

**Pilot experimenten ter bepaling van  
de voor water beschikbare  
en de biobeschikbare fractie  
in olie monsters.**

**Belinda Kater, Joop Harmsen, Peter Schout, Hans Zweers, André Hannevijk**

JUNI 2000

werkdokument RIKZ/OS/2000.803x



<b>1. Inleiding .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Verschijningsvormen en metingen van minerale olie.....</b>	<b>5</b>
2.1 Het antropogene minerale oliegehalte .....	5
2.2 Het gemeten totaalgehalte aan minerale olie.....	5
2.3 Verschillende minerale oliefracties.....	6
2.4 Meting van het totaalgehalte aan olie .....	6
2.5 Meting van het beschikbare gehalte aan olie.....	7
2.6 Minerale olie in Oesterputsediment .....	8
2.7 Beschikbaarheidsmodel .....	9
<b>3. Bioassays en biobeschikbaarheid .....</b>	<b>12</b>
3.1 Biobeschikbaarheid .....	12
3.2 Bioassays .....	12
<b>4. Proefopzet.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Resultaten .....</b>	<b>15</b>
5.1 Olie metingen .....	15
5.2 Bioassay responses .....	18
<b>6. Oliemetingen en effecten .....</b>	<b>22</b>
6.1 Effecten op <i>Vibrio fischeri</i> .....	22
6.2 Effecten op <i>Corophium volutator</i> .....	23
<b>7. Conclusies en mogelijkheden voor vervolgonderzoek.....</b>	<b>27</b>
7.1 Conclusies .....	27
7.2 Vervolgonderzoek.....	27
<b>8. Literatuur .....</b>	<b>28</b>
<b>9. Bijlagen.....</b>	<b>29</b>
9.1 Oliemetingen .....	29
9.2 Bioassay responses .....	29

## 1. Inleiding

Voor minerale olie is geen maximaal toelaatbaar risico (MTR) afgeleid. In het project SPEC\*OLI (Lourens & Kater, 1998) worden effectgegevens gegenereerd om een MTR te kunnen afleiden. In 2000 zal door het RIVM in het kader van INS een MTR voor minerale olie worden afgeleid, onder andere op basis van de informatie uit het project SPEC\*OLI.

Om meer inzicht te krijgen in de toxiciteit van minerale olie is door RIKZ een studie opgezet waarin wordt samengewerkt met RIZA, AKWA, Alterra, IVM, RITOX, TNO-MEP, RIVM en WL. In deze studie bleek dat de totaal meting van minerale olie volgens NEN 5733 onvoldoende verklaring te geven voor de effecten in bioassays. Een complexerende factor is dat olie analyse bij de voor de toetsing gebruikte sedimenten een recovery van ongeveer 50% heeft. Hierdoor kwam de vraag naar voren of met deze meting het deel van de olie gemeten wordt wat verantwoordelijk is voor de effecten van olie.

Mogelijke redenen voor het ontbreken van een duidelijk relatie tussen totaalmeting en effect zijn:

- De grote verscheidenheid in minerale oliesoorten. Deze kunnen zeer vluchtig zijn (bv. benzine), maar ook zeer hoog kokend (smeerolie).
- Er is een groot verschil in de wijze waarop waterbodems en landbodems verontreinigd raken. Doordat de olie eerst via het water moet bezinken is er in een waterbodem meestal sprake van een verweerde olie, waarin de makkelijkst afbreekbare componenten al zijn verdwenen.
- Verdergaande veroudering zorgt voor een vermindering van de beschikbaarheid.
- Olie is een mengsel van zeer veel koolwaterstoffen, die elk meer of minder kunnen bijdragen aan de toxiciteit

In het experimentele deel van de boven genoemde studie is uitgegaan van een schoon sediment waaraan minerale olie is toegevoegd. Dit is gedaan om er zeker van te zijn dat er geen andere toxische stoffen aanwezig zijn. Bij deze experimenten kwam naar voren dat een deel van de minerale olie zeer zwak gebonden was aan het sediment. Deze fractie kon al door schudden met water uit het sediment worden verwijderd. Het in deze rapportage beschreven onderzoek gaat in op de invloed van deze fractie op de toxiciteit.

Centrale vraagstelling was:

Bevindt de toxiciteit voor minerale olie voor de bioassays met *Corophium* en *Vibrio* zich in de zeer zwak gebonden (waterbeschikbare) fractie?

## 2. Verschijningsvormen en metingen van minerale olie

Gehalten aan minerale olie kunnen op verschillende manieren beschreven worden:

- Het antropogene minerale oliegehalte
- Het gemeten totaalgehalte aan minerale olie
- Verschillende minerale oliefracties

### 2.1 Het antropogene minerale oliegehalte

Het antropogene minerale oliegehalte is de hoeveelheid olie, oorspronkelijk ontstaan uit ruwe olie, die door menselijke invloeden in de bodem is terechtgekomen en niet door biologische, chemische of fysische processen uit de bodem is verdwenen. In het SPEC\*OLI-project is dit de aan het sediment toegevoegde hoeveelheid minerale olie.

### 2.2 Het gemeten totaalgehalte aan minerale olie

Een meting is een zo goed mogelijke benadering van de werkelijkheid. Een oliemeting kan worden onderscheiden in een kwantificering en een kwalificering. Een probleem bij de kwalificering is dat ook van nature voorkomende verbindingen een vergelijkbare respons geven als minerale olie. Ook worden in natuurlijke processen verbindingen gevormd die ook voorkomen in van ruwe olie afkomstige minerale olie. Dit kwalitatieve aspect heeft invloed op de kwantitatieve uitkomst. Voor de meting is het noodzakelijk de olie uit de waterbodem te verwijderen middels een extractie met een oplosmiddel. Voor zo'n oplosmiddel geldt dat de hoeveelheid die wordt geëxtraheerd afhankelijk is van:

- De verdelingscoëfficiënt tussen de fase waarin de olie zich bevindt en het oplosmiddel. Olie in de bodem kan zowel als pure fase als geadsorbeerd aanwezig zijn. Bij de adsorptie kan dan nog onderscheid worden gemaakt in adsorptie van een oliefilm, waarbij de eigenschappen van de olie nog min of meer in tact zijn en adsorptie van individuele oliemoleculen.

$$\text{Hoeveelheid geëxtraheerd} = \sum \frac{\text{hoeveelheid in fase } i}{K_i}$$

$K_i$  = Verdelingscoëfficiënt tussen de betreffende fase en het gebruikte oplosmiddel

Naarmate de verdelingscoëfficiënt groter is zal er minder worden geëxtraheerd. Het rendement van de extractie kan dan worden verbeterd door de extractie één of meerdere malen te herhalen.

- De tijd. Bovenstaande formule geldt voor de situatie van evenwicht. In de bodem worden evenwichten slechts langzaam bereikt. Er zal meer worden geëxtraheerd bij langdurige contacttijden
- Bereikbaarheid. De verschillende fasen van olie kunnen op makkelijk en moeilijk bereikbare plekken aanwezig zijn. Aceton is in staat water, dat olie kan afschermen voor extractie, te verwijderen. Het laat bovendien bodemaggregaten uit elkaar vallen. Apolaire oplosmiddelen zijn in staat meer apolaire plaatsen te bereiken. Herhaaldelijk verversing van het oplosmiddel zorgt voor een extra drijvende kracht, omdat de diffusie vanuit moeilijk bereikbare plekken dan maximaal is.
- Temperatuur. Processen, dus ook extractieprocessen gaan sneller bij hogere temperatuur. Hiernaast heeft de temperatuur ook effect op de verschijningsvorm van organische stof. Bij hogere temperatuur gaat de moeilijk extraheerbare glasachtige vorm van organische stof over in een makkelijker extraheerbare rubberachtige vorm (Pignatello, 1998).

## 2.3 Verschillende minerale oliefracties

### 2.3.1 Beschikbare fracties

Voor verontreinigingen in de bodem wordt steeds duidelijker dat het gemeten totaalgehalte een overschatting is van de hoeveelheid olie die werkelijk effect heeft op de omgeving. Er komt steeds meer aandacht voor de biologisch beschikbare fractie. Dit is de fractie van de verontreiniging die interactie heeft met in de waterbodem levende organismen. Dit kan leiden tot effecten. In gunstige zin door afbraak van deze biologische fractie en in ongunstige zin door toxische effecten. Met chemische metingen kan de biobeschikbaarheid worden geschat. Twee typen metingen kunnen worden onderscheiden (Alexander et al., 2000):

1. Op water gebaseerde extracties. Dit sluit aan op de theorie dat oplossen in de waterfase bepalend is voor de biologische beschikbaarheid.
  - Directe meting van het poriewater. Deze methode is geschikt voor zware metalen en bestrijdingsmiddelen
  - Extractie vanuit de waterfase m.b.v. adsorberende fase (Solid Phase Extraction)
2. Op oplosmiddel gebaseerde extracties. De basis is veelal een totaalextractie die milder wordt gemaakt. Het gaat hierbij om een empirische benadering waarbij gemeten concentraties moeten worden gecorreleerd aan effecten.
  - Meting m.b.v. een milder oplosmiddel. Te gebruiken voor organische contaminanten door te extraheren met een water mengbaar oplosmiddel wat minder apolair is gemaakt door toevoeging van water.
  - Korter extraheren of bij een lagere energy-input dan bij een totaalextractie.
  - Extractie met mild zuur of complexvormers, te gebruiken voor zware metalen.

Voor minerale olie geldt dat directe meting in het poriewater (nog) niet mogelijk is. Tijdens de opwerking zal de olie verdwijnen door adsorptie aan de te gebruiken materialen. Gebruik van een adsorberende fase (tenax) is momenteel in onderzoek. Mildere oplosmiddelen lijken het eenvoudigst bruikbaar.

Omdat olie vaak in grote hoeveelheden voorkomt zijn ook microscopische technieken (WL) geschikt om onderscheid te maken in verschillende wijzen van voorkomen, druppels, patches, lagen en geadsorbeerd.

### 2.3.2 Kookpuntsfracties

Zowel benzine als zware stookolie kunnen worden gekwantificeerd als minerale olie. Deze producten hebben duidelijk verschillende eigenschappen. Door niet alleen een totaalgehalte te meten, maar ook de verschillende kookfracties, kan onderscheid worden gemaakt in de verschillende olieproducten. Richting toxiciteit kunnen deze gegevens worden gebruikt voor een nadere analyse. Het zal duidelijk zijn dat eenzelfde hoeveelheid benzine meer effecten zal hebben dan die hoeveelheid zware stookolie, omdat benzine veel goed oplosbare en toxische aromatische verbindingen bevat. In waterbodems komen in z'n algemeenheid geen zeer vluchtige olieproducten als benzine voor. Dit is al verdampt voordat het in de waterbodem zit en de oplosbaarheid is bovendien groot, waardoor het wordt afgevoerd via het oppervlaktewater. Olie kan starten bij C-10 en zal later starten naarmate er sprake is van meer verwerking. Er kunnen ook componenten >C-40 aanwezig zijn. Deze worden niet gekwantificeerd, maar zijn wel zichtbaar in het chromatogram.

## 2.4 Meting van het totaalgehalte aan olie

Bij de analyse van organische componenten wordt veel gebruik gemaakt van een schud- of batchextractie waarbij het monster wordt gemengd met een oplosmiddel. Vervolgens wordt de effectiviteit verbeterd door toevoer van energie. Dit kan zijn schudden, maar ook verwarmen of een ultrasoonbehandeling. Door de toevoer van energie verbetert de bereikbaarheid van de verontreiniging voor het oplosmiddel. Dit type extractie is zeer effectief als het oplosmiddel harder aan de stof trekt dan de waterbodemmatrix. Voorwaarde is wel dat het oplosmiddel in aanraking

komt met de vaste matrix. Dit vereist een verwijdering van het water, hetzij door chemisch drogen of door een eerste extractie met een meer polair oplosmiddel als aceton. Aceton heeft hierbij een tweede functie, omdat het ook bodemaggregaten uit elkaar laat vallen. Voor de analyse van PAK in uiterwaardengronden is dit essentieel voor het behalen van een goede recovery. NEN 5733 is gebaseerd op een batch-extractie.

Een tweede benadering is het monster steeds weer opnieuw in aanraking te laten komen met vers oplosmiddel, waardoor een uitputtende extractie plaats vindt. De Soxhletextractie wordt hiervoor veelvuldig gebruikt. Voor olie wordt hierbij gebruik gemaakt van een apolair oplosmiddel als petroleumether of hexaan. Omdat bodemaggregaten intact blijven is het van belang het waterbodemonster van tevoren chemisch te drogen en te vermalen. Hiervoor kan gebruik worden gemaakt van NEN 5730, waarbij de hoeveelheid natriumsulfaat wordt aangepast aan het hoge watergehalte. De beperkte bereikbaarheid wordt gecompenseerd door de langere extractieduur. Indien de olie sterk aan de bodem is geadsorbeerd zullen bij een Soxhletextractie hogere recoveries worden verkregen dan bij een batchextractie, omdat door de continue verversing van het oplosmiddel er een uitputtende extractie plaats vindt.

Voor de meeste monsters zal gelden dat de batch- en Soxhletextractie vergelijkbare gehalten zullen opleveren. Gezien de verschillende principes van de extractie zijn er echter verschillen mogelijk.

#### 2.4.1 Soxhlet > schud

Indien het gehalte gemeten met de soxhletextractie groter is dan dat gemeten met een schudextractie dan is de adsorptie aan de bodemmatrix de beperkende factor. De organische stof is hiervoor de meest bepalende factor.

Organische stof in de waterbodem heeft een andere structuur dan de organische stof in een landbodem. In een waterbodem is de droge dichtheid (massa vaste delen per volume-eenheid) veel kleiner dan in een landbodem. Dit wordt niet veroorzaakt door de minerale delen, deze dichtheid is vergelijkbaar, maar door de organische stof. Organische stof in een waterbodem is voor te stellen als een spons die het water vasthoudt en daardoor voor een volumineuze massa zorgt. In deze sponsstructuur bestaan zeer veel adsorptieplaatsen (adsorptie). Ook is het mogelijk dat de olie door organische stof wordt omgeven en daardoor moeilijk toegankelijk is voor extractie (absorptie).

#### 2.4.2 Soxhlet < schud

Als met Soxhlet minder wordt gemeten, dan is de bereikbaarheid van de olie voor het oplosmiddel van belang. De olie is bijvoorbeeld moeilijk bereikbaar als het zit in kleine afgesloten poriën of geadsorbeerd aan organische stof rond lutumdeeltjes. Deze deeltjes vormen weer een bodemaggregaat. Zolang zo'n aggregaat niet uiteenvalt zal de olie onbereikbaar zijn tenzij er gebruik wordt gemaakt van extreme extractietijden. De oplosmiddelen bij Soxhlet hebben meestal niet de eigenschappen van aceton die aggregaten uiteen laten vallen.

### 2.5 Meting van het beschikbare gehalte aan olie

Voor individuele verontreinigingen, zijn er ondertussen methoden voor het meten van de beschikbaarheid. Voor PAK kan gebruik worden gemaakt van een voor de Stowa ontwikkelde extractie met 70% azijnzuur (Doddema et al., 1998), een solid phase methode met tenax (Cornelissen et al., 1997). Resultaten kunnen worden gecorreleerd aan afbraak en effecten (Harmsen en Ferdinandy, 1999). Voor minerale olie bestaan nog geen methoden voor de meting van de beschikbaarheid. Verschillende percentages azijnzuur leveren verschillende hoeveelheden olie, maar dit kan nog niet worden gecorreleerd aan effecten. In het SPEC\*OLI-onderzoek is daarom deze toets nog als oriënterende methode gebruikt door het opnemen van een extractieprofiel (gemeten hoeveelheid olie versus % azijnzuur). De verwachting was dat met een toenemend % azijnzuur het extractierendement zal toenemen van 0 tot iets onder de 100%. Dit laatste omdat azijnzuur een minder goed oplosmiddel voor olie is en het laat, in vergelijking met aceton, de bodemaggregaten ook minder uiteenvallen.

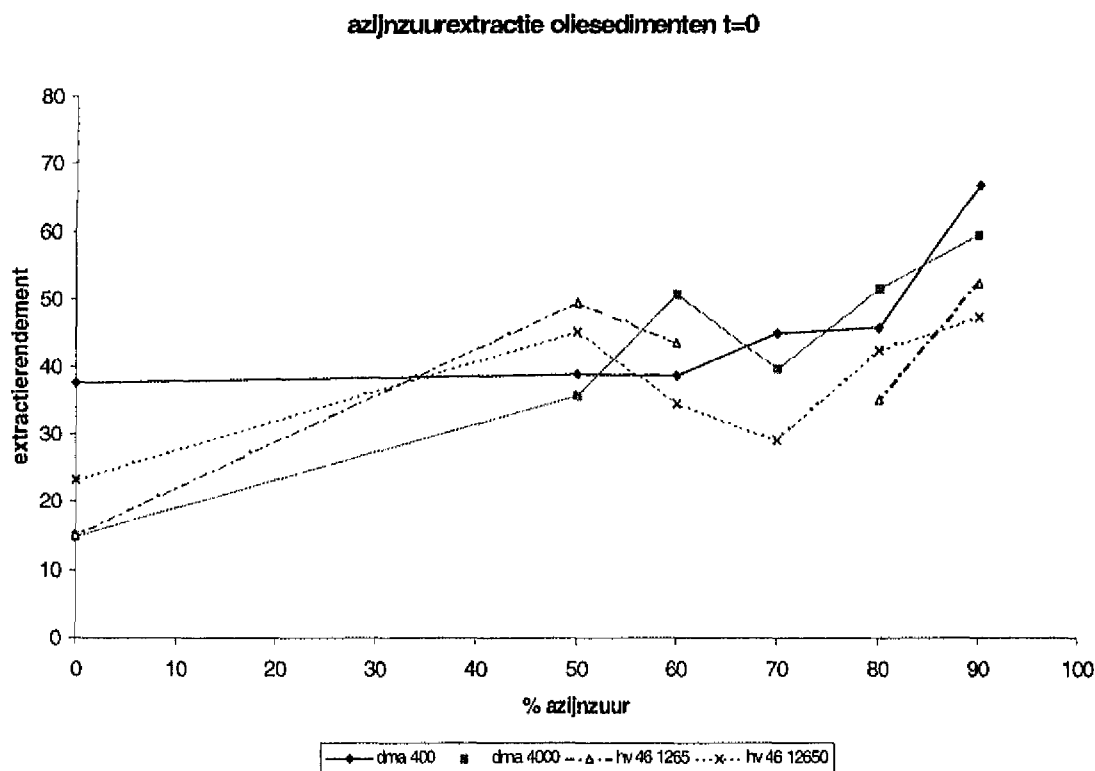
In een tweede methode wordt door eerst te zeven onderscheid gemaakt in kleine deeltjes met veel organische stof en in de grovere delen met weinig organische stof. In deze fracties is de hoeveelheid minerale olie gemeten. Verwacht werd dat de meeste olie aanwezig zou zijn in de organisch rijke fractie.

Bij het WL wordt met microscopische technieken naar olie gekeken. Dit is mogelijk vanwege het hoge gehalte, waardoor een deel van de olie als afzonderlijke fase (druppels, coating of patches) zichtbaar kan zijn.

## 2.6 Minerale olie in Oesterputsediment

Toepassen van NEN 5733 bij Oesterputsediment waaraan olie is toegevoegd, laat zien dat slechts een deel van de olie wordt teruggevonden (Harmsen en Zweers, 2000). Gemiddeld wordt slechts 50% teruggevonden. Nader onderzoek wees uit dat de fout niet in de methodiek gezocht moest worden, maar dat een deel van de olie zeer sterk wordt geabsorbeerd. De organische stof speelt hierbij een belangrijke rol.

Met extractie met verschillende percentages azijnzuur was verwacht dat er evenals bij 'natuurlijk verontreinigde' species er met hogere percentages azijnzuur ook hogere gehalten zouden worden gevonden en dat er met water (0% azijnzuur) geen olie zou worden geëxtraheerd. De werkelijkheid was echter anders en zelfs met water kon er een aanzienlijke hoeveelheid minerale olie worden 'geëxtraheerd'. In Figuur 1 is een extractieprofiel weergegeven voor een aantal monsters. Met water wordt tussen de 15 en 40% van de meetbare minerale olie geëxtraheerd, welk percentage oploopt tot 70% van het meetbare gehalte bij een percentage azijnzuur van 90%<sup>1</sup>.



**Figuur 1:** Extraheerbaarheid van minerale olie in Oesterputsediment met verschillende percentages azijnzuur op tijdstip t = 0.



Toepassing van de water en azijnzuurextractie op sedimenten uit de praktijk leveren veel kleinere te extraheren percentages op. In sedimenten uit de Eemhaven en Waalhaven kon met water en 50% azijnzuur geen aantoonbare hoeveelheid worden geëxtraheerd. In op de landfarm Kreekraksluizen behandelde sedimenten kon wel iets worden geëxtraheerd, maar was het percentage veel kleiner (tabel 1). De samenstelling van de gemeten olie is weergegeven in Harmsen en Zweers (2000).

Tabel 1: Met water en 50% azijnzuur extraheerbare minerale olie in praktijkmonsters

	Minerale olie volgens NEN 5733 (mg/kg d.s.)	Extraheerbaar met water (%)	Extraheerbaar met 50% azijnzuur (%)
Eemhaven, vers	275	0	0
Waalhaven, vers	1050	0	0
Wemeldinge, vers	1500	n.g.	14
Wemelding na landfarming 1	245	n.g.	16
2	348	n.g.	16
3	512	n.g.	22.2
Petroleumhaven vers	12000	4	10
Petroleumhaven na landfarming 1	4090	n.g.	4
2	3110	n.g.	10
3	3440	n.g.	10

n.g. = niet gemeten

## 2.7 Beschikbaarheidsmodel

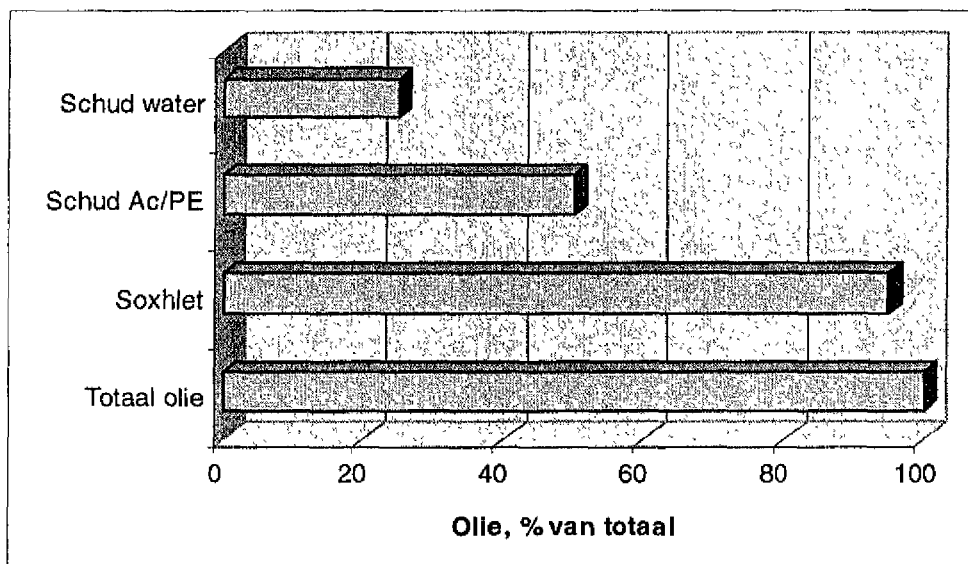
Het met verschillende extractietechnieken uitgevoerde onderzoek en het onderzoek naar de fysische verschijningsvorm (Delvigne, 1999) heeft geleid tot een indeling in verschillende fracties in de bodem. Afhankelijk van de gebruikte techniek kunnen deze fracties worden geïsoleerd (tabel 2). Onderscheid is gemaakt in zwak, sterk en zeer sterk gebonden minerale olie. deze fracties kunnen worden verwijderd met de verschillende extractietechnieken. Met water of 50% azijnzuur wordt alleen zwak gebonden minerale olie fractie verwijderd. Soxhlet en de schudmethode met aceton/PE kunnen ook sterk en een deel van de zeer sterk gebonden minerale olie extraheren. Hiernaast hebben we te maken met olie aanwezig in de vorm van druppels. Om dit onderscheid te kunnen maken is microscopisch onderzoek nodig.

<sup>1</sup> 100 % azijnzuur kon niet worden toegepast, omdat het sediment al water bevatte

**Tabel 2:** Oliefracties in waterbodem en mogelijkheid om ze uit de bodem te isoleren middels een extractie of te meten met een microscopische techniek

Vorm van olie	Mate van binding	Meetmethode			
		Schud, water of 50% azijnzuur	Soxhlet	Schud, aceton/PE	Microscopisch onderzoek
Oliedruppels, ongebonden	Zwak	+	+	+	+
Oliedruppels gebonden	Sterk	-	+	+	+
Organische stof, geadsorbeerd	Sterk	-	+	+	-
Organische stof, geabsorbeerd	Zeer sterk	-	+	-	-
Tussen minerale delen	Zeer sterk	-	-	+	-

Voor het onderzochte Oesterputsediment zijn de gemeten olie concentraties weergegeven in figuur 2. Circa 25% van de olie (extraheerbaar met water) is zwak gebonden. Dit zullen hoofdzakelijk oliedruppels zijn. Op het niveau van 4000 mg/kg d.s. toegevoegde olie is 38% van DMA in druppelvorm aanwezig en 25% van HV46 (Delvigne, 1999). De helft van de olie, het verschil tussen de mogelijkheid om de fractie te kunnen extraheren met Soxhlet of door schudden met aceton/PE, is zeer sterk gebonden. Aangezien de recovery bij Soxhlet nagenoeg 100% is zal er weinig olie opgesloten zijn in of tussen minerale delen. De zeer sterk gebonden olie is geabsorbeerd in de organische stof. Het is te verwachten dat het zwakgebonden deel de grootste toxische effecten zal geven.



**Figuur 2:** Te extraheren oliefracties met verschillende extractie methoden.

De verdeling van minerale olie over de gemeten fracties is niet constant. In de Waalhaven wordt m.b.v. de schud extractie meer verwijderd dan met de Soxhletextractie (respectievelijk 1050 en 780 mg/kg d.s.). Blijkbaar bevindt zich een deel van de olie zich in minder toegankelijke plekken tussen minerale delen. Dit is ook in overeenstemming met het hogere lutum gehalte (52% < 16 µm tegen 30% in het oesterput sediment). In de Eemhaven wordt weer meer gevonden met de Soxhlet extractie terwijl het gehalte aan deeltjes < 16 µm vergelijkbaar is (51%). De organische fractie speelt weer een rol. Bij deze waterbodem heeft (chemisch) drogen wel invloed op de opbrengst van de schudextractie, i.p.v. 275 wordt 430 mg/kg d.s. gevonden dit is zelfs nog meer

dan gevonden wordt met Soxhlet. Er is dus nog geen koppeling tussen meetmethode, organisch koolstofgehalte en deeltjesgrootte verdeling.

Tabel 3 geeft de verdeling over zwak, sterk en zeer sterk gebonden olie. Het voorkomen van zeer sterk gebonden olie is alleen gegeven als er verschil is tussen de Soxhlet en schudextractie met aceton/PE. Als beide zeer sterk gebonden fracties voorkomen zal het verschil klein en soms niet waarneembaar zijn. Dit kan worden onderkend door beide technieken na elkaar te gebruiken. Binnen het totale RIKZ-onderzoek is dit nog niet gebeurd.

**Tabel 3:** Verdeling over zwak sterk en zeer sterke bindingsplaatsen in de onderzochte species.

Waterbodem	Zwak %	Sterk %	Zeer sterk %		Toxisch effect <sup>1)</sup>
			organisch	mineraal	
Gespikd oesterput	25	25	50		Effect
Waalhaven	0	65		35	Geen
Eemhaven	0	80	20		Geen

1) bij mineraal olie gehalte 500 mg/kg d.s., gemeten volgens NEN 5733

### 3. Bioassays en biobeschikbaarheid

#### 3.1 Biobeschikbaarheid

Bij de opname van een stof speelt de biologische beschikbaarheid (biobeschikbaarheid) van stoffen een belangrijke rol. De biobeschikbaarheid is de concentratie van de stof die relevant is voor de opname. Deze is gewoonlijk lager dan de totale concentratie. De opname van stoffen wordt zowel door het organisme als door stofeigenschappen bepaald. Bij xenobiotische lipofiele stoffen in het water spelen organisme afhankelijke factoren doorgaans een minder belangrijke rol en kunnen gehalten in organismen vrij aardig vanuit stofeigenschappen voorspeld worden. Bij metalen wordt de opname voor belangrijk deel door het organisme bepaald, vanwege de uiteenlopende mineraal behoeftes.

In-vivo bioassays zijn tools waarmee de toxiciteit van sediment en/of water op organismen zichtbaar gemaakt kunnen worden. In dit pilot experiment worden twee bioassays toegepast, namelijk de bioassay met de slijkgarnaal *Corophium volutator* en een bioassay met de bacterie *Vibrio fischeri*. Van beide zijn zowel een sediment als waterfase variant beschikbaar, wat ze bruikbaar maakt voor de doelstelling van de pilot.

In een bioassay wordt een organisme blootgesteld aan een milieumonster, in dit geval een kunstmatig verontreinigd sediment of waterfase. De respons van de organismen zegt iets over de toxiciteit van het sediment. Het organisme wordt blootgesteld aan de biobeschikbare fractie. Wat deze fractie in feite inhoud is onbekend. Soms kan de biobeschikbare fractie benaderd worden door een uitschudbare of extraheerbare fractie (b.v. water, azijnzuur), soms ook niet.

#### 3.2 Bioassays

De sediment bioassay met *Corophium* is een gestandaardiseerde bioassays voor mariene sedimenten. Er is een standaardvoorschrift voor de beoordeling van baggerspecie (SPECIE\*01, 1999). De proefopzet in dit standaardvoorschrift is goed bruikbaar voor de toepassing op gespikde sedimenten. De sediment bioassay met *Corophium* is dan ook zoveel mogelijk via dit standaardvoorschrift uitgevoerd. Het eindpunt van deze bioassay is de sterfte onder *Corophium* na 10 dagen blootstelling.

De waterfase test met *Corophium* bevindt zich in het experimentele stadium. Er zijn vele waterfase testen uitgevoerd voor het afleiden van dosis-effect relaties en als controle bij de sediment test. Een beoordeling via waterfase testen met *Corophium* is nog weinig uitgevoerd. Deze test zal in deze pilot dan ook experimenteel worden toegepast. In deze bioassay wordt *Corophium* blootgesteld aan een verdunningsreeks van het uitgeschudde water. Per verdunning wordt de overleving gescoord.

*Vibrio fischeri* is een lichtgevende bacterie. Door het contact met toxicanten doven de bacteriën uit. Het principe van de bioassay is dat de bacterie wordt blootgesteld aan een verdunningsreeks, waarbij bij iedere verdunning in duplo de uitdoving ten opzichte van de blanco wordt gemeten. Eindpunt van de bioassay is die verdunning waarbij 50% van de bacteriën uitdooft.

De sediment bioassay met *Vibrio fischeri* (Microtox Solid Phase) is gestandaardiseerd voor mariene sedimenten. Ook voor deze bioassay is een standaardvoorschrift voor toepassing op baggerspecie (SPECIE-02, 1999), welke bruikbaar is voor de toepassing in deze pilot. De resultaten van de Microtox SP worden uitgedrukt als de verdunning waarbij de helft van de bacteriën lichtuitdoving ondergaat. Deze EC<sub>50</sub> wordt uitgedrukt op basis van drooggewicht. De reciproke van deze sediment EC<sub>50</sub> is het aantal Toxic Units, volgens het voorschrift het eindpunt van deze bioassay.

De waterfase bioassay met *Vibrio fischeri* is wel gestandaardiseerd, maar niet als standaardvoorschrift uitgebracht. De werkwijze van de sediment variant MSP wordt zoveel mogelijk aangehouden met de uitvoering van deze bioassay. De bioassays op water zijn met een verdunningsreeks van onverdund naar 0.012% uitgevoerd. De resultaten van de bioassay worden uitgedrukt als de verdunning waarbij 50% van de bacteriën uitdoofd, de EC<sub>50</sub>.

#### 4. Proefopzet

Om de vraag gesteld in de inleiding te kunnen beantwoorden zijn de volgende experimenten uitgevoerd:

Drie sedimenten uit het verouderingsexperiment (Kater & Schout, 2000) zijn geselecteerd voor deze pilot. De pilot is beperkt tot DMA olie. De drie geselecteerde (nominale) concentraties zijn: 1265 mg/kg, 4000 mg/kg en 40.000 mg/kg.

Daarnaast is ter controle het biologisch deel (microtox solid phase bioassay en *Corophium* waterfase bioassay) van de pilot uitgevoerd op vers gespikd 4000 mg/kg en op de blanco Oesterput uit het verouderingsexperiment.

Van ieder sediment is een monster genomen wat gedurende 20 minuten is uitgeschud met water (5 mg sediment in 50 ml water). Hierdoor ontstonden drie fracties:

- oorspronkelijk sediment
- met water uitgeschud sediment
- het schudwater

In de oorspronkelijke sedimenten zijn gemeten:

- minerale olie volgens de NEN-5733
- fractie zwak gebonden olie verkregen door schudden met water of 50%
- effecten op de *Corophium*-sediment bioassay
- effecten op Microtox Solid Phase

In de met water-uitgeschudde sedimenten zijn gemeten:

- minerale olie volgens de NEN-5733
- fractie zwak gebonden olie verkregen door schudden met water (opnieuw!) en 50% azijnzuur
- effecten op Microtox Solid Phase

In het schudwater is gemeten:

- minerale olie GC-methode voor water EN-ISO 9377-4
- effecten op de *Corophium*-waterfase bioassay
- effecten op Microtox

## 5. Resultaten

### 5.1 Olie metingen

#### 5.1.1 Het gemeten totaalgehalte

De resultaten van de metingen (zie Proefopzet) van het totaal minerale oliegehalte gemeten volgens NEN zijn weergegeven in tabel 4. Niet alleen het totaalgehalte is weergegeven, maar ook de som van de met water of 50% azijnzuur geëxtraheerde olie en het deel dat in het sediment is achtergebleven. Zo is bijvoorbeeld de som van de oliegehalten in sediment (residu) na schudden met water en in het water zelf 580 mg/kg, terwijl het totale gemeten oliegehalte 600 mg/kg was. De som moet van dezelfde grootte orde zijn als de volgens NEN gemeten gehalten en dienen als bevestiging van dit laatste gehalte. Voor de monsters waaraan 1265 en 4000 mg/kg d.s. minerale olie is toegevoegd zijn de gehalten vergelijkbaar met eerdere resultaten, ongeveer 50% wordt teruggevonden. In het nog niet eerder gemeten monster met 40.000 mg/kg is de recovery duidelijk hoger. Met dit extreem hoge gehalte zal er minder olie gebonden kunnen worden door de organische stof.

Het chromatogram van de watermonsters was vergelijkbaar met dat van de sedimentmonsters, wat betekent dat de olie door schudden gedispergeerd in het schudwater is gekomen en de samenstelling dus hetzelfde is. Het gehalte in het monster met 40.000 mg/kg d.s. minerale olie is beduidend hoger dan de oplosbaarheid van DMA (ca 10 mg/l). Het water bevatte ook een duidelijke drijf laag.

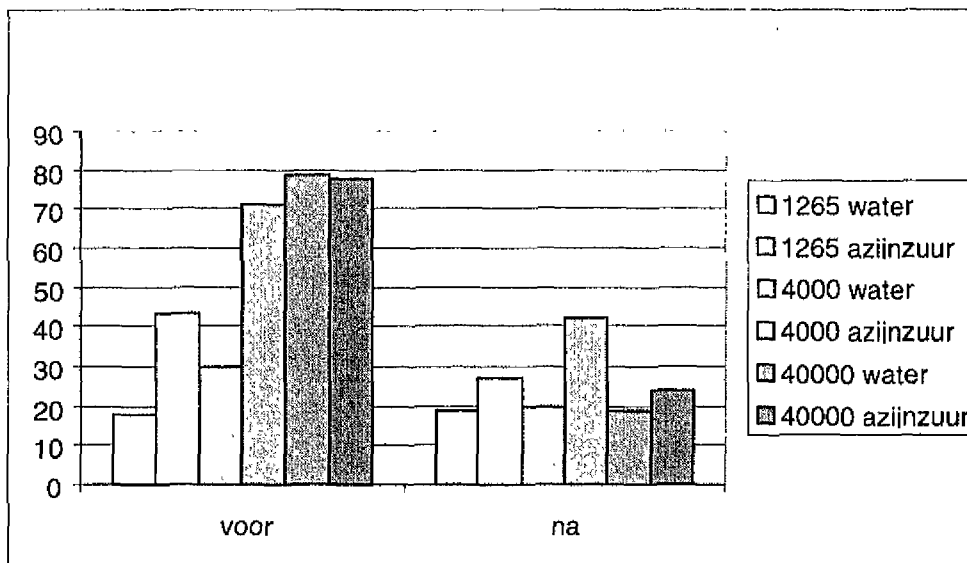
Tabel 4: Resultaten oliemetingen in Oesterputsedimenten

nominaal (mg/kg d.s.)	oorspronkelijk sediment (mg/kg d.s.)			watergeschud sediment (mg/kg d.s.)			Schudwa- ter (mg/l) Totaal olie
	Totaal olie volgens NEN	Som in residu en extract na extraheren met		Totaal olie volgens NEN	Som in residu en extract na extraheren met		
		water	50% azijnzuur		water	50% azijnzuur	
1265	600	580	670	590	540	640	2
4000	2230	1810	2390	1690	1272	1110	11
40000	33600	27700	35500	5460	11500	4550	1630

#### 5.1.2 Verschillende minerale oliefracties

In figuur 3 is de zwak gebonden oliefractie als percentage van het gemeten totaalgehalte weergegeven voor zowel de extractie met water als de extractie met 50% azijnzuur. Onderscheid is gemaakt in het oorspronkelijke sediment waaraan minerale olie is toegevoegd en het sediment verkregen na het schudden met water op het veldstation.

In het voorgaande onderzoek (fase 1 en 2) werd geconcludeerd dat 50% van het gemeten totaalgehalte (NEN 5733) zwak gebonden dus makkelijk extraheerbaar was. Er is toen echter alleen gewerkt met 400 en 4000 mg/kg d.s. DMA. De monsters met 1265 en 4000 mg/kg d.s. passen nog in dit beeld. Door toevoeging van het monster met 40.000 mg/kg d.s. wordt nu duidelijk dat er een concentratie afhankelijkheid is en dat bij hogere concentraties de hoeveelheid zwak gebonden toeneemt. Opvallend is dat na het schudden met water er nog steeds zwak gebonden minerale olie aanwezig is. Er is nu echter geen concentratie afhankelijkheid meer zichtbaar. Figuur 3 laat ook zien dat 50% azijnzuur meer olie verwijderd dan water.



**Figuur 3:** Zwak gebonden minerale oliefractie (met water of 50% azijnzuur extraheerbaar) als percentage van het totaal gemeten gehalte voor en na schudden van het sediment met water op het veldstation.

Zijn tabel 4 en figuur 3 consistent? In het sediment met 1265 mg olie kan ca 18% worden verwijderd door schudden met water (figuur 3). Het gemeten totaalgehalte na schudden daalt echter niet met dit percentage (tabel 4), maar blijft vrijwel gelijk. Nu is het echter wel zo dat de normale spreiding ook al deze grootteorde heeft. De daling van 18 % moet bij de gebruikte schudverhouding (5 tot 9 g sediment met 50 ml water) een gehalte geven van ca 11 mg/l in de waterfase (18% van het gemeten gehalte is bij een gemiddelde van 7.5 g in behandeling genomen sediment met een droge stofgehalte van 66% een hoeveelheid van 0,54 mg. Opgelost in 50 ml is dit 11 mg/l). Gemeten is echter 2 mg/l, wat veel lager is. Het watermonster had een duidelijke oliegeur, gemengd met de reuk van al geoxideerde olieverbindingen. Deze laatste zijn meer polair en worden met de olie bepaling niet meegenomen. Het verschil is echter niet verklaarbaar of het moet zijn dat door overschenken verliezen zijn opgetreden. Olie kan gemakkelijk adsorberen aan de glaswand, wat bij zo'n kleine hoeveelheid niet zichtbaar is.

In het sediment met 4000 mg/l olie wordt met water ca 30% van het meetbare gehalte verwijderd. Dit is in overeenstemming met de daling in het oliegehalte. Dit moet in het water een oliegehalte van ca 70 mg/l geven. Gemeten is echter 11 mg/l. Ook hier kan adsorptie zijn opgetreden.

De resultaten voor het sediment met 40.000 mg/l olie is spectaculair, maar liefst 79% zou verwijderbaar en dus zwak gebonden zijn. Dit wordt bevestigd door de daling in de gemeten totaalgehalten voor en na het schudden met water. In de waterfase moet hierdoor het oliegehalte ca 2800 mg/l zijn. De gemeten 1630 mg/l is van dezelfde grootteorde. Verliezen zijn bij deze concentratie minder waarschijnlijk, omdat deze hoeveelheid duidelijk zichtbaar is.

In tabel 5 is aangegeven wat de concentraties zijn waarmee rekening moet worden gehouden met de bioassays. Hierbij is voor het oorspronkelijke sediment en het met water geschudde sediment uitgegaan van de gemeten waarden. Voor de beschikbare fractie is de hoeveelheid aangehouden die met de waterextractie kan worden geëxtraheerd (figuur 1). Voor de olie concentratie in water zijn zowel de gemeten als berekende waarden weergegeven.



Tabel 5: Minerale oliegehalten in voor bioassays gebruikte monsters.

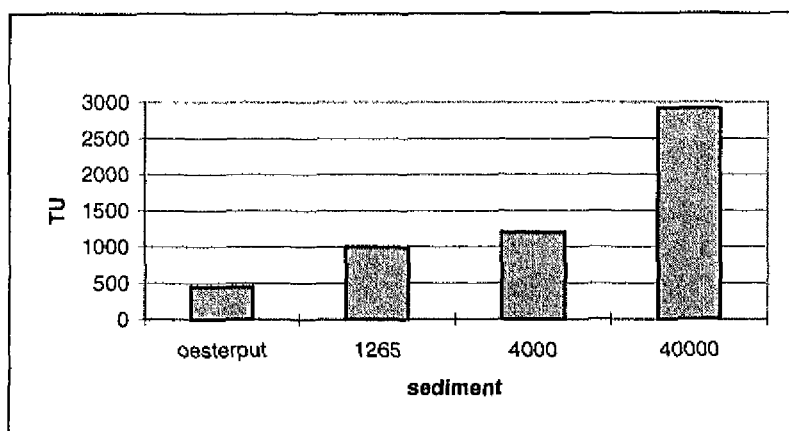
monster		Olie in sediment (mg/kg d.s.)		Olie in water (mg/l)	
		Totaal gemeten	Beschikbaar	Totaal gemeten	Berekend
Oorspronkelijk sediment	1265	600	120	2	11
	4000	2230	660	11	70
	40.000	33600	27000	1630	2800
Na schudden met water	1265	590	100		
	4000	1690	320		
	40.000	5460	1100		

## 5.2 Bioassay responses

### 5.2.1 Bioassays met *Vibrio fischeri*

Het verschil in toxiciteit tussen een verouderd en een vers-gespikd sediment is onderzocht bij de concentratie van 4000 mg/kg. De respons in het verouderde sediment bedroeg 1200 TU, in het vers gespikde sediment 750 TU. De toxiciteit lijkt iets toegenomen in de verouderingsperiode. De vervolgetperimenten kunnen worden uitgevoerd met het verouderde materiaal want de toxiciteit van het sediment voor *Vibrio* is in de verouder periode niet verminderd.

Om te onderzoeken of de MSP een respons geeft op een concentratiereeks is van het verouderde materiaal van drie concentraties en een vers Oesterput sediment de respons van MSP bepaald. Figuur 4 geeft de respons in toxic units weer.



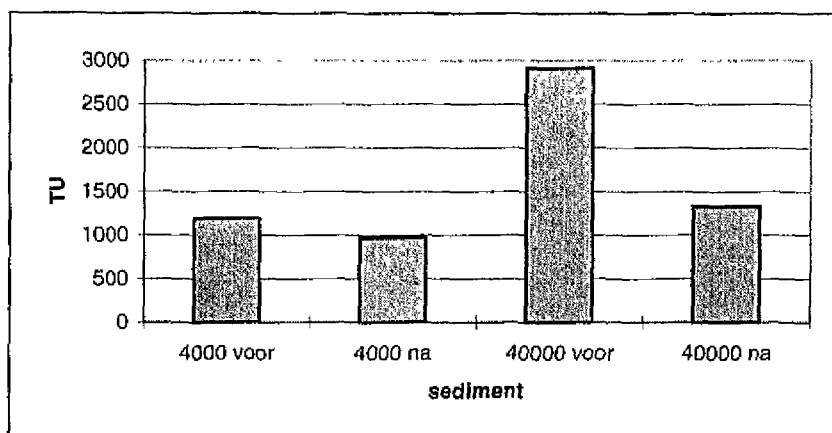
Figuur 4: Respons (toxic units) van MSP op verschillende  $t = 2$  sedimenten.

Een Oesterput sediment, wat de basis heeft gevormd van de gespikde sedimenten, heeft een respons van bijna 500 TU. De verouderde sedimenten gespikd met een concentratie van 1265 en 4000 mg/kg geven een twee maal zo grote respons van ongeveer 1000 TU. Dit is niet hoog, en ligt rond de waarde die het controle sediment (Oesterput) volgens het standaardvoorschrift geven mag. Bij een MSP kan vanaf ongeveer 1500 TU aan een werkelijk effect gedacht gaan worden (eigen waarneming). Dit betekent dat alleen het sediment oorspronkelijk gespikd met 40000 mg/kg een duidelijke respons geeft. Een soortgelijke respons is ook gevonden op veldsediment, bijvoorbeeld in het Zeehavenkanaal (Kater et al., 1999).

Om een eerste indicatie te verkrijgen van de toxische fractie zijn drie sedimenten uitgeschud met water (zie Proefopzet). Op zowel het uitgeschudde sediment als het water na uitschudden is een bioassay met *Vibrio* uitgevoerd. De sedimenten waarop deze behandeling is uitgevoerd zijn het referentie sediment (Oesterput), het verouderde sediment gespikd met 4000 mg/kg en het verouderde sediment gespikd met 40000 mg/kg. Uitvoeren van de bioassays op de sedimenten gespikd met 1265 mg/kg is zinloos omdat de lage respons (1000 TU) nauwelijks nog te splitsen is in een sediment en waterfase. Het referentiesediment wordt wel meegenomen om eventuele interferende effecten van de behandeling uit te sluiten.

Het ongeschudde, verse, ongespikde Oesterput sediment, gaf een respons van 450 TU. Na schudden met water geeft het sediment een respons van 470 TU. Het schudwater geeft geen enkele respons. Geconcludeerd kan worden dat de behandeling geen effect heeft op de respons van *Vibrio*.

De gespikte sedimenten (4000 mg/kg en 40000 mg/kg) gaven na uitschudden een lagere respons dan voor uitschudden. Dit is weergegeven in Figuur 5.



**Figuur 5:** Respons van MSP op t = 2 sediment voor en na uitschudden met water

Uit de figuur blijkt voor beide sedimenten een afname van de toxiciteit in sediment plaats te vinden nadat het sediment uitgeschud is met water. Bij een spike van 4000 mg/kg blijkt in het met water uitgeschudde sediment nog 81% van de oorspronkelijke toxiciteit terug te vinden zijn. Bij een sediment van 40000 mg/kg is dit 46%. Wanneer de responses worden gecorrigeerd voor de achtergrond waarden van 450 TU, daalt de respons op het sediment gespikd met een concentratie van 4000 mg/kg van 740 TU naar 520 TU. 70% van de oorspronkelijke toxiciteit is nog terug te vinden na uitschudden met water. De respons op sedimenten gespikd met 40000 mg/kg daalt na correctie voor de achtergrond toxiciteit van 2470 TU naar 880 TU, waarbij dus 36% van de oorspronkelijke toxiciteit na schudden met water nog in het sediment is terug te vinden.

Op de hoogste sediment concentratie, 40000 mg/kg, zijn bioassays met *Vibrio* uitgevoerd op het sediment voor en na het schudden, en op het schudwater. Het resultaat van een bioassay met *Vibrio* op een waterfase wordt uitgedrukt in het percentage verdunning van het water nodig om 50% doving van de bacterie te verkrijgen. Dit getal kan niet worden omgezet in TU, omdat er geen drooggewicht van sediment aanwezig is (het is immers een waterfase test). De resultaten van de sediment test kunnen wel als % worden uitgedrukt, namelijk het percentage verdunning van het sediment (met water) waarbij 50% doving optreedt. Daarom worden voor het vergelijken alle resultaten hieronder op basis van EC50 waarden (% verdunning) uitgedrukt.

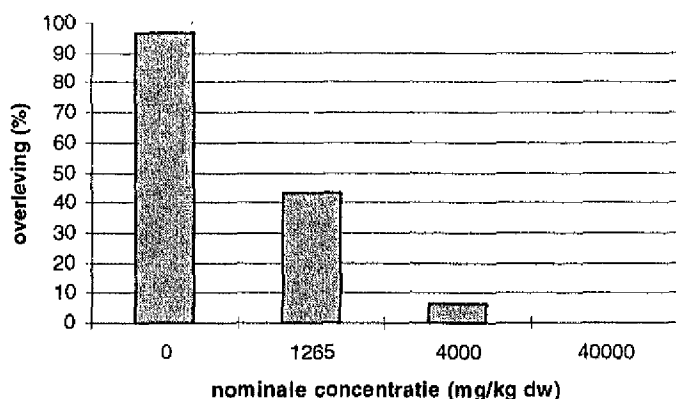
Voor de sediment bioassay wordt het sediment voor de start van de bioassay 1:5 uitverdund met water. Dit betekent dat het resultaat met een factor 5 verhoogd moet worden om deze vergelijkbaar te maken met de waterfase bioassay. Tabel 6 geeft de resultaten van de drie bioassays weer. Uit de respons van het oorspronkelijke en geschudde sediment kan de verwachte waarde voor de waterfase worden berekend. Deze bedraagt 0.24%. De gevonden respons ligt iets hoger, nl. 0.38%, maar met een 95% betrouwbaarheidsinterval lopende van 0.22% tot 0.65%. Deze resultaten laten zien dat verwacht mag worden dat er geen toxiciteit verloren is gegaan met de gebruikte methode, en dat de resultaten op elkaar aansluiten.

**Tabel 6:** *Vibrio* bioassays op oorspronkelijk en geschud sediment, en op het schudwater (allen afkomstig van de spike met 40000 mg/kg).

fase	(gecorrigeerde) EC50 (WW)	95% ondergrens	95% bovengrens
oorspronkelijk sediment	0.31%	0.18%	0.51%
geschud sediment	0.55%	0.45%	0.75%
schudwater	0.38%	0.22%	0.65%

### 5.2.2 Bioassays met *Corophium volutator*

In het verouderingsonderzoek (Kater & Schout, 2000) is de bioassay met *Corophium* uitgevoerd op 0, 1265, 4000 en 40000 mg DMA/kg DW. Figuur 6 geeft de overleving en concentratie weer.

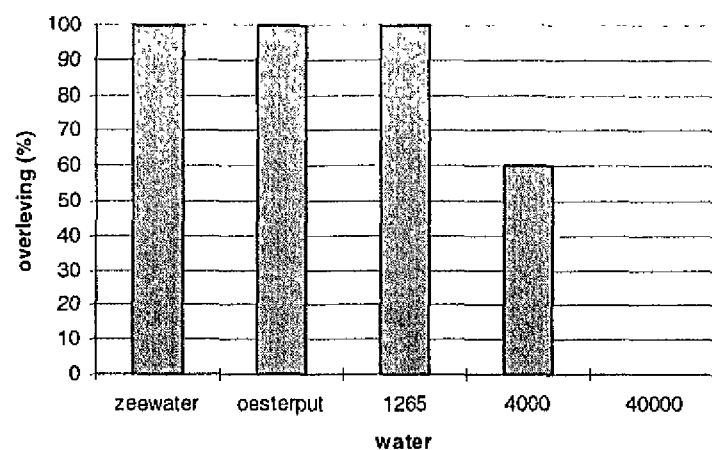


**Figuur 6:** Overleving van *Corophium* op verouderde sediment ( $t = 2$ ).

De vier sedimenten zijn met water uitgeschud, en op het schudwater is een waterfase bioassay met *Corophium* uitgevoerd. Deze bioassays zijn uitgevoerd op een verdunningsreeks. Van het uitgeschudde water werd 40 ml afgemeten. De saliniteit van dit water was te laag voor *Corophium*. Door 5 ml gefiltreerd zeewater toe te voegen aan de 40 ml schudwater werd een saliniteit van 5 promille bereikt, waarbij *Corophium* prima overleefd (Houzee, in prep.). Deze oplossing bestond voor 89% uit het oorspronkelijke schudwater. De oplossing is doorverdund in de reeks 44%, 22%, 11%, 5.6% en 2.8% van het oorspronkelijke schudwater, waarbij telkens een oplossing van 45 ml werd verkregen, met een gelijke saliniteit (5 promille). De oplossingen zijn in kleine potjes van 100 ml gedaan, en aan ieder potje zijn 5 *Corophium* toegevoegd. Ter controle is een 89%-oplossing van Oesterputwater toegevoegd en drie gefiltreerd zeewater oplossingen. Alle potjes zijn belucht middels pasteurse pipetten. Na drie dagen is de overleving per potje gescoord.

De overleving op het gefiltreerde zeewater was goed, 93% van de dieren overleefde de test. Dit betekent dat het testsysteem geen beperking voor de overleving is. Op het 89%-Oesterput water overleefde 100% van de organismen, wat laat zien dat het gekozen zoutgehalte inderdaad niet bezwaarlijk is.

Het verdunde schudwater uit de 1265 mg/kg leverde geen mortaliteit onder *Corophium* op. Bij het water uit de 4000 mg/kg trad in de 89%-oplossing sterfte op. Geen enkele oplossing van 40000 mg/kg werd door *Corophium* overleefd. Figuur 7 geeft de overlevingspercentages bij de 89%-oplossing te zien.



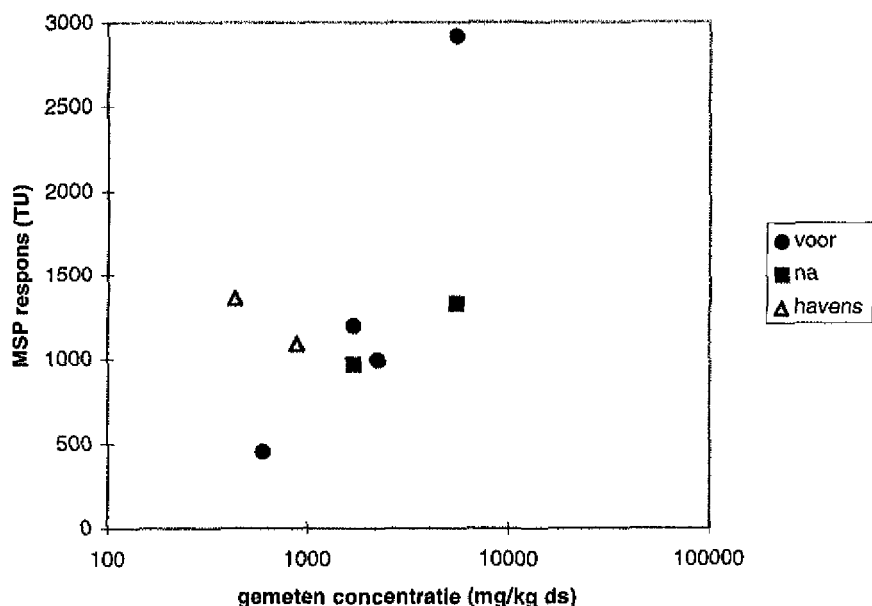
**Figuur 7:** Overleving in water uit verschillende olie sediment concentraties (89% van oorspronkelijke water).

## 6. Oliemetingen en effecten

### 6.1 Effecten op *Vibrio* fisheri

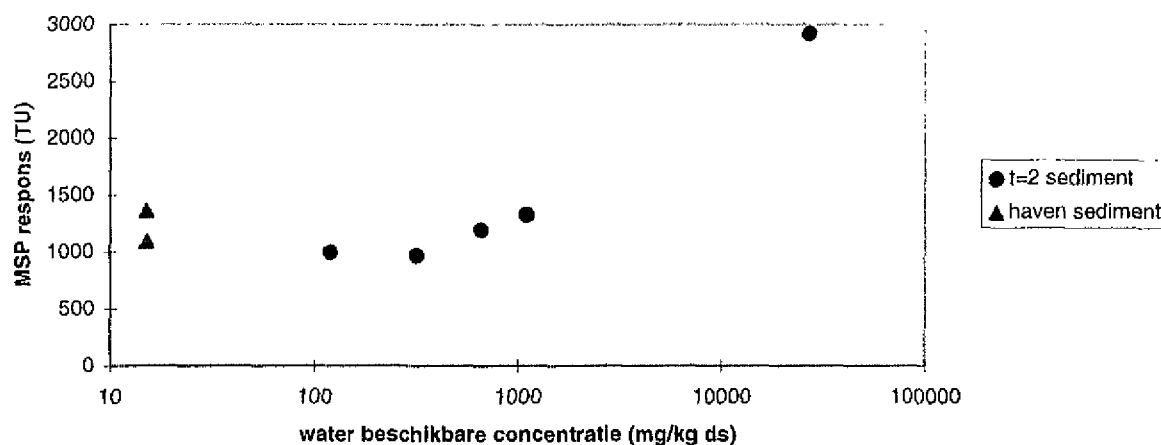
Uit de resultaten kan een relatie tussen de gemeten concentratie in het ongeschudde en geschudde sediment en respons van *Vibrio* worden afgeleid. Figuur 8 laat deze relatie zien. Uit de figuur valt af te leiden dat voor de meeste olie concentraties de toxiciteit onder de 1500 TU ligt. De toxiciteit van sedimenten met een respons hoger dan 1500 TU onder de 1500 TU daalt na uitschudden met water. Middels lineaire regressie kan worden vastgesteld dat bij een gemeten concentratie van meer dan 5000 mg/kg d.s. de MSP een respons zal geven dit als toxisch bestempeld kan worden (i.e. > 1500 TU).

In de figuur zijn tevens de resultaten van de bioassay met *Vibrio* (Brils et al., 2000) en de gemeten gehalten in twee Rotterdamse havens (Waalhaven, Eemhaven) te zien. De resultaten van deze sedimenten laten sluiten aan bij het reeds verkregen beeld dat gemeten concentraties onder de 5000 mg/kg d.s. niet toxisch zijn voor MSP.



**Figuur 8:** Relatie tussen de gemeten DMA concentratie (voor en na uitschudden met water) en de respons van *Vibrio* en de respons van *Vibrio* op sedimenten uit de Rotterdamse haven.

De relatie tussen de water-beschikbare, zwak gebonden fractie, en de respons van *Vibrio* op de sedimenten voor en na uitschudden, is te vinden in Figuur 9. Aan deze figuur is tevens de respons van *Vibrio* op sedimenten (Brils et al., 2000) uit de Waal- en Eemhaven in het Rotterdamse havengebied toegevoegd. De beschikbare fractie was niet detecteerbaar in deze monsters (Harmsen & Zweers, 1999). Ten behoeve van de leesbaarheid van de figuur is deze in de figuur op 15 mg/kg gezet. De figuur laat zien dat de respons van *Vibrio* redelijk constant is tot een beschikbare concentratie van ongeveer 1100 mg/kg ds. Tussen deze concentratie en de concentratie van 27000 mg/kg d.s. ligt een punt waarop de respons de gestelde grens van 1500 TU passeert. Uit deze gegevens wordt niet duidelijk welke concentratie dit is.

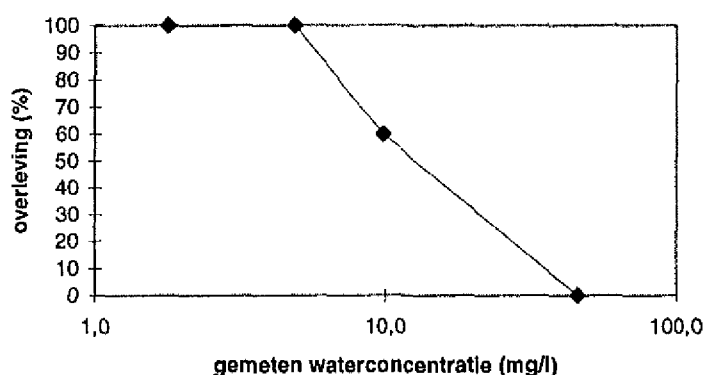


**Figuur 9:** Respons van *Vibrio* op uitgeschudde en niet uitgeschudde t=2 sedimenten, en op sedimenten uit de Rotterdamse havens als functie van het beschikbare gehalte.

## 6.2 Effecten op *Corophium volutator*

Uit de gemeten concentraties in het schudwater (tabel 4: olie in water; totaal gemeten) kan middels de gebruikte verdunning de concentratie in de *Corophium* testpotjes worden berekend. Dit is uitgevoerd voor de 89%-verdunningen van 1265 en 4000 mg/kg, de 44%-verdunning van 4000 mg/kg en de 2.8%-verdunning van 40000 mg/kg. Figuur 10 geeft de dosis-effect relatie weer. Alle overige punten bevinden zich op de 100%-overleving lijn bij een concentratie kleiner dan 5 mg/l, of op de 0% overleving lijn bij concentraties hoger dan 50 mg/l. Middels DEBTOX (Kooijman & Bedaux, 1996) is een  $LC_{50}$  van 10.3 mg/l te berekenen, een  $LC_{10}$  van 9.0 mg/l en de NEC wordt berekend op 8.4 mg/l. Figuur 10 laat de relatie tussen de gemeten concentratie in het water en de respons van *Corophium* zien.

Wanneer wordt uitgegaan van de berekende concentraties in schudwater (tabel 4: olie in water; berekend) schuift de curve op naar rechts.



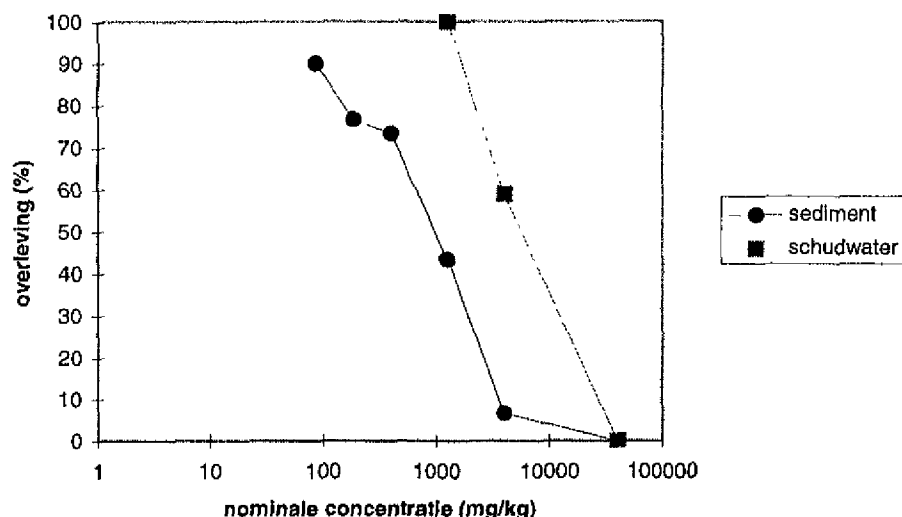
**Figuur 10:** Relatie tussen de concentratie in het schudwater en de overleving van *Corophium*

Om vast te kunnen stellen of de toxische fractie voor *Corophium* zich in de water uitschudbare fractie bevindt is per nominale concentratie waar mogelijk de overleving op sediment en op schudwater verzameld. Hiertoe is voor iedere concentratie geschat of berekend wat de overleving zou zijn op 100% schudwater op de juiste saliniteit.

De overleving op het schudwater uit 1265 mg/kg was bij de 89%-verdunning 100%. Er is van uitgegaan dat dit bij onverdund schudwater ook het geval zou zijn.

De overleving op 89% schudwater uit 40000 mg/kg was 0%. Op onverdund schudwater zal de overleving ook 0% zijn.

Voor de schatting van de overleving met water uit sediment gespikd met 4000 mg/kg is DEBTOX gebruikt (Kooijman & Bedaux, 1996). Bij een hypothetische situatie waarbij het schudwater niet was aangelengd met zeewater (100% schudwater), maar met wel de juiste saliniteit kan door DEBTOX berekend worden dat 59% van de organismen zal sterven. Wanneer de berekeningen voor schudwater naast de respons op sediment wordt gezet, kan Figuur 11 worden getekend. De figuur laat zien dat de toxiciteit in het sediment niet volledig met de toxiciteit in het schudwater verklaard kan worden.



**Figuur 11:** Relatie tussen nominale concentratie in het sediment en overleving op sediment en in schudwater (*Corophium* bioassay).

Tenslotte is de relatie tussen de beschikbare concentratie en het effect bekeken. Hiertoe is van de oorspronkelijke sedimenten de voor water beschikbare concentratie bepaald (zie tabel 4) en gekoppeld aan de overleving op dit sediment (Figuur 12). Aan deze data zijn de gevonden beschikbare concentraties en *Corophium* responses op de sedimenten uit de Rotterdamse havens toegevoegd. Daarnaast zijn de voor 50% azijnzuur beschikbare concentraties van DMA en HV46 uit  $t=0$  en uit het onderzoek op sedimenten afkomstig van de Kreekraksluizen bepaald (Keijzers et al., 1999). De voor 50% azijnzuur beschikbare concentraties liggen iets hoger dan de voor water beschikbare concentratie. In de Kreekraksluis sedimenten zitten ook andere (bekende en onbekende) verontreinigingen die een effect op *Corophium* zouden kunnen hebben. PAK kan hierbij redelijk worden uitgesloten omdat de concentraties die in de Kreekraksedimenten worden gevonden te laag ( $\pm 20$  mg/kg) zijn om een effect bij *Corophium* te veroorzaken.

Met bovenstaande kanttekeningen in gedachte kan met behulp van Graphpad (GraphPad, 1999) een dosis-effect relatie worden afgeleid tussen de beschikbare concentratie en de overleving van *Corophium*. De  $LC_{50}$  ligt bij een bij 112 mg/kg d.s., met een 95% betrouwbaarheidsinterval die van 45.6 tot 278 mg/kg d.s. loopt.

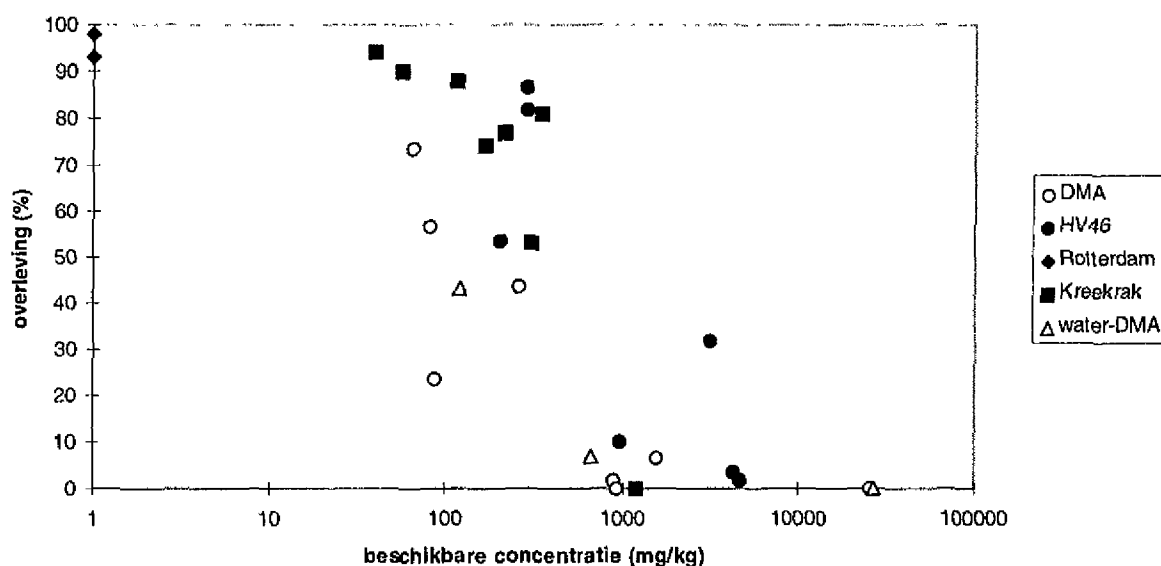


Vergelijken we de relatie tussen de azijnzuur/water beschikbare fractie en de overleving met de relatie tussen de met NEN5733 vastgestelde concentratie en de overleving (Figuur 13), dan kan geconcludeerd worden dat de relatie tussen de azijnzuur/water beschikbare fractie en de overleving beter beschreven kan worden dan de relatie tussen NEN5733 en de overleving (tabel 7), daar bij een lagere n een hogere  $r^2$  wordt gevonden.

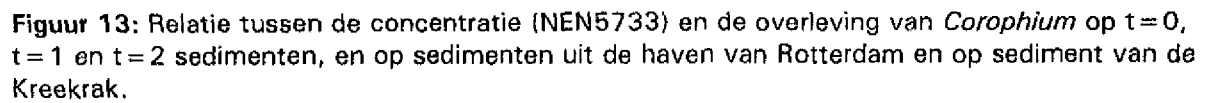
**Tabel 7:** Kenmerken van de relatie tussen overleving en water/azijnzuurbeschikbare fractie en overleving en concentratie met NEN5733.

LC <sub>50</sub>	175	1153
ondergrens 95% b.i.	103	595
bovengrens 95% b.i.	2296	2235
n	28	49
$r^2$	0.65	0.43

opm: analyses uitgevoerd met GraphPad met vaste top en bottom



**Figuur 12:** Relatie tussen de voor water of azijnzuur beschikbare concentratie en de overleving van *Corophium* op t=0, t=1 en t=2 sedimenten, op sedimenten uit de haven van Rotterdam en op sedimenten van de Kreekrak.



## 7. Conclusies en mogelijkheden voor vervolgonderzoek

### 7.1 Conclusies

Het onderzoek in de hier uitgevoerde pilot was gericht op de vraag of de toxiciteit van olie voor *Corophium* en *Vibrio* in de zeer zwak gebonden fractie zat. Uit de pilot kunnen een aantal voorzichtige conclusies worden getrokken die nader onderzocht kunnen worden. Deze conclusies op basis van de pilot resultaten zijn:

#### *Vibrio fisheri* :

- De soort lijkt niet zo heel erg gevoelig voor olie toxiciteit.
- De toxische fractie lijkt zich in de water-extraheerbare fractie te bevinden.
- De NEN5733 methodiek lijkt voor *Vibrio* de volledige toxische fractie te meten.

#### *Corophium volutator*:

- De toxische fractie wordt deels in de water extraheerbare fractie teruggevonden, maar de toxiciteit lijkt niet volledig met de water-extraheerbare fractie verklaard te worden; onduidelijk blijft welke extraheerbare fractie (azijnzuur, aceton) wel de toxiciteit volledig kan verklaren,
- Het blijft onduidelijk of de NEN5733 methodiek de volledige toxische fractie voor *Corophium* meet.
- De water en azijnzuurbeschikbare fractie lijken een betere dosis-effect relatie te geven dan NEN5733. Voor normstellingsdoeleinden is de water/azijnzuur extractie echter nog niet voldoende uitgewerkt.

Tenslotte blijkt uit de resultaten dat na 9 maanden verouderen middels opslag bij 15 °C van met olie gespikte sedimenten de veldsituatie (nog) niet wordt nagebootst.

### 7.2 Vervolgonderzoek.

- Voor zowel *Vibrio* als *Corophium* kan een volledig c.q. verbeterd "beschikbaarheidsprofiel" gemaakt worden. Met behulp van dit profiel kan uit de beschikbare concentratie de bioassay respons geschat worden.
- Het vervolgonderzoek voor *Corophium* zou zich kunnen richten op de vraag of in de achtergebleven sedimentsfractie na uitschudden met water inderdaad nog toxiciteit terug te vinden is. Dit zou de hypothese dat de water-extraheerbare fractie niet de volledige toxische fractie is kunnen onderschrijven. Vervolgens is het mogelijk eenzelfde extractie opnieuw uit te voeren, omdat uit de resultaten van de olie analyses bleek dat met één maal water extraheren niet de volledige water-extraheerbare fractie geëxtraheerd kon worden.
- Om de meet- en rekenfouten ontstaan door het maken van een brakke oplossing van het schudwater te voorkomen kan onderzocht worden of de waterextractie ook met zoutwater (gefiltreerd zeewater) kan worden uitgevoerd.
- Onderzocht moet worden of het mogelijk is verdere extracties uit te voeren en de geëxtraheerde sedimenten en de residuen met *Corophium* op hun effect te beoordelen. Hierbij moet rekening worden gehouden met de levenswensen van *Corophium*. Pas wanneer kan worden aangetoond dat na een bepaalde extractie de toxiciteit van olie voor *Corophium* verdwenen is, kan een conclusie worden getrokken over de geschiktheid van de NEN analyse in relatie tot effect.
- De verdeling van minerale olie in chemisch opzicht, lijkt in de gebruikte Oesterputsedimenten af te wijken van de verdeling in veldmonsters. Het in deze rapportage beschreven verdelingsmodel van minerale olie dient getoetst te worden aan praktijkmonsters door gelijktijdig deze verdeling en de toxiciteit te meten.

## 8. Literatuur

Alexander M., Chaney R., Cunningham S.J., Harmsen J. & Hughes J.B. , 2000 , *Chemical Measures of bioavailability*. (SETAC-publication, in prep).

Brils J.M., Huwer S.L. & Scholten M.C.T., 2000  
Oil effect concentrations in freshly spiked, marine sediments for luminescent bacteria, mud shrimps and sea urchins. TNO-MEP.

Delvigne, G., 1999. Fysische verschijningsvorm van olie in sediment. WL Delft.

GraphPad, 1999. GraphPad Software Inc. San Diego, U.S.A.

Harmsen J. & Zweers A.J., 2000  
Effectconcentratie olie in sediment: chemische verschijningsvorm. Alterra rapport 011, ISSN 1566-7197.

Kater B.J., Hannewijk A. & Schout P.G., 2000  
Bioassays op sedimenten uit het Zeehavenkanaal. RIKZ werkdokument RIKZ/OS/2000.845x. Kamperland.

Kater B.J. & Schout P.G., 2000  
Effecten van het veruderen van olie op de respons van *Corophium volutator*. RIKZ werkdokument RIKZ/OS-99.864x. Kamperland.

Keijzer R., Dubbeldam M., Peene E. & Postma J.F., 1999  
Bioassays voor het landfarming project bij de Kreekraksluizen. Najaar 1999. AquaSense rapport 00.1486.

Kooijman S.A.L.M. & Bedaux J.J.M., 1996  
The analysis of aquatic toxicity data. VU University Press, Amsterdam.

Lourens J. & Kater B., 1998  
Productplan genereren van effectdata voor MTR olie in sedimenten.

Pignatello, J.J. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic matter. Adv. Colloid Interf. Sci. 76-77: 445-476.

SPECIE\*01, 1999  
Standaardvoorschrift SPECIE-01. Sediment toxiciteitstest *Corophium volutator*. Versie 1.1. Schipper C.A., Burgess R.M., Van den Dikkenberg L.C., Kater B.J. & Stronkhorst J. In: RIKZ Handboek Toxiciteitstesten voor zoute baggerspecie. Ed: C.A. Schipper & J. Stronkhorst. Nota RIKZ/99.012.

SPECIE\*02, 1999  
Standaardvoorschrift SPECIE-02. Sediment toxiciteitstest Microtox Solid Phase. Versie 1.1. Schipper C.A., Burgess R.M., Schot M.E., Kater B.J. & Stronkhorst J. In: RIKZ Handboek Toxiciteitstesten voor zoute baggerspecie. Ed: C.A. Schipper & J. Stronkhorst. Nota RIKZ/99.012.

## 9. Bijlagen

### 9.1 Oliemetingen

Met water en 50% azijnzuur extraheerbaar percentage en totaal concentratie olie in met DMA resp. HV46 geaddeerde monsters op T=2 (okt. 1999)

	Percentage extraheerbaar		(som extract + residu (mg/kg ds)	
	water	50 % azijnzuur	water	50% azijnzuur
<b>DMA</b>				
400	25	44	266	276
1265	18	43	580	671
4000	30	71	1811	2393
40.000	79	77	27685	35496
<b>HV 46</b>				
1265	28	38	429	469
4000	38	33	1663	1438
12650	54	64	6575	6629
40000	67	50	13230	12766

### 9.2 Bioassay responses

#### 9.2.1 Vibrio fisheri

##### Resultaten microtox olie

Behandeling	EC <sub>50</sub> ww	EC <sub>50</sub> dw	TU <sub>50</sub> dw
DMA 4000 sediment T = 2 voor uitschudden	0,15 (0,12-0,19)	0,0837 (0,0657-0,1067)	1195 (937-1522)
DMA 4000 sediment T = 0 voor uitschudden	0,21 (0,18-0,25)	0,13 (0,11-0,16)	744 (629-880)
DMA 4000 sediment T = 2 na uitschudden	0,17 (0,10-0,27)	0,10 (0,06-0,17)	969 (600-1566)
DMA 1265 sediment T = 2 voor uitschudden	0,18 (0,16-0,21)	0,10 (0,09-0,12)	994 (850-1164)
DMA 40000 sediment T = 2 voor uitschudden	0,0623 (0,0361-0,1075)	0,0343 (0,0199-0,0592)	2917 (1690-5036)
Oesterput sediment na uitschudden	0,34 (0,30-0,38)	0,21 (0,18-0,24)	474 (415-541)
DMA 40000 water na uitschudden	0,38 (0,22-0,65)		
Oesterput water na uitschudden	niet te bepalen		
DMA 40000 sediment T = 2 na uitschudden	0,11 (0,09-0,15)	0,0753 (0,0584-0,0971)	1328 (1029-1714)
Oesterput sediment voor uitschudden	0,35 (0,35-0,36)	0,22 (0,22-0,23)	452 (441-462)

### 9.2.2 Corophium volutator

#### *Corophium* waterfasetest in klein potje

	overleving (aantal)				
	zeewater	1265	4000	40000	oesterput
A (89%)	5	5	3	0	5
B (44%)	4	5	5	0	
C (22%)	5	5	5	0	
D (11%)		5	5	0	
E (5.6%)		5	4	0	
F (2.8%)		5	5	0	