

Toxiciteit van mariene en estuariene sedimenten

Hyalella azteca experimenten en CALUX-analyses, 2003

Toxiciteit van mariene en estuariene sedimenten

Hyalella azteca experimenten en CALUX-analyses, 2003

in opdracht van	Rijksinstituut voor Kust en Zee / RIKZ
------------------------	--

Uitvoering door	ing. M.B. Jansen; F. Kaiouh; S. Dalbessingh; ing. C.M. Keijzers; Dr. J.F. Postma
namens opdrachtgever	mevrouw drs. M.J. van den Heuvel-Greve mevrouw drs. B.J. Kater

rapportnummer	code opdrachtgever	status
2335	67030890	Analyserapport

autorisatie	naam	paraaf	datum
opgemaakt	C.M. Keijzers		
gecontroleerd	Dr. J.F. Postma		
goedgekeurd	Dr. J.F. Postma		

Citeren als: AquaSense (2003). Toxiciteit van mariene en estuariene sedimenten Hyalella azteca experimenten en CALUX-analyses, 2003. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee / RIKZ. Rapportnummer: 2335.

Inhoud

1.	Inleiding	3
2.	Methode	5
	2.1. Bemonstering en voorbehandeling	5
	2.2. Beschrijving werkwijze.....	5
	2.2.1. Bioassays met <i>Hyalella azteca</i>	6
	2.2.2. DR-CALUX	7
3.	Resultaten en discussie	9
	3.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden	9
	3.2. Resultaten	10
4.	Literatuur.....	11
	Bijlagen	13

1. Inleiding

In opdracht van het Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ) heeft AquaSense de toxiciteit van een aantal mariene en estuariene sedimenten bepaald t.b.v. project MAATLAT. Met vier sedimenten afkomstig uit het Haringvliet zijn 10-daagse bioassays uitgevoerd met de amphipode *Hyalella azteca*. De toxiciteitstest werd uitgevoerd conform de methode beschreven in EPA 600/R-99/064 (March 2000). Daarnaast zijn DR-CALUX analyses uitgevoerd met sedimenten afkomstig uit het Haringvliet (4), de Westerschelde (2) en het Veerse meer (1).

Naast een overzicht van de gebruikte methoden worden de resultaten van de analyses weergegeven en kort bediscussieerd.

2. Methode

2.1. Bemonstering en voorbehandeling

Per monster werd ongeveer 1 liter in een glazen pot door het RIKZ aangeleverd. In het laboratorium te Amsterdam werden de monsters direct na binnenkomst geregistreerd en voorzien van een AquaSense monsternummer (Ecolims-nummer). De potten van ieder monster werden voor gebruik handmatig gehomogeniseerd. Tot het moment van gebruik werden de sedimentmonsters in het donker bij 5 °C in een koelcel opgeslagen.

In tabel 2.1 worden de gegevens van de sedimentmonsters en de Ecolimsnummers weergegeven.

Tabel 2.1 Bijzonderheden van de sedimentmonsters.

Ecolimsnr.	Lokatie	Omschrijving	Monsterdatum
329414	Haringvliet	HV 31	18-09-2003
329415	Haringvliet	HV 40	18-09-2003
329416	Haringvliet	HV 50	18-09-2003
329417	Haringvliet	HV 65B	18-09-2003
329418	Westerschelde	T0 Terneuzen	08-09-2003
329419	Westerschelde	TW Terneuzen	08-09-2003
329422	Veerse meer	VM Veerse meer Blanco	18-09-2003

2.2. Beschrijving werkwijze

Hierna volgt een beknopte beschrijving van de wijze waarop de bioassays met de sedimentmonsters zijn uitgevoerd. Voor een gedetailleerdere beschrijving van de bioassays wordt verwezen naar de verschillende richtlijnen.

2.2.1. Bioassays met *Hyalella azteca*

De toxiciteitstest met de amphipode *Hyalella azteca* werd uitgevoerd volgens de methode beschreven in EPA 600/R-99/064 (March 2000).

Met het sediment werd een mengsel aangemaakt bestaande uit 30 gram sediment (natgewicht) en 120 ml medium (Borgmann-medium). Per monster werden 4 van deze sediment/water-systemen gemaakt. De sediment/watersystemen werden gedurende enkele dagen voor het inzetten van de test bewaard bij 5 °C. Per sediment/watersysteem werden *ad random* 20 juvenielen (7-14 dagen oud en een leeftijdsverschil ≤ 2 dagen) van de amphipode *Hyalella azteca* ingezet. Dagelijks werden de juvenielen gevoerd met 1 ml van een YCT-oplossing (Yeast Cerophyl Trout chow). De testvaatjes werden bij 23 °C geplaatst en continue belucht. Na 10 dagen werden de amphipoden voorzichtig over een zeef met een maaswijdte van 220 μm uitgespoeld. Het aantal amphipoden werd geteld en vervolgens werd het drooggewicht per replica bepaald. Hieruit werd het gemiddelde drooggewicht per amphipode afgeleid. Tevens werd het gemiddelde drooggewicht bepaald van de dieren op dag 0. Hiermee werd vervolgens de toe- danwel afname van het gewicht berekend (groei).

Als referentie voor de beoordeling van de sedimentmonsters werd sediment uit het Drontermeer getest dat dezelfde behandeling heeft gehad als de sedimentmonsters.

In verband met mogelijke effecten van fysische en chemische parameters als zuurgraad, zuurstofgehalte, geleidbaarheid, nitriet en ammoniumgehalte op de organismen werden vlak voor het inzetten van de testen en aan het einde van de experimenten in het blanco- en het onverdunde testmedium (boven het sediment staande water) de volgende fysische en chemische parameters semi-kwantitatief gemeten:

- Zuurgraad (met pH-meter);
- Zuurstofgehalte (met zuurstofelectrode);
- Nitrietgehalte (met Merck-testkit);
- Ammoniumgehalte (met Merck-testkit);
- Geleidbaarheid (met geleidbaarheidsmeter).

Voor de bioassay zijn randvoorwaarden gesteld aan deze parameters als kwaliteitsborging. Indien aan deze randvoorwaarden wordt voldaan, worden geen effecten verwacht op de organismen.

Met behulp van de ANOVA- en de post-hoc Bonferoni T-test werd getoetst of de waarnemingen voor één van de volgende parameters significant ($P \leq 0,05$) verschilde van de referentie:

- gemiddelde sterfte;
- groei van de testorganismen.

Hierbij werd gebruik gemaakt van het SPSS-softwarepakket (Norusis, 1992). Indien niet aan de voorwaarden voor parametrische testen werd voldaan, werden de gegevens log-getransformeerd. Indien ook na transformatie niet kon worden

voldaan aan de randvoorwaarden voor het mogen uitvoeren van parametrische testen, werd gebruik gemaakt van de verdelingsvrije (niet-parametrische) Kruskal-Wallis test.

2.2.2. DR-CALUX

Gechlororeerde dibenzodioxines (kortweg dioxines) zijn stoffen, die chemisch-analytisch lastig en tegen vrij hoge kosten zijn te analyseren. Toch speelt juist deze groep in verband met mogelijke risico's via doorvergiftiging vaak een belangrijke rol in een ecologische risico beoordeling. Daarnaast bestaat deze groep uit vele verschillende stoffen met een vergelijkbaar werkingsmechanisme. Een analyse waarbij gekeken wordt naar het gesommeerde effect van dergelijke stoffen zou daarom uitkomst bieden. Een dergelijke analyse is sinds kort beschikbaar als de zogenaamde DR-CALUX assay.

Voor het bepalen van de dioxines vinden bepalingen plaats met behulp van zogenaamde CALUX-testen (chemical-activated luciferase expression). Hierin worden gemodificeerde levertumorcellen van ratten blootgesteld aan sedimentextracten. De dioxines grijpen aan op celreceptoren met als gevolg dat de cellen luciferase produceren. Dit enzym is in staat het aan de celinhoud toegevoegde luciferine te oxideren, waarbij licht vrijkomt. De hoeveelheid licht is evenredig met de hoeveelheid dioxines in de monsterextracten. Door de hoeveelheid vrijgekomen licht te vergelijken met de hoeveelheid licht die vrijkomt na blootstelling van de cellen aan een exact bekende hoeveelheid 2,3,7,8-tetrachloordibenzodioxine zijn de dioxine-activiteiten in de monsterextracten te kwantificeren. Overigens worden ook verbindingen meegenomen die dezelfde receptoractiviteit als dioxines hebben, bijv. bepaalde (nl. non-ortho- en mono-orthogesubstitueerde) polychloorbifenylen (PCB). De DR-CALUX-testen kunnen gezien worden als snelle screeningstesten voor de aanwezigheid van dioxines.

Ten behoeve van de CALUX-testen op dioxines wordt het sediment gevriesdroogd, vervolgens gehomogeniseerd en geëxtraheerd met een mengsel van aceton en n-hexaan (1:9). Ontzwaveling vindt plaats door behandeling met tetrabutylammoniumsulfaat, waarna het extract wordt gezuiverd over een chromatografiekolom gevuld met silica waaraan geconcentreerd zwavelzuur is toegevoegd. Deze stap is noodzakelijk om stoffen die polairder zijn dan dioxines en die de CALUX-test kunnen verstoren te verwijderen. Het gezuiverde extract wordt opgenomen in 50 µl dimethylsulfoxide (DMSO) en toegevoegd aan de cellen. Deze methode is een verdere ontwikkeling op eerder in de literatuur beschreven werk (Murk *et al.*, 1996).

De analyses werden uitgevoerd door BioDetection Systems bv, Amsterdam.

3. Resultaten en discussie

3.1. Geldigheidscriteria en randvoorwaarden

Geldigheidscriteria

De gehanteerde richtlijn EPA 600/R-99/064 geeft een criterium aan voor de geldigheid van de toxiciteitstest met *Hyalella azteca*. In tabel 3.1 wordt dit criterium en de geconstateerde waarde weergegeven voor de toegepaste bioassay.

Bij de test werd voldaan aan de betreffende geldigheidscriteria.

Tabel 3.1 Geldigheidscriteria voor de toxiciteitstest.

Parameters	Criterium	Geconstateerde waarden
<i>Hyalella azteca</i> (EPA 600/R-99/064, March 2000)		
Overleving in controle sediment	≥ 80%	100 %

Randvoorwaarden

De resultaten van de semi-kwantitatieve controle van enkele fysische en chemische parameters (zie § 2.2) worden voor *Hyalella azteca* weergegeven in bijlage 1.

Door AquaSense zijn in een recent onderzoek criteria (randvoorwaarden) voor de parameters voor *Hyalella azteca* opgesteld. Wanneer gedurende de bioassays wordt voldaan aan deze randvoorwaarden, worden géén negatieve effecten van deze parameters verwacht.

Voor de betreffende parameters kon in het bovenstaande water worden voldaan aan de gestelde randvoorwaarden.

Daar er voor de DR-CALUX assay een extract van het te testen sediment wordt gemaakt, wordt deze assay niet verstoord door randvoorwaarden als het zuurstof- of ammoniumgehalte.

3.2. Resultaten

De "ruwe" testresultaten van de bioassays worden voor *Hyalella azteca* weergegeven in bijlage 2. Deze resultaten en de gegevens van de DR-CALUX analyses zijn beknopt samengevat in tabel 3.2.

Bioassay met *Hyalella azteca*

Bij de sedimenttest met *H. azteca* is sprake van een toxisch effect indien een statistisch significant verschil voor een van de bepaalde parameters wordt aangetoond in vergelijking met de waarde in het referentiesediment.

Wanneer de resultaten van de sedimentmonsters vergeleken worden met de resultaten van het referentiesediment, dan blijkt alleen het sedimentmonster HV40 een significant negatief effect te veroorzaken op de groei van *Hyalella azteca*. De overige monsters laten geen significant negatief effect zien. Effecten op de overleving van de toetsdieren werden niet waargenomen.

DR-CALUX

De resultaten van de DR-CALUX assay zijn uitgedrukt in TCDD equivalenten (TEQs; pg/g sediment). Door het RIKZ is een CTT-waarde voor de DR-CALUX assay opgesteld van 50 TEQ. Deze waarde wordt door de sedimenten HV40, HV50 en HV65B overschreden.

Tabel 3.2 Resultaten van de bioassays met de amphipode *Hyalella azteca*. Arceringen geven aan waar (significante) negatieve effecten werden waargenomen.

Omschrijving	Analyse: Ecolimsnr.	<i>Hyalella azteca</i>		DR-CALUX	
		Sterfte (%)	Groei (mg)	TEQ	stdev
Drontermeer	blanco	0	0,031	-	-
HV 31	329414	0	0,032	28,7	1,5
HV 40	329415	3,8	0,013	176,3	23,2
HV 50	329416	3,8	0,018	132,2	10,0
HV 65B	329417	0	0,025	100,4	5,9
T0 Terneuzen	329418			13,1	0,7
TW Terneuzen	329419			14,5	1,2
VM Veerse meer Blanco	329422			3,6	0,2

4. Literatuur

- EPA 600/R-99/064 (March 2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second edition.
- Murk, A.J., J. Legler, M.S. Denison, J.P. Giesy, C. van de Guchte and A. Brouwer (1996). Chemical-activated luciferase expression (CALUX): a novel in-vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediment and pore water. *Fundamental and Applied Toxicology* 33 (1): 149-160.
- Norusis, M.J. (1992). SPSS[®] for Windows[™]. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc., Chicago.

Bijlage 1. Fysische en chemische parameters *Hyalella azteca* bioassay

Fysische en chemische parameters in het **boven het sediment staande water** gedurende de de bioassay met *Hyalella azteca*. De semi-kwantitatieve controle gebeurde aan het begin (t=0) in het verse medium en aan het eind (t=10) in het oude testmedium. Eventuele overschrijdingen van het gestelde criterium (randvoorwaarde) worden d.m.v. arcering aangeduid.

		Parameters									
		O ₂ (%)		pH		NO ₂ ⁻ (mg/l)		NH ₄ ⁺ + NH ₃ (mg/l) (pH)		geleid. (µS/mm)	
Criteria: Intern onderzoek AquaSense		> 12 ¹ > 60 ²		5 – 8,5		< 25		< 130 (pH 6,5) < 90 (pH 7,5) < 15 (pH 8,0)		< 10 ‰ ³	
t (dagen)		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Omschrijving	Ecolims nr.										
slib referentie	Drontermeer	96	88	7,4	7,6	< 2	< 2	< 10	< 10	54	82
HV 31	329414	95	67	7,6	7,4	< 2	< 2	< 10	< 10	62	57
HV 40	329415	75	84	7,4	7,6	< 2	< 2	< 10	< 10	51	71
HV 50	329416	96	84	7,3	7,7	< 2	< 2	< 10	< 10	48	66
HV 65B	329417	90	89	7,2	8,0	< 2	< 2	< 10	< 10	51	78

1. criteria geldt voor de parameter sterfte
2. criteria geldt voor de parameter groei/reproductie
3. indien langzaam wordt geacclimatiseerd wellicht te verhogen tot circa 15 ‰.

Bijlage 2. Resultaten *Hyalella azteca* bioassay

Organisme: *Hyalella azteca*
 Testduur (dagen): 10
 Projectnummer: 2335
 Inzet datum: 07-Oct-03

Geteste monsters

Referentiesediment	Ecolimsnr.	Omschrijving
Referentiesediment 1		Referentie
Referentiesediment 2		
	1 329414	HV 31
	2 329415	HV 40
	3 329416	HV 50
	4 329417	HV 65B
	5	
	6	
	7	
	8	
	9	
	10	

Aantal dieren op t=0

Ecolims nummer	Omschrijving	Replica's							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Referentiesediment 1	Referentie	20	20	20	20				
Referentiesediment 2									
329414	HV 31	20	20	20	20				
329415	HV 40	20	20	20	20				
329416	HV 50	20	20	20	20				
329417	HV 65B	20	20	20	20				

Aantal overlevende dieren einde experiment

Ecolims nummer	Omschrijving	Replica's								STERFTE (%)	
		A	B	C	D	E	F	G	H	Gemiddelde	stdev
Referentiesediment 1	Referentie	20	20	20	20					0	-
Referentiesediment 2											
329414	HV 31	20	20	20	20					0	-
329415	HV 40	20	19	18	20					3.8	4.79
329416	HV 50	20	18	19	20					3.8	4.79
329417	HV 65B	20	20	20	20					0	-

Drooggewicht van de dieren (mg / *Hyalella azteca*)

Ecolims nummer	Omschrijving	Replica's								DROOGGEWICHT (mg)	
		A	B	C	D	E	F	G	H	Gemiddelde	stdev
Begingewicht t=0		0.024	0.023	0.024						0.024	0.001
Referentiesediment 1	Referentie	0.056	0.048	0.061	0.054					0.055	0.005
Referentiesediment 2											
329414	HV 31	0.053	0.049	0.056	0.063					0.055	0.006
329415	HV 40	0.039	0.033	0.039	0.038					0.037	0.003
329416	HV 50	0.054	0.034	0.045	0.035					0.042	0.009
329417	HV 65B	0.049	0.048	0.041	0.058					0.049	0.007

Groei

Ecolims nummer	Omschrijving	Replica's								GROEI (mg)	
		A	B	C	D	E	F	G	H	Gemiddelde	stdev
Referentiesediment 1	Referentie	0.032	0.024	0.037	0.031					0.031	0.005
Referentiesediment 2											
29414	HV 31	0.030	0.025	0.033	0.040					0.032	0.006
29415	HV 40	0.016	0.009	0.015	0.014					0.013	0.003
29416	HV 50	0.030	0.010	0.021	0.011					0.018	0.009
29417	HV 65B	0.025	0.024	0.017	0.034					0.025	0.007

Bijlage 3. Resultaten CALUX analyses

Analyse rapport DR CALUX[®] t.b.v Aquasense

BDS nummer: bds-142-352-rap
Aquasense project : 2335
Matrix: Sediment
Analyse soort: ASE extractie/ TBA ontzweveling/ zure silica opschoning/
DR CALUX[®] analyse
Ontvangst datum monsters: 10 oktober 2003
Datum afgifte resultaten: 18 december 2003
Paraaf hoofd laboratorium

BDScode	Aquasense code	DR CALUX TEQ (pgram/ gedroogd sediment)	% stdev	3 pM (pM/well)	Blanco (pM/well)
M-352-5139	329414	54	4	3.10	0.2
M-352-5140	329415	138	7	3.10	0.2
M-352-5141	329416	75	5	3.10	0.2
M-352-5142	329417	89	7	3.13	0.2
M-352-5143	329418	9.6	5.5	3.13	0.2
M-352-5144	329419	9.4	4.2	3.13	0.2
M-352-5145	329422	2.3	2.3	3.28	0.2