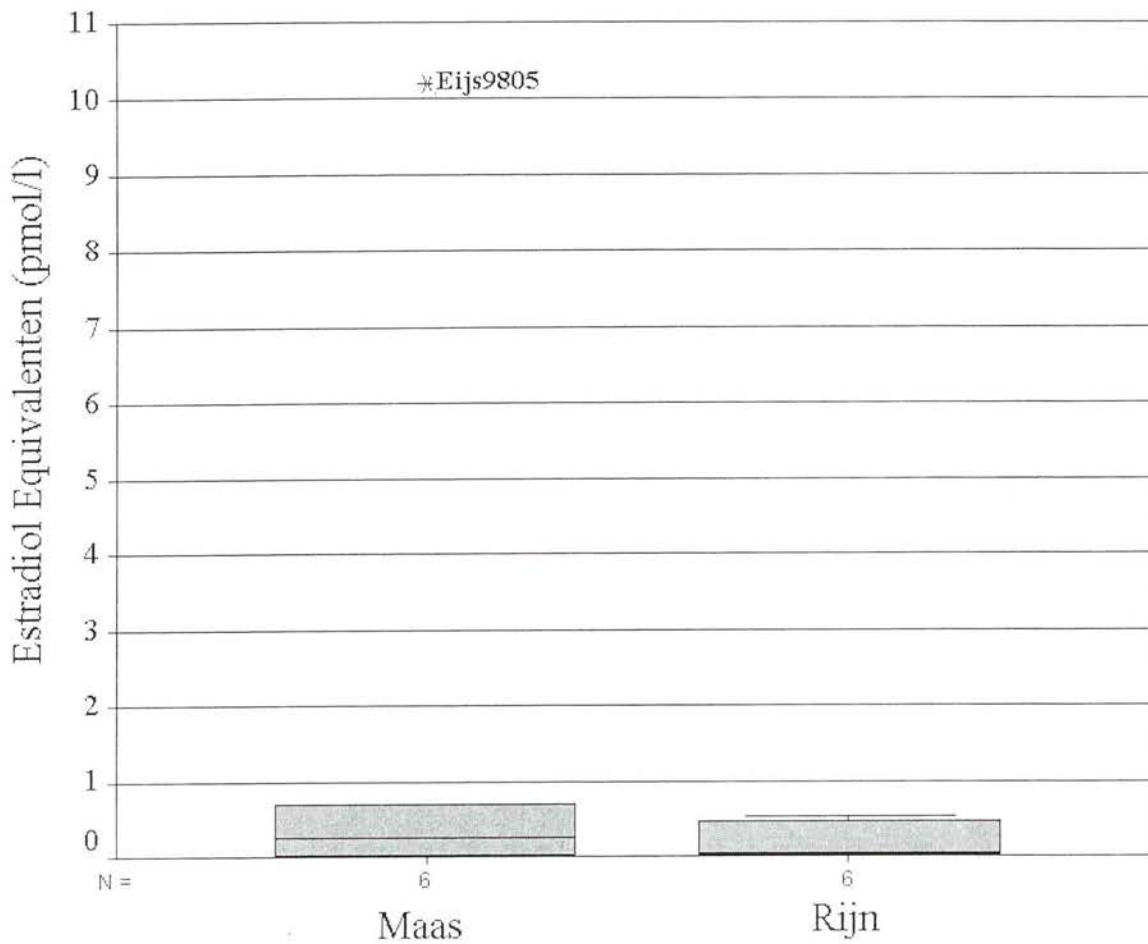
4.3. Werkingsspecifieke testen

De resultaten van de werkingsspecifieke testen (acetylcholineesterase-test en de Calux-ER-test) zijn in figuren 18 en 19 weergegeven, voor de detailinformatie wordt verwezen naar bijlage B3.



Figuur 18: Boxplot van resultaten uit de cholinesteraseremmingstest

De Maas heeft wezenlijk meer verontreinigingen die het enzym cholinesterase remmen in het water dan de Rijn. Echter, bij de Rijn is er 1 meting (september 1998) die een duidelijk verhoogde hoeveelheid cholinesteraseremmende verbindingen bevatte (0,18 µg/l) t.o.v. de mediaan (0.07 µg/l).



Figuur 19: Boxplot van resultaten uit de ER-Calux assay.

De hoeveelheid hormoonontregelaars in de Maas is hoger dan in de Rijn. In de Maas werd in september 1998 een relatief hoge concentratie hormoonontregelaars (10.2 pmol/l estradiol-equivalenten) waargenomen. Overigens lijkt de variatiebreedte in beide rivieren vergelijkbaar te zijn. De hoge waarde in de Maas wijst erop dat er vrij sterke fluctuaties kunnen optreden in de gehalten van de Maas. Het feit dat er maar weinig monsters zijn onderzocht sluit niet uit dat dit ook bij de Rijn het geval kan zijn.

5. Discussie en conclusies

5.1. Bioassays

5.1.1. *De meest geschikte bioassays voor onderzoek in de Nederlandse rivieren*

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de algen als producenten de gevoeligste organismen zijn m.b.t. effectmetingen op ethanolconcentraten van oppervlaktewater. Daarna volgen de destruenten (bacteriën) en de consumenten (ongewervelden).

Bij de producenten, komt de PAM-algentoets als gevoeligste uit de bus, hetgeen waarschijnlijk het gevolg is van een effectmeting op subleetaal niveau. Bij de consumenten, is de Daphnia IQ de gevoeligste test, waarbij ook hier de oorzaak kan liggen in het feit dat deze test een subleetaal effect meet.

De Principle Component Analysis (figuur 14) laat zien dat de aangegeven pijlen alle een andere kant wijzen. Hieruit kan worden geconcludeerd dat met deze testbatterij, slechts weinig overlappende informatie wordt verkregen. Uit de correlatie-analyse (tabel 8) blijkt dat de testen *Raphidocelis* sp. MTP en de *Scenedesmus* sp. MTP met daarnaast de Thamnotoxkit en de Rotoxkit een duidelijke correlatie hebben. Op basis van de Principle Component Analysis en op basis van de gevoeligheid, kan men in toekomstige testbatterijen volstaan met één van beide algentesten en de Thamnotoxkit.

Het gebruik van de gekozen batterij aan biotesten per monster ongeveer 1300 Euro aan kosten met zich (exclusief monsteropwerking). Bij gebruik van de Microtox[®], PAM, één van beide MTP-algentesten, Thamnotoxkit en de Daphnia IQ, zullen de kosten per monster ongeveer 900 Euro bedragen.

5.1.2. *De waterkwaliteit van Rijn en Maas*

Bij het gebruik van 7 bioassays is met 95% zekerheid vast te stellen dat de Maas significant toxischer is dan de Rijn. Via de Combi-pT, waarmee de algemene kwaliteit van de rivieren voor alle soorten organismen via resultaten van bioassays wordt weergegeven, blijkt dat de Maas ongeveer 7,5 * toxischer is dan de Rijn. De relatie tussen de pT-waarden (toxische druk via metingen uit bioassays) en de PAF-waarden (toxische druk via chemische metingen) is niet aanwezig (figuur 15). Dit blijkt vooral uit het sterk afwijkende punt waarbij een hoge PAF-waarde niet correspondeert met de bij behorende pT-waarde. Aanpassing van het gebruikte model voor de berekening van de toxische druk/ecotoxicologisch risico wordt dan ook aanbevolen. Het voorspellen van de toxische druk uit chemische metingen via modellen is op dit moment niet mogelijk, daar de biotesten de effecten weergeven als gevolg van zeer complexe interacties tussen chemische stoffen met de organismen. Vandaar de meerwaarde om de biotesten te gebruiken voor het bepalen van de kwaliteit van oppervlaktewater.

Op basis van de chemische metingen (tabel 12), zijn er bij de Maas zes organische verbindingen, die een wezenlijk toxisch aandeel (92%) hebben op de algemene waterkwaliteit. Gemiddeld liggen de gehalten van deze stoffen beneden de 0,1 µg/l (als grens gedefinieerd voor organische componenten in het infiltratiebesluit). De concentratie van enkele verbindingen waren hoger dan 0,1 µg/l. Het type effect dat de

zes verbindingen kunnen uitoefenen op organismen is voornamelijk gericht op de fotosynthese en hebben mogelijk een neurotoxisch effect. Bij de Rijn zijn er 6 organische verbindingen die 88% van het toxisch effect zouden kunnen verklaren. Het gehalte van deze verbindingen lag ook beneden de 0.1 µg/l. Deze verbindingen beïnvloeden voornamelijk het zenuwstelsel.

Twee monsters (Eijs9805 en Eijs9903) uit de Maas zijn op basis van een hoge pT-waarde (>5%) toxisch te noemen. Als men bij de interpretatie de hoogste berekende betrouwbaarheidsgrenzen in beschouwing neemt kunnen ook twee andere metingen van de Maas als verdacht toxisch worden bestempeld (Eijs9804 en Eijs9806). In de meetserie van de Rijn zijn er geen monsters met een te hoge pT-waarde (>5%) geconstateerd, wel twee verdacht toxisch monsters (Lob9804 en Lob9903).

5.2. Genotoxiciteitstesten

5.2.1. *De meest geschikte genotoxiciteitstesten voor onderzoek in de Nederlandse rivieren*

In de tabellen 13 en 14 is te zien dat de Ames-test het vaakst mutagene activiteit aantoonde. Aangezien deze test ook de beste dosis-respons curven en de duidelijkste resultaten geeft, lijkt het ons duidelijk dat deze test nog steeds te verkiezen valt boven de overige genotoxiciteitstesten. Er werden minder positieve resultaten gegenereerd bij de VITOTOX[®] en de UMU-test. De hoeveelheid extractiemiddel in het testmedium moest bij deze twee laatste testen laag gehouden worden vanwege toxiciteitsproblemen. De resultaten bevonden zich vaak op de grens van het detectieniveau.

Mogelijkerwijs zijn er in de extracten minder verbindingen die een SOS-respons oproepen in de bacteriën, dan die een frameshift mutatie genereren. Gebruik van oppervlaktewatermonsters die sterker geconcentreerd zijn (meer dan 25.000 keer), waarmee de hoeveelheid extractiemiddel in het te testen volume geminimaliseerd kan worden, zal nodig zijn om hierover een definitieve uitspraak te kunnen doen. Het aantal positieve monsters was bij de beide komeettesten lager dan bij de andere genotoxiciteitstesten. Dit houdt mogelijke verband met het feit dat een komeet-test een veel ernstiger schade aan het DNA aantoonde dan de overige testen, die kleine beschadigingen aan kunnen tonen. De test met lymfocyten is reeds veelvuldig uitgevoerd en heeft zijn nut voor vele verschillende toepassingen bewezen (Tice, 1995). Echter er zijn op dit moment nog geen eenduidige criteria vastgelegd om tot een goede evaluatie te komen. Concreet houdt dit in dat parameters als gemiddelden, mediaanwaarden, of distributies verder onderzocht dienen te worden, teneinde de meest relevante parameter met de meest relevante statische benadering te beschouwen. In de komeettest op lymfocyten werd uitgegaan van gemiddelde staart-DNA inhouden. Wanneer echter de distributie van de DNA inhouden werden bekeken, bleken er meer monsters mutagene eigenschappen te vertonen.

De komeettest in *Daphnia* is vrij nieuw en dient zeker verder gevalideerd te worden. Door de gebruikte procedure, wordt een pool van cellen bestudeerd waarvan sommige misschien een hogere of lagere gevoeligheid hebben dan andere. Bovendien gaat het in grote mate om een sterk prolifererende celpopulatie, wat eventueel voor problemen kan zorgen. Of dit al dan niet het geval is, dient verder bekeken te worden.

Het voordeel van het gebruik van twee komeet-testen is dat de lymfocyten een duidelijke link met de mens hebben, terwijl de *Daphnia* test directer in verband kan worden gebracht met in het water levende dieren. Deze laatste test geeft dus meer informatie over de ecologische effecten.

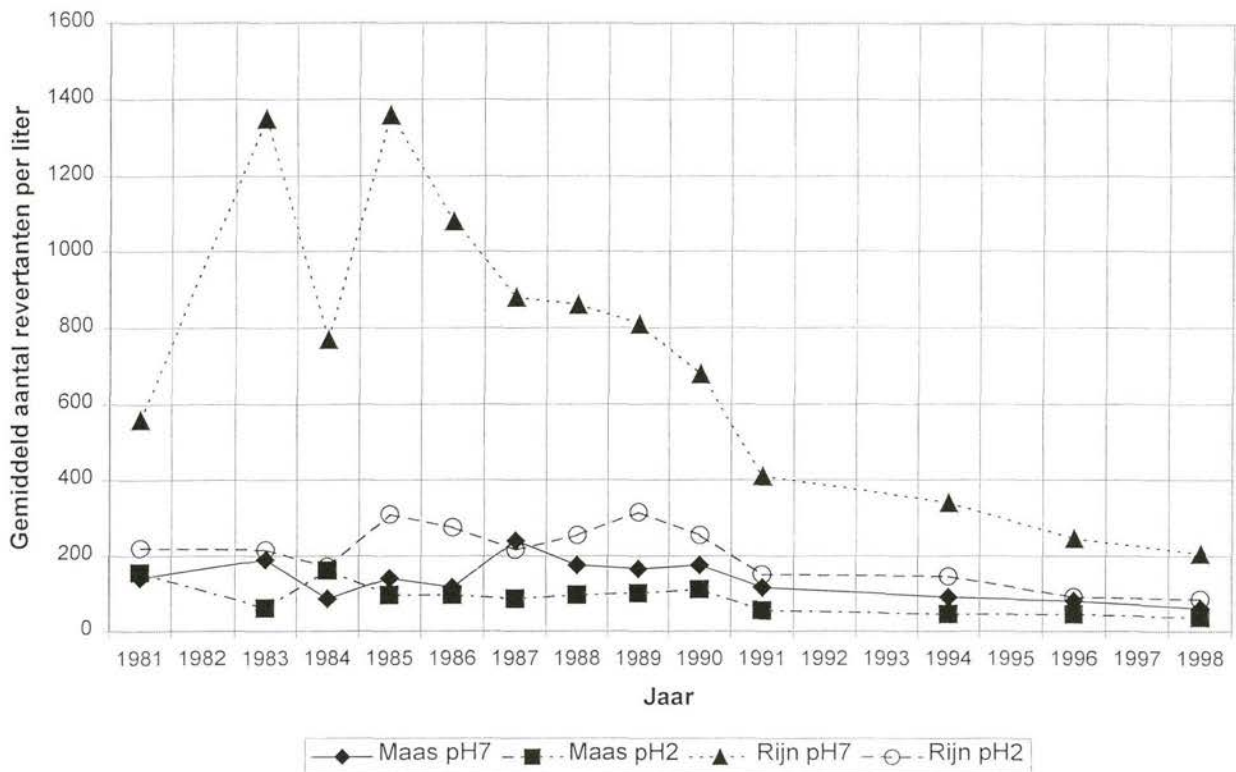
In het Kiwa-onderzoek leverden de SOS-Chromotest en de Mutatox test in de Rijn pH 7 fractie bruikbare resultaten op (tabel 16). De MutaChromoPlate test leverde geen bruikbare resultaten op. Hoewel de SOS-Chromotest een ander soort genotoxische respons onderzoekt dan de Ames-test, lag de concentratiefactor waarbij een respons werd gemeten aanzienlijk hoger dan in de Ames-test. Een ander punt bij de SOS-Chromotest is dat het een testkit is die kant en klaar door de producent wordt afgeleverd. Het is hierdoor ook niet goed mogelijk om de test optimaal te modificeren. Dit is wel mogelijk bij de UMU-test en de VITOTOX[®], maar ook in deze testen werd in het algemeen pas een genotoxische respons waargenomen bij een hogere concentratiefactor dan in de Ames-test.

Opvallend is wel dat de Mutatox test in het Kiwa-onderzoek bij relatief lage concentratiefactoren een genotoxische respons kon detecteren. Deze concentratiefactoren waren ook lager dan in de Ames-test. De *in vitro* genmutatietest en de *in vitro* chromosoomaberratietest detecteerden beiden geen genotoxische respons. Volgens het advies van de Gezondheidsraad bevatten de desbetreffende monsters dus geen verbindingen die voor de mens genotoxisch zijn (ervan uitgaande dat deze testen ook geschikt zijn voor het testen van watermonsters). Om hierover meer zekerheid te krijgen zouden deze testen op een groter aantal monsters moeten worden uitgevoerd. Beide testen zijn nu slechts twee maal uitgevoerd.

5.2.2. De waterkwaliteit van Rijn en Maas

Vanwege het feit dat al gedurende een aantal jaren (vanaf 1981) genotoxische metingen zijn verricht op de Rijn en Maas met de Ames-test, werd deze test als referentie opgenomen in de testbatterij. Ook de voor de Ames-test gangbare concentratiefactor van 25.000 keer werd daarom overgenomen, waarbij dit concentraat dan ook voor de andere genotoxiciteitstesten werd gebruikt. Vanwege het feit dat de andere testen niet bij ieder monster een respons gaven, is het alleen met de Ames-test mogelijk het verloop van genotoxiciteit in de Maas en de Rijn te volgen (figuur 16 en 17). Evenals voorgaande jaren (Veenendaal, 1999), was de genotoxiciteit van de Rijn wezenlijk hoger dan de Maas. Daarbij werd de meeste genotoxiciteit gemeten in de pH 7 fractie van de extracten, waarbij de S9-mix werd toegevoegd. De Maas en Rijn bevatten dus matig apolaire organische verbindingen, die eerst niet genotoxisch zijn en pas na omzetting door dit lever-extract (S9), genotoxisch worden.

De genotoxische activiteit in beide rivieren is sinds 1981 geleidelijk aan minder geworden (zie figuur 20).



Figuur 20: Verloop van de genotoxiciteit van de Maas en Rijn, vanaf 1981 met de Ames-test. (gegevens uit rapport Veenendaal & Van Genderen, 1998)

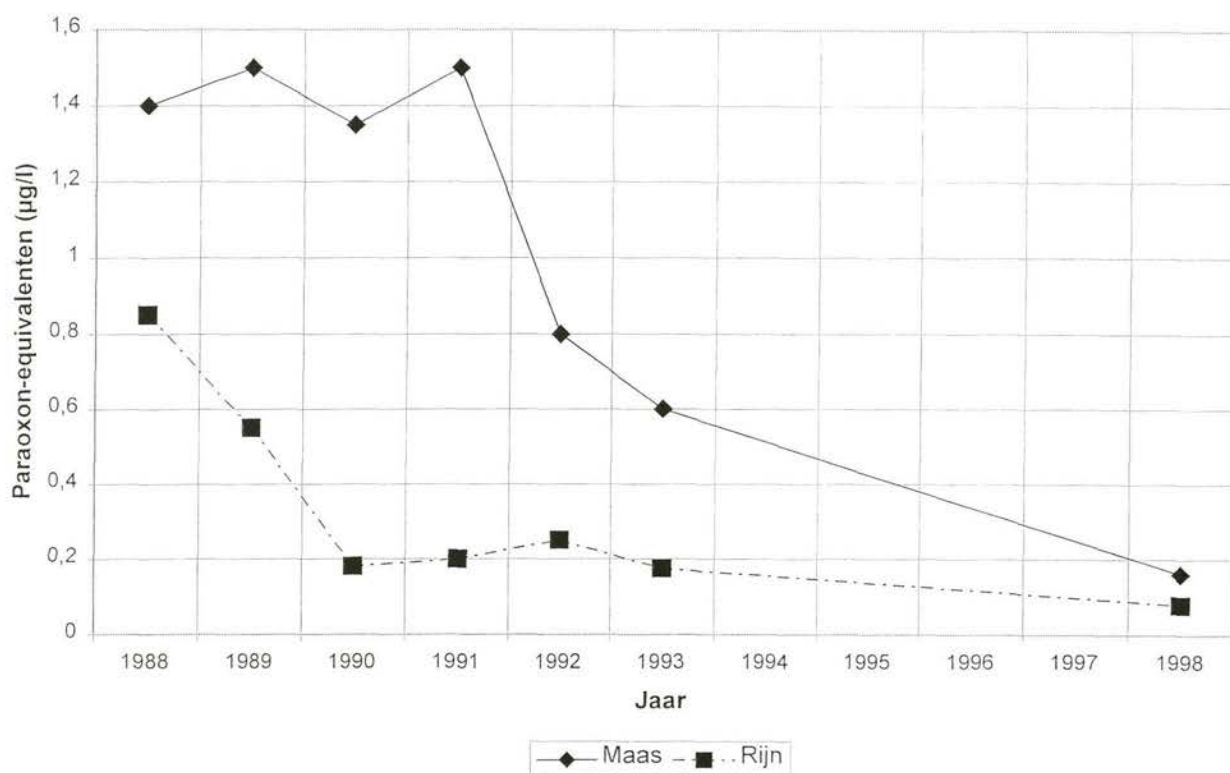
In figuur 20 zijn de jaargemiddelden van 6 monsters per jaar genomen, waarbij de resultaten van de extracten zonder S9 en met S9 met elkaar zijn opgeteld.

De komeetttest, waarbij lymfocyten als cellijn werden gebruikt, liet zien dat de Maas genotoxischer is dan de Rijn en dat nu de meer hydrofiele verbindingen genotoxischer zijn dan de meer hydrofobe verbindingen. Daarnaast geeft de VITOTOX[®] aan dat de extracten zonder S9 genotoxischer waren dan de extracten met S9. Echter is er meer onderzoek nodig om het beeld dat door de Ames-test werd gegenereerd te verifiëren, met als reden het geringe aantal positieve metingen.

5.3. Werkingsspecifieke biotesten

5.3.1 De waterkwaliteit van Rijn en Maas

In de Rijn is éénmaal een duidelijk verhoogd paraoxon-equivalent gehalte waargenomen (figuur 18). De concentratie cholinesteraseremmers is sinds 1988 in zowel Rijn als Maas duidelijk afgenomen (figuur 21). De Rijn bevat gemiddeld gezien 2 keer minder cholinesteraseremmers dan de Maas.



Figuur 21: Verloop van hoeveelheid verbindingen die het enzym acetylcholinesterase remmen, uitgedrukt in paraoxon-equivalenten in µg/l van 1988-1998/1999 (gegevens uit 1988-1993 uit Noij en Meerkerk, 1995).

In slechts één monster van de Maas (Eijs9805) werd met de ER-Calux test met een duidelijke verhoging van het gehalte oestrogene stoffen (10.2 pmol/l EEQ) gemeten. Dit monster zou zeker een effect laten zien op de vispopulatie. De waarde waarbij men een effect op vissen verwacht (LOEL rond de 1 pmol/l EEQ) is in dit monster duidelijk overschreden (Murk, persoonlijke mededelingen). Overigens is niet duidelijk hoelang een dergelijke belasting in het milieu aanwezig moet zijn om een effect te sorteren. Dit monster betreft een uitschieter (figuur 19). Verder kan geconstateerd worden, dat de gehalten 1999 (Bijlage Tabel B3) lager zijn dan die van 1998. T.a.v. de uitvoering van de bepaling, voldeden de cellen aan de normale kwaliteitsnormen en gaven de calibratiepunten normale responsen te zien.

6. Aanbevelingen

Op basis van de resultaten van dit onderzoek, worden de volgende aanbevelingen geformuleerd:

- Gebruik van minimaal één bioassay per trofisch niveau is noodzakelijk, om de ecotoxicologische effecten van een grote verscheidenheid aan organische verontreinigingen vast te kunnen stellen. De batterij zal dan in ieder geval de PAM-algentest, de Daphnia IQ test en de Microtox[®] moeten bevatten.
- Voor een verdere aanpassing van het gebruikte model voor de berekening van de toxische druk/ecotoxicologische risico, dienen meerdere metingen te worden verricht voor het verkrijgen van een eenduidige kwaliteitsparameter.
- Gebruik van genotoxiciteitstesten, die een andere aangrijppunt hebben t.a.v. mutagene stoffen, is wenselijk om het kwaliteitsbeeld dat de Ames-test genereert te verifiëren. Gebruik van de UMU-test en de Komeetest heeft de voorkeur. Daarnaast wordt aangeraden de Mutatoxtest nader te onderzoeken. In het jaar 2000 is een vervolgproject van start gegaan voor onderzoek van oppervlaktewater met de Ames-test, UMU-test en de Komeetest.
- Onderzoek naar de mogelijkheden tot verhoging van de concentratiefactor bij de genotoxiciteitstesten is nodig om een betrouwbare en vergelijkbare LOECf-waarde te krijgen. Daarbij is het van belang na te gaan welke hoeveelheden aan extractiemiddel gebruikt mogen worden, om zo bij de UMU- en Komeetest geen toxiciteit te meten.
- Bij de genotoxiciteitstesten is het gebruik van een eenduidige kwaliteitskenmerk, waarmee de uitspraak van de verschillende testen gemakkelijker vergeleken kan worden, noodzakelijk. Als kwaliteitskenmerk kan bijvoorbeeld LOECf-waarden gebruikt worden, waarbij ook een betrouwbaarheidsinterval bepaald kan worden. Bij het bepalen van de LOECf-waarde bij de komeetest, is het noodzakelijk eerst vast te stellen, welke eindparameter het genotoxisch effect sorteert.
- Het integreren van gegevens uit de genotoxiciteitstesten in de gegevens van de bio-assays, is vanwege te weinig gegevens en/of vanwege het gebruik van de huidige +/- uitspraak op dit moment nog niet mogelijk. Onderzoek naar het verkrijgen van een combinatie-eindparameter is wenselijk, wanneer in de toekomst naast de bio-assays, de genotoxiciteitstesten worden uitgevoerd.
- Vanuit het Kiwa onderzoek komt de aanbeveling om met de *in vitro* genmutatietest en de *in vitro* chromosoom aberratietest, aanvullend onderzoek te verrichten op een grotere set monsters. Wanneer een dergelijk onderzoek wordt uitgevoerd, kan inzicht worden verkregen in de overeenkomsten en verschillen tussen al de genotoxiciteitstesten en de betekenis voor de mens.
- Daar er nog steeds stoffen voorkomen in de Rijn en de Maas die een remming genereren op het enzym acetylcholinesterase, blijft het gebruik van deze test noodzakelijk.

Literatuur

- Aqua Survey Inc., (1993). *Daphnia magna* IQ toxicity test: technical information update. Aqua Survey Inc., 499 Point Breeze Rd., Flemington, NJ, USA.
- Berndt, J. (1995). Umweltbiochemie. Gustav Fisher Verlag Stuttgart.
- Bulich, A.A., (1979). Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. Aquatic Toxicology. ASTM 667, Markings, L.L. and R.A. Kimerle, Eds., American Society for Testing and Materials. Pages 98-106.
- Bulich, A.A. and Isenberg, D.L., (1981). Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. ISA Transactions, 20, 29-33.
- Centeno, M.D., Persoone, G. and Goyvaerts, M.P (1993). Cyst-based toxicity tests IX. The potential of *Thamnocephalus platyurus* as test species in comparison with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea : Branchiopoda : Anostraca). Env. Toxicol. Water Qual.
- De Zwart, D. & Leonards, P. (1999). Persoonlijke communicatie.
- De Zwart, D. In press (2000). Observed regularities in SSDs for aquatic species. SETAC publication on species sensitivity distributions (SSD).
- De Zwart, D. en A. Sterkenburg. In press (2000). Toxicity based assessment of water quality. SETAC publication on species sensitivity distributions (SSD).
- Denneman, W.D., N. Heeg, A.J. Palsma & H.M.J. Jansen. 1998. Xeno-oestrogenen en drinkwater(bronnen). RIWA-projectgroep stofstudies
- Genty, B., Briantais J.M. and Baker, N.R., (1989). The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 990:87-92.
- Gezondheidsraad (1995). Commissie Beoordeling carcinogeniteit van stoffen. Betekenis van mutageniteitstest. Gezondheidsraad, Den Haag. Publicatienummer 1995/20.
- Groshart & Balk (1998). Biociden. RIWA rapport.
- Haanstra, L., P. Doelman, P., en Oude Voshaar, J.H., (1985). The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. Plant and Soil 84:293-297.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., and Thurston, R.V., (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714-719. Correction 12, 417 (1978).
- Hofstraat, J.W., J.C.H. Peeters, J.F.H. Snel en C. Geel. 1994. Simple determination of photosynthetic efficiency and photoinhibition of *Dunaliella tertiolecta* by saturating pulse fluorescence measurements. Mar. Ecol. Prog. Ser. 103:187-196.
- Janssen, C.R., Ferrando Rodrigo, M.D., and Persoone, G., (1993). Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. I. Conceptual framework and application, Hydrobiologia, 255/256, 21-32.
- Le Curieux, F., Giller, S., Marzin, D., Brice, A. & Erb, F. (1996). Use of three genotoxicity tests to evaluate the genotoxic activity of organohalides, chlorinated fulvic acids and unconcentrated water samples from a drinking water plant. Revue des sciences de l'eau, 75-95.

- Legler, J., Van den Brink, C.E., Brouwer, A., Murk, A.J., Van der Saag, P.T., Vethaak, A.D. & Van der Burg, B. (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Tox. Sciences*, 48:55-66
- Maron, D.M. & Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173-215.
- Murk T., Belfroid A., Vethaak, D. (2000). Hormoonontregelaars in water opsporen met biologische effectmetingen. *H₂O*, 1-2000:20-23.
- Noij, T.H.M. & Meerkerk, M. (1995). The Toxicological and Ecological Study of the Rhine River in 1994. RIWA rapport.
- Noordsij, A., Beveren, J. & Brandt, A. (1983). Isolation of organic compounds from water for chemical analysis and toxicological testing. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 13: 205-217.
- Noordsij, A., Beveren, J. & Brandt, A. (1984). De betekenis van verschillende isolatietechnieken voor toepassing in de praktijk. *H₂O*, 17^e jaargang, 12: 242-248.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. & Shinagawa H. (1985). Evaluation of a new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.*, 147:219-229.
- Quillardet, P & Hofnung M. (1993), The SOS Chromotest: a review, *Mutation Research*, 235-279
- Rand G.M. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effect, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor & Francis Washington US-EPA. 1991. Technical support document for water quality based toxics control. EPA-report EPA/505/2-90-001, Office of Water, Washington DC.
- Reifferscheid, G., Heil, J. & Zahn, R.K. (1991). Die Erfassung van Gentoxinen in Wasserproben mit dem *Umu*-Mikrotest. *Vom Wasser*, 76: 153-166.
- Reifferscheid, G. & Heil J. (1996). Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Res.*, 369: 129-145.
- RIVM, Standard Operating Procedure ECO/303/01, (1998). Voorschrift voor het concentreren van organische microverontreinigingen uit water met behulp van XAD-harsen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Laboratorium voor Ecotoxicologie, Bilthoven. Juli 1998.
- RIVM, Standard Operating Procedure ECO/310/00, (1998). Opwerken van een acetonconcentraat tot een watermonster voor aquatische toxiciteitstoetsen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Laboratorium voor Ecotoxicologie, Bilthoven. Februari 1998.
- Snell, T.W. and Persoone G., (1989). Acute toxicity bioassays using rotifers. II. A freshwater test with *Brachionus rubens*. *Aquat. Toxicol.*, 14, 81-92.
- Snell, T.W., Moffat, B.D., Janssen, C., and Persoone G., (1991). Acute toxicity bioassays using rotifers. IV. Effects of cyst age, temperature and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 21, 308-317.
- Tice. T.R. (1995). The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. *Environmental Mutagenesis*, Phillips and Venitt (eds.), BIOS Scientific Publishers: 315-339.
- US-EPA. (1991). Technical support document for water quality based toxics control. EPA-report EPA/505/2-90-001, Office of Water, Washington DC.

- Van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, A., Provoost, A. & Verschaeve L. (1997). The VITOTOX[®], an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. Mutation Res., 389: 279-290.
- Van Genderen, J. & Noordsij, A.(1998). Aandachtsstoffen voor nader toxicologisch onderzoek. Een keuze uit de verbindingen die zijn gevonden in oppervlaktewater en het daaruit bereide drinkwater. RIWA rapport
- Veenendaal, H. & Van Genderen, J. (1997). Mutageniteit in Rijn en Maas in 1996. RIWA rapport.

Bijlagen

Tabel B1A: Resultaten genotoxiciteitstesten (ethanolextract bij pH 7)

Monster code ¹	Concentratie Opstelling	Conc.-factor	Ames-test				UMU		VITOTOX ⁵		Komeetttest Lymfocyten		Komeetttest Daphnia	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
			Revertanten/l	Revertanten/l	LOECf ²	LOECf ²	LOECf ³	LOECf ³	LOECf ⁴	LOECf ⁴	LOECf ⁵	LOECf ⁵	LOECf ⁶	LOECf ⁶
Eijs9804	K [#]	25000	27	62	84	21	65	-	250	-	390	ND	31,2	ND
Eijs9805	L [@]	21259	22	49	66	33	520	-	250	-	390	ND	26,5	ND
Eijs9806	K	25000	27	25	84	84	260	-	-	-	-	ND	31,2	ND
Eijs9901	L	14000	28	45	70	47	-	-	-	-	-	-	8,7	ND
Eijs9902	L	25000	18	47	84	42	-	520	-	250	ND	ND	-	ND
Eijs9903	L	25000	20	46	84	42	-	-	125	250	-	-	-	ND
Lob9804	K	25000	43	165	42	21	-	-	250	-	-	ND	7,8	ND
Lob9805	K	25000	41	189	42	21	-	-	250	-	-	ND	31,2	ND
Lob9806	K	25000	31	88	63	21	260	260	-	-	-	ND	-	ND
Lob9901	K	25000	12	35	-	63	-	260	250	250	-	-	-	ND
Lob9902	K	25000	47	142	42	21	33	260	250	125	-	390	-	ND
Lob9903	K	25000	27	93	42	42	-	260	250	250	-	-	-	ND

1 = Zie tabel 5 voor verklaring monstercode.

2 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: monster heeft 2* het aantal spontane revertanten per liter

3 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: groeisnelheid groter dan 0,5 en inductie factor groter of gelijk aan 1,5

4 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: factor signaal uit teststam is 1,5 keer hoger dan de primaire stam

5 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: laagste concentratiefactor waar statisch verschil bestaat tussen controle en behandelde cellen via Mann-Whitney U test (p<0,05)

6 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: laagste concentratiefactor waar statisch verschil bestaat tussen controle en behandelde cellen via Kruskal-Wallis test (p=0,05)

= Oppervlaktewater naar KIWA getransporteerd voor verdere verwerking

@ = Oppervlaktewater lokaal op XAD kolom gebracht, waarna de kolom naar KIWA werd getransporteerd voor verdere verwerking.

ND = niet gedetecteerd

Tabel B3: Resultaten Werkingsspecifiek testen.

Monstercode	Choline esterase remming			ER-Calux
	Cf	Extract (µg/l paraoxon)	Oppervlakte water (µg/l paraoxon)	Oppervlakte water EEQ pmol/l
Eijs9804	1011	302	0,30	0,43
Eijs9805	1015	210	0,21	2.5-10.2
Eijs9806	1009	201,9	0,20	0.39-0.69
Eijs9901	1003	56	0,06	0,08
Eijs9902	1010	68,3	0,07	0,027
Eijs9903	998	120,6	0,12	0,015
Lob9804	1015	86	0,08	0,02
Lob9805	1001	180	0,18	0.36-0.46
Lob9806	2023	37,6	0,02	0.32-0.53
Lob9901	1012	48,1	0,05	0,057
Lob9902	1009	67,4	0,07	0,025
Lob9903	1002	67,6	0,07	0,027
Con9804	1011	<0.1	0,00	0,01
Con9805	1013	<0.1	0,00	0.072-0.095
Con9806	1009	157,4	0,16	0,03
Con9901	1009	41,5	0,04	0,008
Con9902	1006	14,1	0,01	0,011
Con9903	995	1,1	0,00	0,008

Bij de ER-calux worden soms waarden als een range aangegeven. In de uitwerkingen zijn de maxima gebruikt.

Bijlagen

Tabel B1A: Resultaten genotoxiciteitstesten (ethanolextract bij pH 7)

Monster code ¹	Concentratie Opstelling	Conc.-factor	Ames-test				UMU		VITOTOX [®]		Komeetttest Lymfocyten		Komeetttest Daphnia	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
			Revertanten/l	Revertanten/l	LOECf ²	LOECf ²	LOECf ³	LOECf ³	LOECf ⁴	LOECf ⁴	LOECf ⁵	LOECf ⁵	LOECf ⁶	LOECf ⁶
Eijs9804	K [#]	25000	27	62	84	21	65	-	250	-	390	ND	31,2	ND
Eijs9805	L [@]	21259	22	49	66	33	520	-	250	-	390	ND	26,5	ND
Eijs9806	K	25000	27	25	84	84	260	-	-	-	-	ND	31,2	ND
Eijs9901	L	14000	28	45	70	47	-	-	-	-	-	-	8,7	ND
Eijs9902	L	25000	18	47	84	42	-	520	-	250	ND	ND	-	ND
Eijs9903	L	25000	20	46	84	42	-	-	125	250	-	-	-	ND
Lob9804	K	25000	43	165	42	21	-	-	250	-	-	ND	7,8	ND
Lob9805	K	25000	41	189	42	21	-	-	250	-	-	ND	31,2	ND
Lob9806	K	25000	31	88	63	21	260	260	-	-	-	ND	-	ND
Lob9901	K	25000	12	35	-	63	-	260	250	250	-	-	-	ND
Lob9902	K	25000	47	142	42	21	33	260	250	125	-	390	-	ND
Lob9903	K	25000	27	93	42	42	-	260	250	250	-	-	-	ND

1 = Zie tabel 5 voor verklaring monstercode.

2 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: monster heeft 2* het aantal spontane reveranten per liter

3 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: groeisnelheid groter dan 0,5 en inductie factor groter of gelijk aan 1,5

4 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: factor signaal uit teststam is 1,5 keer hoger dan de primaire stam

5 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: laagste concentratiefactor waar statisch verschil bestaat tussen controle en behandelde cellen via Mann-Whitney U test (p<0,05)

6 = vereiste conditie bij de LOECf-bepaling: laagste concentratiefactor waar statisch verschil bestaat tussen controle en behandelde cellen via Kruskal-Wallis test (p=0,05)

= Oppervlaktewater naar KIWA getransporteerd voor verdere verwerking

@ = Oppervlaktewater lokaal op XAD kolom gebracht, waarna de kolom naar KIWA werd getransporteerd voor verdere verwerking.

ND = niet gedetecteerd

Tabel B1B: Resultaten genotoxiciteitstesten (ethanolextract bij pH2)

Monster code	Concentratie Opstelling	Conc.-factor	Ames-test				UMU		VITOTOX [®]		Komeettest Lymfocyten		Komeettest Daphnia	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
			Revertanten/l	Revertanten/l	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf
Eijs9804	K	25000	16	20	125	42	65	-	250	-	390	ND	7,8	ND
Eijs9805	L	21259	15	21	100	66	65	-	250	-	390	ND	13,3	ND
Eijs9806	K	25000	23	28	42	84	260	260	63	-	390	ND	15,6	ND
Eijs9901	L	14000	19	18	70	-	-	-	17	17	-	390	-	ND
Eijs9902	L	25000	15	24	84	84	-	-	-	-	ND	ND	-	ND
Eijs9903	L	25000	25	32	42	84	-	-	125	-	98	195	-	ND
Lob9804	K	25000	25	40	63	63	65	-	-	-	-	ND	31.2	ND
Lob9805	K	25000	30	41	63	42	55	-	250	-	-	ND	62.5	ND
Lob9806	K	25000	40	47	42	21	-	520	125	-	390	ND	-	ND
Lob9901	K	25000	20	15	84	-	130	260	125	-	-	-	-	ND
Lob9902	K	25000	33	54	63	42	260	260	-	-	-	195	31.2	ND
Lob9903	K	25000	22	37	63	42	-	-	250	-	195	390	-	ND

Tabel B1C: Resultaten uit Kiwa onderzoek genotoxiciteitstesten, Rijn.

Monstercode	Mouse lymphoma		Chromosoom aberratietest		Mutatox		SOS Chromotest		SOS Chromotest	
	pH 7 fractie		pH 7 fractie		pH 7 fractie		pH 7 fractie		pH 2 fractie	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf
Lob9804	-	-	ND	ND	4	31	2500	500	2500	x
Lob9805	ND	ND	-	-	1	16	2500	500	2500	500
Lob9806	ND	ND	-	-	1	-	-	100	x	100
Lob9901	-	-	ND	ND	1	1	2500	100	x	x

Tabel B1D: Resultaten uit Kiwa onderzoek genotoxiciteitstesten, Maas.

Monstercode	SOS Chromotest		SOS Chromotest	
	pH 7 fractie		pH 2 fractie	
	-S9	+S9	-S9	+S9
	LOECf	LOECf	LOECf	LOECf
Eijs9804	x	2500	2500	2500
Eijs9805	-	125	2000	2000
Eijs9806	-	100	-	x
Eijs9901	-	x	-	x

Tabel B1E: Resultaten genotoxiciteitstesten RIWA, totaal overzicht (+S9 en -S9)

Monster code	Ames-test		UMU		VITOTOX [®]		Komeettest Lymfoc.		Komeettest Daphnia	
	pH2	pH7	PH2	pH7	pH2	pH7	pH2	pH7	pH2	pH7
Eijs9804	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eijs9805	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eijs9806	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Eijs9901	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Eijs9902	+	+	-	+	-	+	ND	ND	-	-
Eijs9903	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Lob9804	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Lob9805	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Lob9806	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Lob9901	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lob9902	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Lob9903	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-

Tabel B2: Resultaten acute bioassays.

Monster code	D. magna IQ		Thamnotox		Rotoxkit		Raphidocelis sp.		Scenedesmus sp.		Microtox®		PAM	
	EC ₅₀	95%	LC ₅₀	95%	LC ₅₀	95%	EC ₅₀	95%	EC ₅₀	95%	EC ₅₀	95%	EC ₅₀	95%
Eijs9804	18,2	12-28	90,8	79-105	262,3	229-302	52,3	28.3-95.0	56,7	36.4-88.0	59,6	52-68	21,2	20-22
Eijs9805	55,8	43-74	96,9	90-105	109,6	100-121	16,8	12.2-23.4	17,4	12.2-25.4	62,9	56-72	14,7	13-16
Eijs9806	86,0	69-107	90,0	78-104	215,0	193-239	51,4	32.4-80.0	84,7	∞	8,1	3-22	81,8	74-92
Eijs9901	181,6	109-306	108,2	93-126	156,7	141-175	95,7	∞	95,8	∞	43,4	28-69	218,2	205-232
Eijs9902	48,4	40-59	86,9	72-104	254,8	229-284	65,3	35.4-120	85	∞	151,5	136-169	54,5	49-61
Eijs9903	45,0	37-55	94,9	82-111	171,8	151-197	16,8	13.0-21.9	16,7	13.0-21.9	63,8	54-75	9,9	8.6-11.3
Lob9804	211,9	176-254	178,6	152-209	467,9	416-526	57,4	39.6-82.2	67,9	52.8-88.3	103,5	94-113	49,7	47-53
Lob9805	86,0	72-104	73,0	64-83	128,0	114-145	32,9	22.0-48.0	56,6	16.0-194	47,0	41-54	34,8	31-39
Lob9806	139,0	105-184	79,0	66-93	216,0	192-244	60,7	43.6-83.2	60,6	40.5-90.3	47,7	40-58	51,7	48-55
Lob9901	87,0	69-109	98,2	79-124	288,4	261-318	97,4	∞	121,5	78.9-186	59,7	51-71	224,7	205-246
Lob9902	115,0	94-142	108,0	92-130	259,3	233-289	75,1	∞	84,6	∞	445,0	317-625	69,6	65-76
Lob9903	300,3	-	208,4	169-256	601,2	-	54	45.1-63.1	87,1	∞	146,1	122-175	75,1	69-81
Con9804 [@]	>250	-	>500	-	>500	-	661	327-1339	>900	∞	100	80-124	2368	17-?
Con9805	>250	-	444	397-497	267	240-297	278	178-432	659	246-1760	327	235-456	251	226-279
Con9806	>250	-	>500	-	247	219-280	464	257-838	>900	∞	98	86-116	131	1-16000
Con9901	210	135-326	>500	-	>500	-	653	458-932	>900	∞	61	41-90	395	380-411
Con9902	>250	-	>500	-	>500	-	317	∞	811	719-914	118	104-135	463	0-8.6E17
Con9903	>250	-	>500	-	>500	-	315	∞	482	369-631	159	134-190	509	0.2-1.67E6

@ = Controlemetingen (blanco's)

- = berekening voor bepaling betrouwbaarheidsintervallen niet kunnen uitvoeren

∞ = betrouwbaarheidsinterval van 0 naar oneindig

Tabel B3: Resultaten Werkingsspecifiek testen.

Monstercode	Choline esterase remming			ER-Calux
	Cf	Extract (µg/l paraoxon)	Oppervlakte water (µg/l paraoxon)	Oppervlakte water EEQ pmol/l
Eijs9804	1011	302	0,30	0,43
Eijs9805	1015	210	0,21	2.5-10.2
Eijs9806	1009	201,9	0,20	0.39-0.69
Eijs9901	1003	56	0,06	0,08
Eijs9902	1010	68,3	0,07	0,027
Eijs9903	998	120,6	0,12	0,015
Lob9804	1015	86	0,08	0,02
Lob9805	1001	180	0,18	0.36-0.46
Lob9806	2023	37,6	0,02	0.32-0.53
Lob9901	1012	48,1	0,05	0,057
Lob9902	1009	67,4	0,07	0,025
Lob9903	1002	67,6	0,07	0,027
Con9804	1011	<0.1	0,00	0,01
Con9805	1013	<0.1	0,00	0.072-0.095
Con9806	1009	157,4	0,16	0,03
Con9901	1009	41,5	0,04	0,008
Con9902	1006	14,1	0,01	0,011
Con9903	995	1,1	0,00	0,008

Bij de ER-calux worden soms waarden als een range aangegeven. In de uitwerkingen zijn de maxima gebruikt.

Colofon

Uitgever Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA
Omslag en druk B.V. Drukkerij De Eendracht, Schiedam

RIWA Postbus 57212
NL - 1040 BC Amsterdam
Telefoon +31 (0)20 - 5840 666
Fax +31 (0)20 - 688 1641

