

Laan van Westenenk 501
Postbus 342
7300 AH Apeldoorn

www.mep.tno.nl

T 055 549 34 93
F 055 549 32 01
info@mep.tno.nl

TNO-rapport

R 2003/035

**De toxiciteit van afspoelend regenwater
en de rol van metalen hierin**

Datum	1 april 2003
Auteurs	P.C. Goedhart E.M. Foekema M.T. Collombon
Projectnummer	31934.01.08
Trefwoorden	Toxiciteit, regenwater, wadi, daphnia, microtox, alg, zware metalen, TIE
Bestemd voor	Stichting Duurzaam Bouwmetaal Zoetermeer

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor onderzoeksopdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst. Het ter inzage geven van het TNO-rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

Samenvatting

Om rioolwaterzuiveringsinstallaties niet onnodig te belasten met regenwater wordt de hemelwaterafvoer meer en meer losgekoppeld van het rioolstelsel. Op een aantal plaatsen zijn hiertoe zogenaamde wadi's aangelegd. Dit zijn kunstmatige bekkens waarin hemelwater vanaf verhard oppervlak tijdelijk wordt opgeslagen om vervolgens in de bodem te penetreren. De kwaliteit van het water dat in een wadi wordt opgevangen staat vaak onder invloed van luchtverontreiniging, afspoeling uit dakgoten, leidingwerk en straatvuil. Dit zou kunnen leiden tot toxiciteit van het water dat zich in de wadi's verzamelt.

In dit onderzoek is onderzocht of hemelwater dat in wadi's wordt opgevangen toxische effecten kan veroorzaken. Waar toxiciteit werd aangetroffen is met behulp van een eenvoudige TIE-behandeling de rol van metalen hierin vastgesteld.

Tijdens een periode van hevige regenval zijn vier wadi's, respectievelijk in Doesburg, Arnhem, Zutphen en Apeldoorn bemonsterd. In Deventer werd tevens een watermonster genomen uit een regenton van een huis dat is voorzien van zinken dakgoten.

De toxiciteit van alle monsters werd onderzocht in lab-bioassays met bacteriën, algen en watervlooien. In de algentesten werd een verminderde groeisnelheid in de monsters uit de wadi's van Arnhem en Apeldoorn en uit de regenton in Deventer vastgesteld. Het is echter niet zeker dat het hier een toxisch effect betreft, omdat algen ook erg gevoelig zijn voor andere karakteristieken van het water. De TIE behandeling in algentesten heeft nog meer ontwikkelingstijd nodig.

De monsters uit de wadi's bleken niet toxisch te zijn in de 48 uren Daphnia test en in de bacterietest (Microtox). Dit gold ook voor de wadi's die waren gelegen in oude woonwijken waarin nog veel zink en lood in het hemelwater afvoersysteem is verwerkt (Arnhem en Doesburg). Beide testen gaven wel een toxische respons met het regenwatermonster dat direct uit de regenton was genomen. Met behulp van de TIE behandeling werd vastgesteld dat dit effect door metalen werd veroorzaakt.

Een verklaring voor het wel vinden van effecten aan de bron (de regenton) maar niet bij de wadi kan zijn dat het regenwater tijdens het afspoelen naar de wadi 'opgeladen' wordt met stoffen waardoor de metalen gebonden worden. Hierdoor neemt de biologische beschikbaarheid af. Deze binding kan worden veroorzaakt door organisch materiaal, zoals verteerde plantenresten of aarde en de humuszuren die daaruit afkomstig zijn. Ook is het niet uitgesloten dat verdunning met ander, minder met metalen belast water hier een rol speelt.

Inhoud

	pagina
Samenvatting	2
1. Inleiding	4
2. Materiaal en methoden	5
2.1 Monstername	5
2.2 Acute immobilisatietoets met <i>Daphnia Magna</i>	5
2.3 Microtox® toets	6
2.4 De algengroeiremmingstoets met <i>Chlorella vulgaris</i>	6
2.5 TIE	6
3. Resultaten	8
3.1 <i>Daphnia magna</i> immobilisatietoets	8
3.2 Microtox®	9
4. Discussie en conclusies	11
5. Referenties	12
6. Verantwoording	13
Bijlage 1 De algengroeiremmingstoets	14

1. Inleiding

Wadi's zijn kunstmatige bekkens waarin hemelwater vanaf verhard oppervlak tijdelijk kan worden opgeslagen om RWZI's (RioolWaterZuiveringInstallaties) te ontlasten tijdens/na hevige regenval. De bodem van de wadi is zo samengesteld dat het verzamelde water geleidelijk penetreert en aldus wordt afgevoerd.

De kwaliteit van het water dat in een wadi wordt opgevangen staat vaak onder invloed van luchtverontreiniging, afspoeling uit dakgoten, leidingwerk en straatvuil. Dit zou kunnen leiden tot toxiciteit van het in de wadi's verzamelde regenwater.

Het doel van dit project is:

1. Te onderzoeken of er sprake is van toxische effecten van water dat wordt opgevangen in een aantal wadi's;
2. De invloed van in het monster aanwezige metalen op eventueel gevonden toxische effecten vast te stellen.

Hiertoe is een reeks monsters onderzocht op toxische effecten voor een bacterie (*Vibrio fischeri*), de watervlo (*Daphnia magna*) en een zoetwateralg (*Chlorella vulgaris*).

De monsters die toxische effecten veroorzaakten zijn na een TIE (Toxicity Identification and Evaluation) behandeling nogmaals getest. Dit is gebeurd door EDTA aan de monsters toe te voegen. EDTA is een zogenaamd *ligand*, en is derhalve in staat bijna alle metalen aan zich te binden. EDTA-gebonden metalen zijn voor veel organismen niet meer beschikbaar, de blootstelling van het organisme aan het metaal zal dus afnemen. Toxische effecten van het monster zullen door toevoeging van EDTA verdwijnen als de toxiciteit veroorzaakt wordt door een metaal.

2. Materiaal en methoden

2.1 Monstername

Monsters zijn genomen in 5 of 10 liter emmers van polypropyleen. Vóór monstername zijn de metalen hengers van de emmers verwijderd. De monsters zijn genomen tijdens of vlak na een periode van hevige regenval.

De volgende monsters zijn genomen tussen 8 en 17 oktober 2002.

Monster “Doesburg” is genomen te Doesburg, in een oude vooroorlogse volkswijk waarin veel zink en lood is gebruikt. Het water in deze wijk wordt ondergronds geïnfiltreerd middels infiltratieputten. Deze infiltratieputten staan met elkaar in verbinding. De centrale put loopt over in een wadi waaruit het monster is genomen.

Monster “Arnhem” is genomen te Arnhem, in een luxe wijk met onder meer zinken dakgoten en een trolleybus. Het water wordt hier via een ondergronds leidingnetwerk verzameld in wadi's in “t Craneveld.”, alwaar het monster is genomen.

Monster “Zutphen” is genomen te Zutphen in de wijk Eme. In deze recent gebouwde wijk is weinig zink verwerkt. Het water wordt hier bovengronds afgevoerd naar wadi's en vijvers. Uit een van de vijvers waar regenwater naar afstroomt is het monster genomen.

Monster “Apeldoorn” is genomen te Apeldoorn op een parkeerplaats tegenover het “Business Park Apeldoorn”. De waterafvoer van deze parkeerplaats is aangesloten op een “zakvijver” met kiezelstenen. Uit deze vijver is het monster genomen.

Monster “Deventer” is genomen te Deventer uit een regenton die is aangesloten op een huis uit 1935 waarin lood en zink is verwerkt, onder andere in de hemelwaterafvoer.

De monsters werden opgeslagen bij ca. 4°C.

2.2 Acute immobilisatietoets met *Daphnia Magna*

De watervlo *Daphnia Magna* komt met name voor in (zoet-) waterige milieu's met veel organisch materiaal. Watervlooien zijn filterfeeders, wat zoveel wil zeggen dat zij continu water filteren om het organische materiaal in de waterkolom te gebruiken als voedsel. Dit voedsel kan van alles zijn: van organische zuren tot bacteriën en algen.

De *Daphnia Magna* immobilisatietoets is gebaseerd op OECD richtlijn 202 (OECD 2000).

Jonge watervlooien van maximaal 24 uur oud werden blootgesteld aan het monster in een verdunningsreeks 100%-50%-25%. Als verdunningsmiddel is het bronwater “Bar-le Duc” gebruikt. Na 48 uur werd de hoeveelheid geïmmobiliseerde organismen (organismen die niet meer bewegen) gescoord. Per testconcentratie zijn 10 (toxiciteitstoets) respectievelijk 20 (TIE-test) organismen ingezet.

2.3 Microtox® toets

In de Microtox® test wordt de toxiciteit van een monster bepaald aan de hand van de meting van de bioluminescentie van de bacterie *Vibrio fischeri*. Deze bioluminescentie is een maat voor de respiratie (conditie) van de bacterie.

De test is uitgevoerd conform de bij het testsysteem geleverde protocollen (Microbics Corporation, 1995).

In een reeks cuvetten is een hoeveelheid 2% NaCl oplossing gebracht. Hieraan is een hoeveelheid *Vibrio fischeri* toegevoegd. Na meting van de initiële lichtintensiteit is het te meten monster toegevoegd in een verdunningsreeks. Na 15 minuten blootstelling is wederom de lichtintensiteit gemeten. Uit de gegevens over verdunning en lichtintensiteit is vervolgens een EC₅₀ concentratie berekend middels de softwarepakketten “MicroToxOmni®”.

2.4 De algengroeiremmingstoets met *Chlorella vulgaris*

De resultaten van de algentoets tonen aan dat deze zich nog in de ontwikkelingsfase bevindt, met name in relatie tot het gebruik van TIE-technieken. Derhalve is alle informatie betreffende de algentoets naar Bijlage 1 verplaatst. Bovendien is de algentoets buiten beschouwing gelaten bij discussie en conclusies.

2.5 TIE

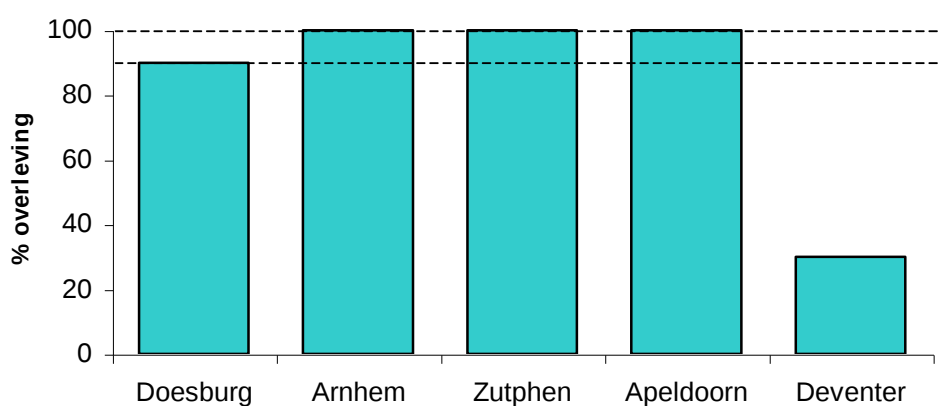
Om de invloed van metalen op waargenomen toxische effecten aan te tonen zijn deze monsters nogmaals getest na TIE-behandeling. Hiertoe is een hoeveelheid EDTA aan het monster toegevoegd die voldoende is om 0,15 mM metalen te complexeren, equivalent aan 9,8 mg/l Zn of 31,1 mg/l Pb. Dit is een factor 7-10 boven het Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau of MTR zoals opgegeven door het ministerie van VROM (VROM 1999).

Na toevoeging is een pauze van 3 uur in acht genomen om het EDTA de gelegenheid te geven te reageren. Hierna begint de blootstellingsfase van het geselecteerde organisme aan het monster. De teruggevonden toxische effecten of afwezigheid daarvan is vergeleken met de toxische effecten die zijn gevonden in het oorspronkelijke monster.

3. Resultaten

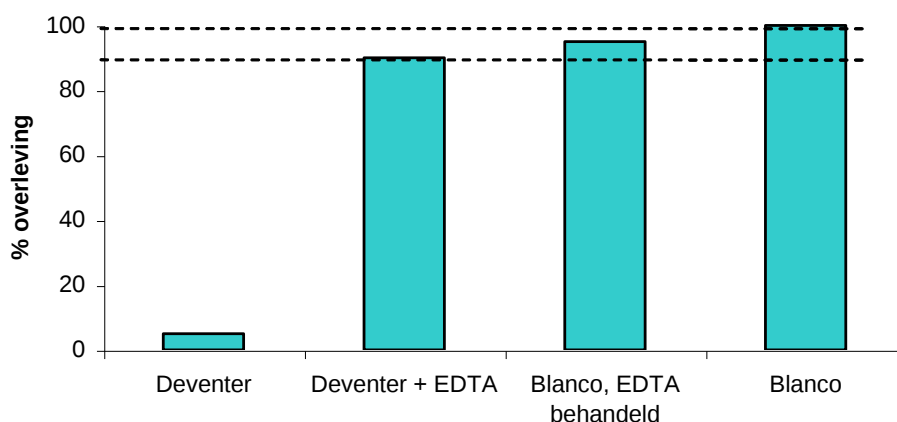
3.1 *Daphnia magna* immobilisatietoets

Met de *Daphnia magna* immobilisatietoets werd alleen een toxische respons gevonden met het onverdunde monster afkomstig uit de regenton in Deventer. In dit monster overleefde slechts 30% van de blootgestelde watervlooien. De monster uit de wadi's veroorzaakten geen toxische effecten in deze test (Figuur 1).



Figuur 1 Resultaten van de 48 uren Daphnia magna immobilisatietoets. Afgebeeld zijn alleen de resultaten van de toets waarin de toetsorganismen zijn blootgesteld aan 100% van het monster. De overige verdunningen (50%, 25%) leverden geen respons op. De stippellijnen geven de 'geen effect' range aan.

Door de TIE-behandeling met EDTA blijkt het effect van het Deventer monster te worden opgeheven (Figuur 2). Dit duidt erop dat de waargenomen toxiciteit door metalen werd veroorzaakt.



Figuur 2 Resultaten van de TIE toets van monster "Deventer" in de Daphnia magna immobilisatietoets. De stippellijnen geven de 'geen effect' range aan.

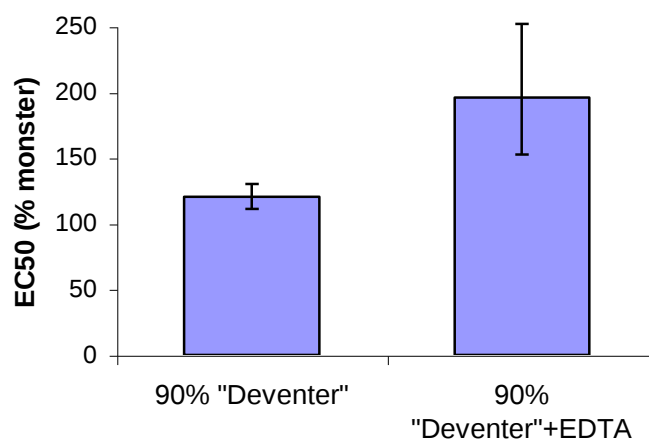
3.2 Microtox®

Met de Microtox bacterietest werd ook alleen in het monster uit de regenton in Deventer een toxisch effect vastgesteld (Tabel 1). Op dit monster is dan ook de EDTA behandeling uitgevoerd. Er werd gekozen voor het "90% test protocol" (Microbics Corporation, 1995), waarin de blootstellingsrange tussen de 90 en 25% van het monster ligt. In deze testronde werd een iets lagere toxiciteit van het onbehandelde monster gevonden in vergelijking met de eerdere meting. Het effect van de EDTA behandeling was echter duidelijk (Figuur 3). Door toevoeging van EDTA werd de toxiciteit nog verder verlaagd, waardoor wordt aangegeven dat metalen verantwoordelijk zijn voor de waargenomen effecten.

Tabel 1 Resultaten van de Microtox® assay. Uitgedrukt als EC50 in volume procenten. >100% betekent dat er geen effect werd waargenomen.

Monster	EC ₅₀ (15 minuten)	95% BI
"Doesburg"	>100%	n.v.t.
"Arnhem"	>100%	n.v.t.
"Zutphen"	>100 %	n.v.t.
"Apeldoorn"	>100 %	n.v.t.
"Deventer"	73,58 %	41,29-131,1 % ¹

¹ Een EC50 waarde hoger dan 100% betekent dat het pure monster in de test minder dan 50% effect veroorzaakte.



Figuur 3 Resultaten van Microtox®-op monster "Deventer" en na behandeling met EDTA (zie ook de voetnoot¹).

¹ Een EC50 waarde hoger dan 100% betekent dat het pure monster in de test minder dan 50% effect veroorzaakte.

4. Discussie en conclusies

Als de algentesten buiten beschouwing worden gelaten zijn er in geen van de monsters uit de wadi's toxische effecten waargenomen. Het enige monster dat wel een toxische respons veroorzaakte was afkomstig uit een regenton, waarin het regenwater direct uit de zinken dakgoot werd opgevangen. Dit monster veroorzaakte in zowel de daphnia- als in de bacterietest een effect. De TIE analyse toonde in beide gevallen aan dat de waargenomen effecten werden veroorzaakt door metalen.

Dergelijke effecten worden niet meer aangetroffen in de Wadi. Dit gold ook voor de wadi's die waren gelegen in oude woonwijken waarin nog veel zink en lood in het hemelwater afvoersysteem is verwerkt (Arnhem en Doesburg). Een verklaring hiervoor kan zijn dat het regenwater tijdens het afspoelen naar de wadi 'opgeladen' wordt met stoffen waardoor de metalen gebonden worden. Dit kan zijn organisch materiaal, zoals verteerde plantenresten of aarde en de humuszuren die daaruit afkomstig zijn. Ook is het niet uitgesloten dat verdunning met ander, minder met metalen belast water hier ook een rol speelt.

5. Referenties

Microbics Corporation (1995): Microtox® Acute Basic Test Procedures; p11-22, p47-56.

OECD (1984): OECD guidelines for the testing of chemicals: guideline 201: Algae, growth inhibition test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD (2000): OECD guidelines for the testing of chemicals: guideline 202: Daphnia sp. Acute immobilization test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

STOWA (1997): Biomonitoringtechnieken voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 2: Keuzesysteem en praktijktoetsing.

VROM (1999): Stoffen en Normen, Directoraat-Generaal Milieubeheer Ministerie van VROM. Uitgegeven bij Samsom BV.

6. Verantwoording

Naam en adres van de opdrachtgever:

Stichting Duurzaam Bouwmetaal
Postbus 190
2700 AD Zoetermeer

Namen en functies van de projectmedewerkers:

E.M. Foekema	Project leider
P.C. Goedhart	Project medewerker
M.T. Collombon	Projectmedewerker

Namen van instellingen waaraan een deel van het onderzoek is uitbesteed:

-

Datum waarop, of tijdsbestek waarin, het onderzoek heeft plaatsgehad:

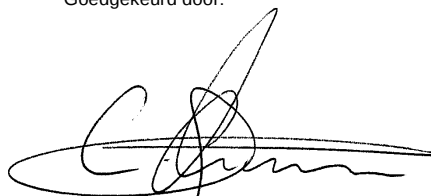
November 2002 – maart 2003

Ondertekening:



E.M. Foekema
Projectleider
1 april 2003

Goedgekeurd door:



C.C. Karman
Afdelingshoofd
1 april 2003

Bijlage 1 De algengroeiremmingstoets

Procedure

De algengroeiremmingstoets is uitgevoerd volgens een protocol, gebaseerd op OECD richtlijn 201 (OECD, 1984). Het toetsorganisme is *Chlorella vulgaris*, de toetsduur is 72 uur.

Aan een watermonster is een aantal nutriënten en spore-elementen toegevoegd (Tabel 2). Hieraan is een hoeveelheid algen toegevoegd tot een eindconcentratie van ca. 20 µg Chlorofyl-a per liter. De mengsels zijn vervolgens in een schud-incubator geplaatst onder continue illuminatie. Na 0, 24, 48 en 72 uur wordt het gehalte Chlorofyl-a bepaald.

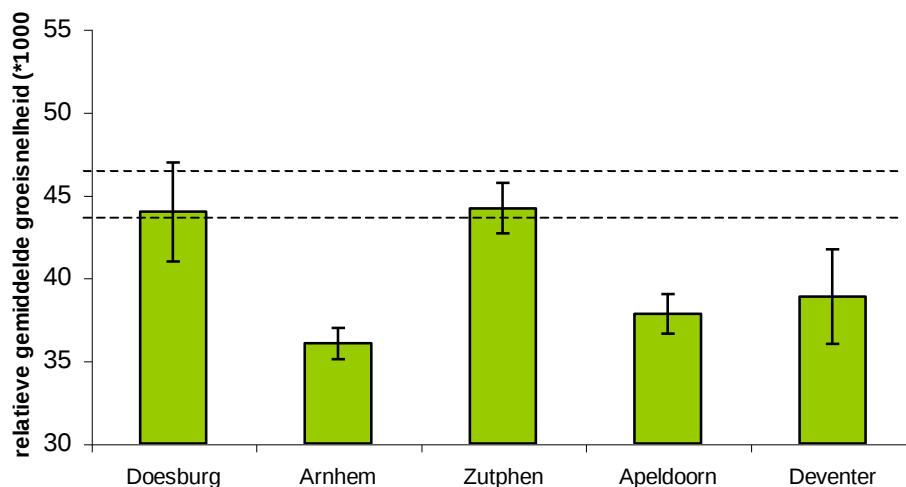
Uit de resultaten is een “gemiddelde specifieke groeisnelheid”, ofwel μ , bepaald met behulp van het programma “Prism 2.0”.

Tabel 2 Samenstelling van het gebruikte algenmedium.

Nutriënt	concentratie (µmol/L)
NH ₄ Cl	280
KH ₂ PO ₄	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61
MgCl ₂ ·6H ₂ O	59
CaCl ₂ ·2H ₂ O	122
NaHCO ₃	1790
C ₆ H ₈ O ₇ Fe·3H ₂ O	0,3
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,3
H ₃ BO ₃	2,99
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,03
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,006
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6,10E-5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022

Resultaten

De groeisnelheden van de algen in de test vertoonde grote verschillen tussen de verschillende monsters (Figuur 4). De monsters genomen uit de wadi's in Arnhem en Apeldoorn, alsmede uit de regenton in Deventer leverde een verminderde groeisnelheid ten opzichte van de controle op.

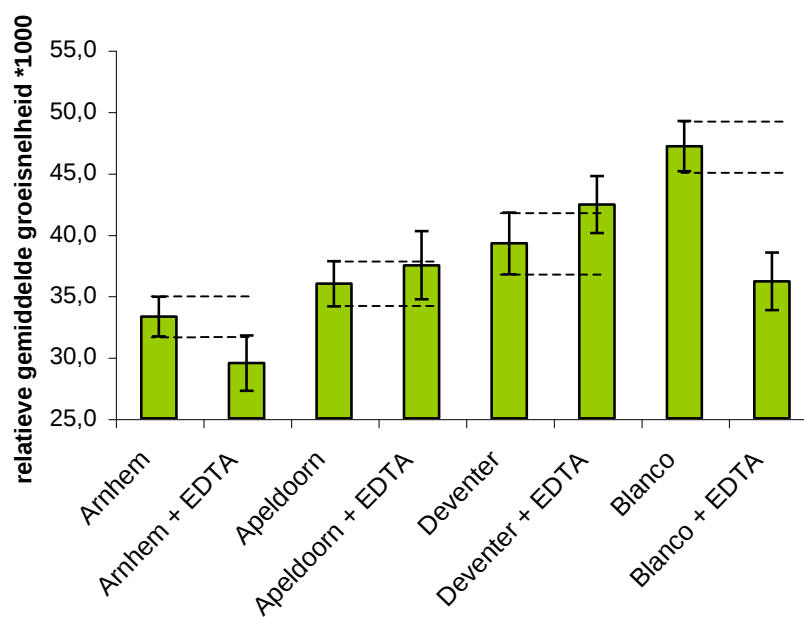


Figuur 4 Resultaten van de algengroeiremmingstoets. De stippellijnen geven de 'geen effect' range aan.

Op basis van de resultaten uit Figuur 4 is besloten de monsters “Arnhem”, “Apeldoorn” en “Deventer” nogmaals te testen, na behandeling met EDTA. Uit deze resultaten blijkt dat de EDTA behandeling op zich de algenontwikkeling ongunstig beïnvloed (Figuur 5). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat (metallische) nutriënten die noodzakelijk zijn voor de algengroei worden gebonden door het EDTA. Hierdoor is het moeilijk om de resultaten van de behandeling op de monsters te interpreteren.

In geen van de gevallen leidde de toevoeging van EDTA tot een verbeterde algenontwikkeling. Hier vallen echter geen conclusies aan te verbinden omtrent de oorzaak van de verminderde algenontwikkeling in sommige monsters. Dit wordt mede ondersteund door het feit dat algen ook erg gevoelig zijn voor de fysische samenstelling van een monster. Een verminderde groei hoeft dan ook niet altijd te worden veroorzaakt door de aanwezigheid van gifstoffen.

De ontwikkeling van de EDTA TIE techniek in combinatie met de algentest vraagt nog verdere methodische ontwikkeling.



Figuur 5 Resultaten van de TIE fase van de algengroeiremmingstoets met de monsters "Arnhem", "Apeldoorn" en "Deventer".