

2001-06_koper-Nederlandse-oppervlaktewateren

stowa

Richting Toegepast Onderzoek Waterbeheer

Koper in de Nederlandse oppervlaktewateren

toxiciteit in relatie tot organisch materiaal



2001

06



Koper in de Nederlandse oppervlaktewateren

toxiciteit in relatie tot organisch materiaal

Auteurs:

K.J.M. Kramer (Mermayde, Bergen)

R.G. Jak (TNO-MEP, Den Helder)

B. van Hattum (IVM-VU, Amsterdam)

R.N. Hoofman (TNO-Voeding, Delft)

In opdracht van:

RIZA en STOWA

Arthur van Schendelstraat 816

Postbus 8090, 3503 RB Utrecht

Telefoon 030 232 11 99

Fax 030 232 17 66

E-mail stowa@stowa.nl

<http://www.stowa.nl>

Publicaties en het publicatie-
overzicht van de STOWA kunt u
uitsluitend bestellen bij:

Hageman Fulfilment

Postbus 1110

3330 CC Zwijndrecht

tel. 078 - 629 33 32

fax 078 - 610 42 87

e-mail: hff@wxs.nl

o.v.v. ISBN- of bestelnummer en
een duidelijk afleveradres.

ISBN 90.5773.151.7

2001

06

INHOUDSOPGAVE

Ten Geleide	1
Verklarende Woordenlijst	3
Uitgebreide Samenvatting	7
1 Inleiding.....	11
1.1 Onderzoekskader.....	11
1.2 Projectdoelstellingen.....	12
1.3 Leeswijzer	13
2 Ecologische Effecten van Koper	15
2.1 Koper als essentieel element.....	15
2.2 Biologische beschikbaarheid en effecten.....	15
2.3 Chemische speciatie en kopertoxiciteit.....	16
2.4 Chemische speciatie en kopertoxiciteit voor <i>Daphnia</i> spp.....	17
3 Selectie van Onderzoeksmethoden.....	21
3.1 Biologische effectmetingen.....	21
3.1.1 <i>Daphnia magna</i> -test (48h EC50), beweeglijkheid.....	21
3.1.2 Algen-toetsen, (72h EC50), groeiremming; PAM.....	22
3.1.3 Mossel-toetsen.....	22
3.1.4 Bacteriën-toetsen	22
3.1.5 Raderdier (rotifera), EC50 (48h), overleving	23
3.1.6 ELS vistoets (EC50, 8d), embryonale ontwikkeling	23
3.1.7 Keuze van de ecotoxicologische toets.....	24
3.2 Accumulatie van Cu in <i>Daphnia</i> 's.....	24
3.3 Chemische analyses van (fracties van) Cu.....	25
3.3.1 Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF).....	25
3.3.2 Cu-Chelex.....	25
3.3.3 Cu-DGT.....	25
3.3.4 Cu-ISE	27
3.3.5 Andere technieken	27
3.3.6 Keuze koper-analysemethoden.....	28
3.4 Speciatie-modellering	28
4 Opzet van het Onderzoek	31
4.1 Vooronderzoek.....	31
4.2 Fase I.....	31
4.3 Fase II.....	32
5 Toegepaste Methoden en Technieken	35
5.1 Monstername.....	35
5.1.1 Keuze locaties.....	35
5.1.2 Bemonsteringen Fase I en II.....	35
5.2 <i>Daphnia</i> -test (48h EC50), beweeglijkheid.....	37

5.3	Chemische analyses	39
5.4	Speciatie Modelling	42
6	Resultaten	45
6.1	Resultaten Vooronderzoek	45
6.2	Resultaten Fase I	48
6.2.1	Chemische parameters	48
6.2.2	Biologische parameters	54
6.3	Resultaten Fase II	58
6.3.1	Chemische parameters	58
6.3.2	Biologische parameters	68
6.4	Speciatie-berekeningen	73
7	Discussie	77
7.1	Koperanalyses	77
7.1.1	Cu-nominaal, Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF)	77
7.1.2	Cu-DGT	78
7.1.3	Cu-Chelex	79
7.1.4	Cu-ISE	79
7.2	DOC, 'humus' en andere macro-variabelen	80
7.2.1	DOC en 'humus'	80
7.2.2	Macro-variabelen	81
7.3	De toxicologische resultaten	81
7.3.1	Koper-toxiciteit vs verdunningsreeks	81
7.3.2	Koper-toxiciteit en Nederlandse oppervlaktewateren	82
7.3.3	Chemische meting van biologisch beschikbaar koper	83
7.3.4	Relaties 48h EC50 Daphnia en DOC of UV-absorptie	84
7.3.5	Interne Cu-daphnia concentraties, en BCFs	87
7.3.6	Relaties 48h EC50 Daphnia en andere parameters	92
7.4	Speciatie-modelling	94
7.4.1	pCu in de natuurlijke wateren	94
7.4.2	pCu in de toetsmedia (bij EC50)	94
7.4.3	Speciatie-modelling en de invloed van pH	95
8	Conclusies	96
9	Aanbevelingen	99
10	Literatuur	101
11	Annexes	109

KOPERTOX:

Onderzoek naar de biologische beschikbaarheid van koper in Nederlandse oppervlaktewateren

Eindrapport Fasen I en II

Auteurs: K.J.M. Kramer¹⁾
R.G. Jak²⁾
B. van Hattum³⁾
R.N. Hooftman⁴⁾

Datum: 26 juni 2001

Contract: Nummer RI-2804

Voor:

Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA)
Afdeling WST
Postbus 52
3300 AB Dordrecht

en

Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA)
Postbus 8090
3503 RB Utrecht

Adressen:

- 1) MERMAYDE
Postbus 109
1860 AC Bergen
- 2) TNO-MEP, Afdeling Ecologische Risico's
Postbus 57
1780 AB Den Helder
- 3) Instituut voor Milieuvraagstukken, Vrije Universiteit
De Boelelaan 1115
1081 HV Amsterdam
- 4) TNO Voeding, Afdeling Milieutoxicologie
Postbus 6011
2600 JA Delft

TEN GELEIDE

Uit onderzoek van de waterbeheerders blijkt dat de normen voor koper in het oppervlaktewater regelmatig worden overschreden. De vraag is of dit daadwerkelijk tot waterkwaliteitsproblemen leidt.

De huidige normen zijn gebaseerd op ecotoxicologische toetsen in het laboratorium, en worden uitgedrukt op basis van totaal koper concentraties. Van koper is bekend dat het een sterke binding kan vormen met organische verbindingen die in het oppervlaktewater voorkomen, zoals humus- en fulvinezuren. Deze verbindingen (complexen) zijn biologisch niet of in beperkte mate beschikbaar voor organismen. In de natuur wordt koper door genoemde organische verbindingen deels gedetoxificeerd. Totaal koper heeft meestal geen directe relatie met eventuele biologische effecten.

Gelet op het maatschappelijke belang dat met de koperproblematiek is gemoeid, is het van belang dat wordt nagegaan of in het Nederlandse oppervlaktewater de detoxificatie van koper door natuurlijk organisch materiaal een rol van betekenis speelt, en zo ja, of dit dan voor alle wateren geldt, en in welke mate. Tevens dient te worden onderzocht of er een analytisch-chemische methode beschikbaar is die in plaats van het totaal koper de biologisch beschikbare koperfractie bepaalt.

Om die redenen hebben RIZA en STOWA in 1999 de opdracht gegeven een studie uit te voeren met als doel de biologische beschikbaarheid van koper in het Nederlandse oppervlaktewater te onderzoeken in relatie tot de aanwezigheid van organisch materiaal. De studie is uitgevoerd door een consortium bestaande uit het adviesbureau MERMAYDE te Bergen, het Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM-VU) te Amsterdam, en de Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek TNO (te Den Helder en Delft).

Projectteam en auteurs van de rapportage zijn dr. K.J.M. Kramer (MERMAYDE, coördinator), dr. B. van Hattum (IVM-VU), dr. R.G. Jak (TNO-MEP, den Helder) en drs. R.N. Hooftman (TNO-Voeding, Delft). Naast de auteurs hebben aan het project meegewerkt: ing. E.M. van der Vlies (TNO-MEP), ing. B. Borst, D. van Drongelen-Sevenhuijsen en ing. A. Akdemir (TNO Voeding), ing. I. Burgers, ing. M. van Velzen, drs. M. Rijkeboer, drs. R. Pasterkamp en drs. M. Laanen (IVM-VU), en de laboratoria van de Faculteit Aardwetenschappen - VU en OMEGAM. Namens de waterbeheerders boden M. Meirink (Hoogheemraadschap Uitwaterende Sluizen Hollands Noorderkwartier), G. Meijerink (Waterschap Regge en Dinkel), P. Schaap (Dienst Water en Riolering, Hilversum), I. Mol (RIZA, Meetstation Lobith) en W. Vos (RIZA, Meetstation Keizersveer) ondersteuning bij de keuze van de bemonsteringslocaties en/of assisteerden zij bij de monsternamen.

De door RIZA/STOWA ingestelde begeleidingscommissie bestond uit de volgende personen: drs. ing. M.G. Boute (Zuiveringschap Limburg), drs. D. Jonkers (Min. VROM/DGM), ir. M.J.G. Talsma (STOWA), dr. E. Sneller en dr. J.J.G. Zwolsman (RIZA), dr. ir. R.A. van der Meer (Wetterskip Fryslân), en dr. W. Verweij (RIVM - NOP).

Dit rapport heeft geleid tot meer inzicht in de kennis omtrent de ecotoxicologische risico's van koper in het Nederlandse oppervlaktewater. Namens de begeleidingscommissie spreken wij de wens uit dat dit rapport bijdraagt aan de discussie omtrent de normstelling voor koper.

Utrecht, september 2001

Hoofd hoofdafdeling Watersystemen RIZA
ir. F. Rutgers (wnd)

De directeur van de STOWA
ir. J.M.J. Leenen

VERKLARENDE WOORDENLIJST

afdw	as-vrij droog-gewicht
BCF	'bioconcentratiefactor' is de ratio tussen de interne lichaamsconcentratie ten opzichte van de opgeloste (externe) waterconcentratie (eenheid L/kg) en is gewoonlijk gedefinieerd voor evenwichtscondities
CBR	'critical body residue' de <i>in vivo</i> concentratie in een organisme die verantwoordelijk is voor de biologische, eventueel letale, effecten
Chelex	voor deze studie is het type Chelex 100 gebruikt, een zwak zure kationenwisselaar met als functionele groep R-N-(CH ₂ COO) ₂
CI	'confidence interval', betrouwbaarheidsinterval
Cu-Chelex	de in dit rapport gebruikte term voor de gemeten concentratie Cu die via de Chelex-methode werd bepaald (sectie 3.3.2)
Cu-daphnia	de in dit rapport gebruikte term voor de gemeten concentratie in Cu in <i>Daphnia</i> 's, die werden verzameld aan het einde van de toxiciteitstoets (interne concentratie)
Cu-DGT	de in dit rapport gebruikte term voor de gemeten concentratie Cu die via de DGT-methode werd bepaald (sectie 3.3.3)
Cu-ISE	de in dit rapport gebruikte term voor de gemeten concentratie Cu die met behulp van ion selectieve elektroden werd bepaald (sectie 3.3.4)
Cu-nominaal	de in dit rapport gebruikte term voor de via verdunning aangemaakte uitgangskoncentratie Cu in het toetsmedium.
Cu-totaal(F)	de in dit rapport gebruikte term voor de concentratie totaal opgelost Cu (F, na filtratie over 0.45 µm); in monitoring-programma's wordt dit meestal 'opgelost koper' genoemd
Cu-totaal(NF)	de in dit rapport gebruikte term voor de concentratie totaal Cu (niet gefiltreerd); opmerking: in monitoringsprogramma's wordt dit meestal 'totaal koper' genoemd
CV	'coefficient of variation', variatie coëfficiënt
DGT	'diffusive gradients in thin films', een techniek voor het (eventueel <i>in situ</i>) meten van die fractie van het totaal Cu die door een gel met zeer kleine poriën diffundeert; achter de gel bevindt zich Chelex 100 die deze fractie vastlegt zodat die later makkelijk kan worden geanalyseerd (als Cu); deze methode van fractioneren/verzamelen is tijdsafhankelijk (typisch wordt 24-48 uur expositie gebruikt)
DOC	'dissolved organic carbon', de totaal koolstofconcentratie van gefiltreerd water nadat het anorganisch koolstof (CO ₂ , (bi)carbonaten) door aanzuren en uitdrijven is verwijderd
d.w.	'dry-weight', drooggewicht
DSW	'Dutch standard water', een in de ecotoxicologie gebruikt achtergrond medium bestaande gedestilleerd water en enkele anorganische zouten (zie sectie 5.2), en redelijk representatief voor Nederlands oppervlaktewater; in alle gevallen is in het project Kopertox gebruik gemaakt van DSW zonder organische componenten.
DSWL-E	medium (standaardwater), bereid uit grondwater, afkomstig van een locatie nabij Linschoten) waaraan zouten, sporenelementen en EDTA wordt toegevoegd; wordt door TNO-Voeding gebruikt voor het kweken van <i>Daphnia magna</i> .
EC50	het effect van een te toetsen stof op een organisme (bijvoorbeeld <i>Daphnia</i>) kan worden uitgedrukt in de EC50 waarde (= effect concentratie, 50 %); dit is die blootstelling-concentratie, die in een oneindig grote populatie proefdieren bij 50 % van de dieren een effect (bijvoorbeeld onbeweeglijkheid) zou veroorzaken; voor een goed begrip: hoe hoger de EC50 hoe meer toxicant nodig is voor het beoogde effect, dus hoe minder giftig;

	de EC50 wordt weergegeven op basis van de blootstellingduur (bijvoorbeeld als 48h EC50 voor een tweedaagse test)
EC100	als EC50, echter dit is die blootstellingconcentratie, die in een oneindig grote populatie proefdieren bij 100 % van de dieren een effect (bijvoorbeeld onbeweeglijkheid) zou veroorzaken; de EC100 wordt weergegeven op basis van de blootstellingstuur
fulvine-zuren	een heterogene groep natuurlijke – operationeel gedefinieerde - organische verbindingen die niet afzonderlijk kunnen worden geïdentificeerd; ze ontstaan onder andere als (tussen)-producten door afbraak van organisch materiaal (planten), ofwel door productie (excretie) door algen; het betreft middelgrote verbindingen (500-2000 Dalton) die door het relatief grote aantal functionele plaatsen liganden zijn voor het vormen van (sterke) metaalcomplexen; samen met humuszuren vormen ze 'humus materiaal';
humus-zuren	als fulvine-zuren, echter in het algemeen grotere (> 2000 Dalton) en dus iets minder reactieve moleculen; ze zijn minder goed oplosbaar dan fulvine-zuren en vaak aanwezig in de vorm van colloïden
LBB	'lethal body burden', de in vivo concentratie in een organisme die verantwoordelijk is voor de letale effecten
LC50	als EC50, hier echter de 'letale concentratie'; dit is die blootstellingconcentratie, die in een oneindig grote populatie proefdieren bij 50 % van de dieren de dood zou veroorzaken; de LC50 wordt weergegeven op basis van de blootstellingduur (bijvoorbeeld: 48h LC50)
LOD	de detectiegrens ('limit of detection') van een analytische procedure is de laagste hoeveelheid stof (analiet) die in een monster kan worden bepaald, maar die niet noodzakelijk wordt gekwantificeerd als een exacte waarde; gewoonlijk gedefinieerd als 3× de standaardafwijking van de procedurele blanco
LOEC	'lowest observed effect concentration' is de laagste getoetste concentratie, waarbij gedurende de toets schadelijke effecten (bijvoorbeeld onbeweeglijkheid) worden waargenomen; de NOEC wordt weergegeven aan de hand van de blootstellingduur en de waargenomen effecten in vergelijking met die van relevante controle dieren en op basis van de blootstellingduur (bijvoorbeeld 48h LOEC, beweeglijkheid)
LOQ	de bepalingsgrens ('limit of quantification') van een analytische procedure is de laagste hoeveelheid stof (analiet) die kwantitatief met een acceptabele onzekerheid in een monster kan worden bepaald; gewoonlijk gedefinieerd als 10× de standaardafwijking van de procedurele blanco
MTR	maximaal toelaatbaar risico
MTT	maximaal toelaatbare toevoeging
NOEC	'no observed effect concentration' is de hoogst getoetste concentratie, waarbij gedurende de toets geen schadelijke effecten (bijvoorbeeld onbeweeglijkheid) worden waargenomen; de NOEC wordt weergegeven aan de hand van de blootstellingduur en de waargenomen effecten in vergelijking met die van relevante controle dieren en op basis van de blootstellingduur (bijvoorbeeld 48h NOEC, beweeglijkheid)
pCu	gedefinieerd als $-^{10}\log [\text{Cu}]$, bedoeld als de vrij koperconcentratie (notatie analoog aan die voor de zuurgraad, pH). Voorbeeld: $[\text{Cu}] = 10^{-11} \text{ M}$, ofwel $\text{pCu} = 11$
QSAR	'quantitative structure-activity relationship', de relatie tussen de chemische en/of fysische karakteristieken van stoffen en hun vermogen om een bepaald (biologisch) effect te veroorzaken
SD	'standard deviation', de standaardafwijking
TC	'total carbon', de totale (organisch en anorganisch) hoeveelheid koolstof

- TIC 'total inorganic carbon', de fractie anorganisch koolstof in een monster, vooral bestaande uit (bi)carbonaten en kooldioxide; door aanzuren wordt deze fractie vrijgemaakt en kan – na doorborrelen - worden gemeten (of verwijderd waarbij het DOC achterblijft)
- TOC 'total organic carbon'; alle koolstof die organisch gebonden is (inclusief elementair koolstof, (thio)cyanaten en carbiden)
- VR verwaarloosbaar risico

UITGEBREIDE SAMENVATTING

Zowel de Rijksoverheid als de regionale waterbeheerders onderhouden routine meetnetten waarbij de kwaliteit van het water wordt getest, en vergeleken met de geldende normen (MTR). Dit geschiedt ook voor het element koper. Het blijkt dat het MTR voor koper in het oppervlaktewater op een groot aantal plaatsen regelmatig wordt overschreden. Dit gebeurt op dermate grote schaal dat er een probleem dreigt te ontstaan voor het waterkwaliteitsbeheer.

Van koper is bekend dat het een sterke binding kan vormen met organische verbindingen die in het oppervlaktewater voorkomen, zoals humus- en fulvinezuren. Deze verbindingen (complexen) zijn biologisch niet of in beperkte mate beschikbaar voor organismen. De huidige normen zijn gebaseerd op ecotoxicologische toetsen in het laboratorium, en worden uitgedrukt op basis van totaal koper concentraties. Het is bekend dat in de natuur het koper door genoemde organische verbindingen deels wordt gedetoxificeerd, en dat totaal koper vaak geen directe relatie heeft met eventuele biologische effecten.

In dit project wordt nagegaan of in het Nederlandse oppervlaktewater de detoxificatie van koper door organisch materiaal een rol van betekenis speelt, en zo ja, of dit dan voor alle wateren geldt, en in welke mate. Tevens wordt onderzocht of er een analytisch-chemische methode beschikbaar is die in plaats van het totaal koper juist de biologisch beschikbare koperfractie bepaalt. Er is gekozen voor fractioneringsmethoden die respectievelijk gebruik maken van Chelex, van een diffuse gel (DGT), en van een koperion selectieve elektrode. Het meten van een 'fractie' die meer bevat dan alleen Cu^{2+} is niet *a priori* af te wijzen. Er kan een goede relatie van de koperfractie en de waargenomen biologische effecten bestaan.

In Fase I van het project is de toxiciteit van koper in een humusrijk oppervlaktewater (Vinkeveense Plassen) bestudeerd, waarvan door bijmenging met DSW (Dutch Standard Water) verdunningen zijn gemaakt met een variabel gehalte aan organisch materiaal, inclusief 'humusverbindingen'. In Fase II is getest of de bevindingen voor Fase I ook gelden voor andere Nederlandse oppervlaktewateren, waar de 'humus'-verbindingen immers kwalitatief en kwantitatief kunnen verschillen. Hiertoe zijn zes karakteristieke Nederlandse wateren geselecteerd die in januari, april, juli en oktober 2000 zijn bemonsterd. Naast de Vinkeveense Plassen (veenplas) zijn dat: Middensloot (Beemster, kleipolder), Beneden Regge (middelgrote rivier), Springendalse Beek (bovenloop), en de grote rivieren Rijn en Maas.

Onderzocht is, of er een verband bestaat tussen de concentraties 'humus' en 'vrij-koper' enerzijds, en de biologische effecten, gemeten als 48h EC50 *Daphnia* (beweeglijkheid) anderzijds. Verschillende analytisch-chemische methoden zijn getoetst om te zien of er een relatie bestaat met de biologische effecten, en zij dus het 'biologisch beschikbare' koper kunnen bepalen. Daarnaast zijn bioaccumulatiestudies uitgevoerd gericht op het bepalen van de interne dosis van watervlooiën uit de blootstellings-experimenten.

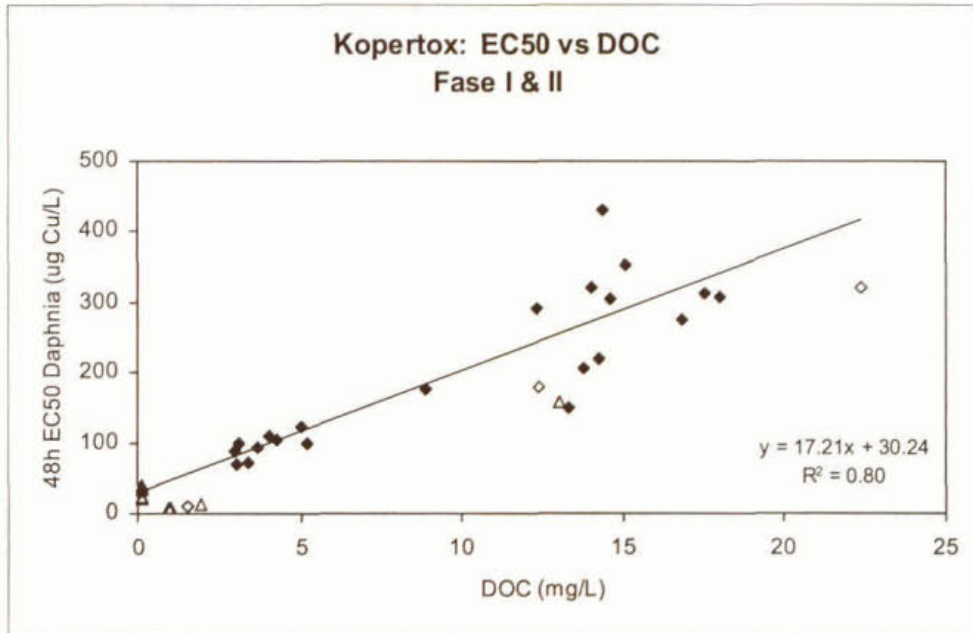
De resultaten laten zien dat er zowel voor de verdunningsreeks als voor iedere periode van Fase II een lineair verband bestaat tussen het biologisch effect (als EC50) en het gehalte opgelost organisch koolstof (DOC), of de lichtabsorptie bij 380 en 440 nm (mede een maat voor 'humus'). Opmerkelijk is dat dit verband onafhankelijk lijkt van het type water, en – in mindere mate – van het seizoen. De waarnemingen voor de Springendalse Beek wijken af van dit algemene beeld. Er is daar een lagere EC50/DOC ratio, mogelijk veroorzaakt door de relatief lage pH (ca 6.5) en een zeer lage alkaliniteit van dit water waardoor de vrij-koperconcentratie hoger is.

Een trendlijn door alle betrouwbare waarnemingen en met uitzondering van het niet-natuurlijke DSW, en de afwijkende Springendalse Beek (open symbolen in figuur 0.1) geeft een verband volgens:

$$48\text{h-EC50 } Daphnia \text{ (beweeglijkheid)} = 17.2 \times \text{DOC} + 30.2$$

waarbij de EC50 is uitgedrukt in $\mu\text{g Cu/L}$, de DOC in mg/L . Het verband geldt tenminste voor de getoetste wateren met een DOC bereik van 3 - 22 mg/L , maar ook DSW ligt op de lijn (Figuur 0.1). De UV-absorptie resultaten bij 380 of 440 nm geven een vergelijkbaar lineair verband met de gevonden EC50: bij hogere absorptie is een duidelijke toename in de EC50.

Figuur 0.1. Overzicht van de relatie 48h-EC50 (*Daphnia*, beweeglijkheid) vs DOC voor alle perioden van de Fasen I en II. Open symbolen betreffen waarnemingen die niet zijn meegenomen in de berekening van de lineaire trendlijn.

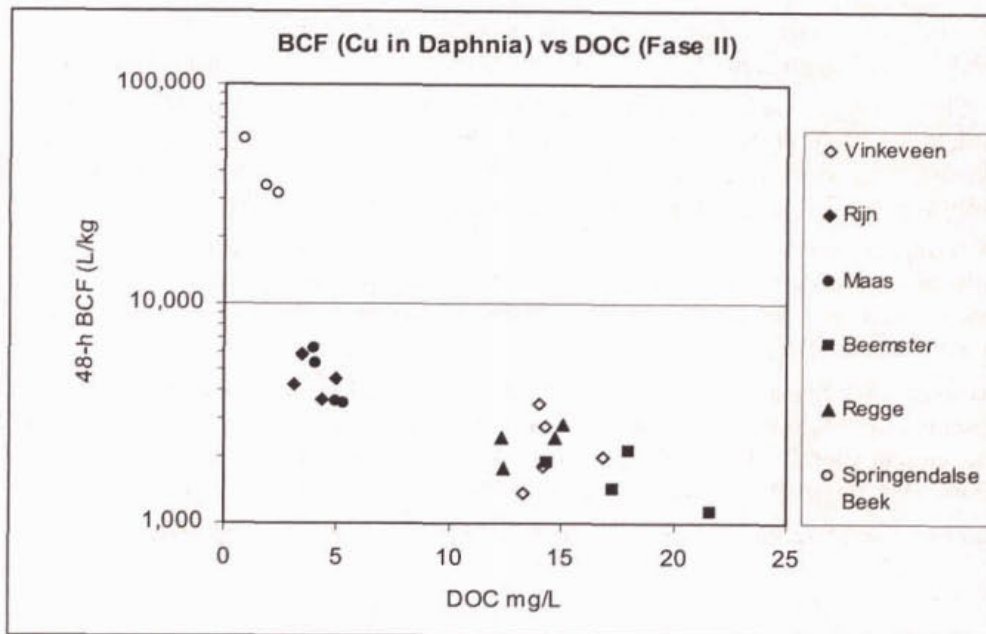


De resultaten van de bioaccumulatiestudie ondersteunen de hypothese dat de grote variatie in toxiciteit tussen de locaties samenvalt met grote verschillen in biologische beschikbaarheid en de op grond daarvan verwachte verschillen in interne dosis. De tot meer dan 10 maal oplopende verschillen in de bioconcentratie factoren (BCF) tussen de zes locaties covariëren in sterke mate samen met het DOC gehalte (Figuur 0.2). De seizoensvariatie binnen de locaties bedraagt een factor 2-3 en is van beperktere betekenis.

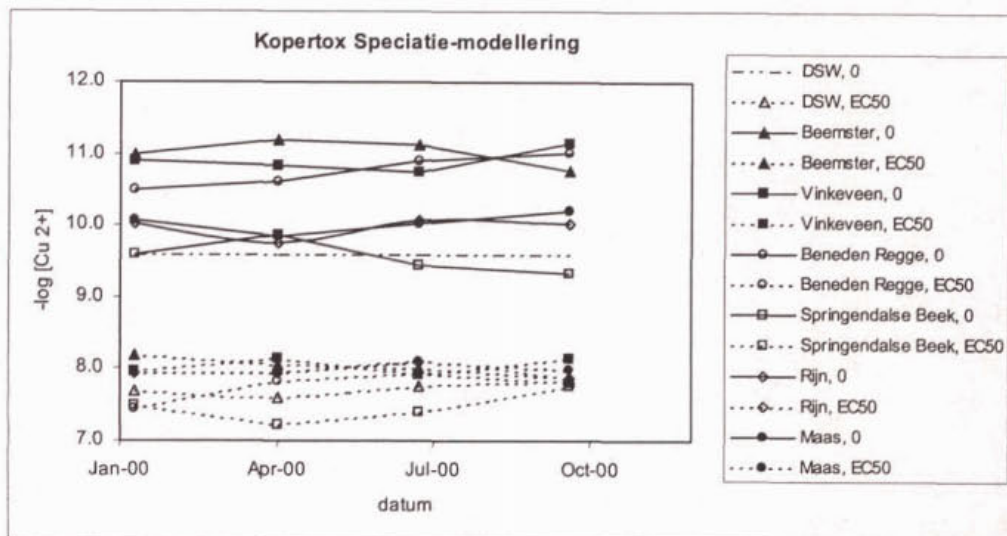
De resultaten voor de analyses van koper en de koperfracties in de wateren laten zien dat zowel de Chelex methode als de DGT methode een koperfractie bepalen die afhangt van samenstelling van het water. De methode die gebruik maakt van Chelex-100 geeft koperconcentraties die 80-90 % zijn van de concentratie aan totaal Cu. Van deze methode is de voorspellende waarde niet geschikt om direct het biologisch beschikbaar koper te bepalen. De DGT methode heeft betere kans, aangezien die vrij-koper en kleine (an)organische complexen bepaalt. Deze methode meet een fractie die meestal ligt rond de 10-40% van het totaal opgelost koper. Dit komt in de richting van met speciatie-modellering berekende fractie vrij-koper. Helaas kon de methode maar beperkt in natuurlijke wateren worden getoetst door de relatief lage Cu concentraties in relatie tot de detectiegrens van de standaard analyse methode voor totaal koper. De methode die gebruik maakt van een koperion selectieve elektrode geeft zeer lage koperconcentraties, maar de respons van de elektrode wordt waarschijnlijk beïnvloed door het 'humus', wat de interpretatie bemoeilijkt. Deze ISE-methode lijkt daardoor niet geschikt om direct het biologisch beschikbaar koper te bepalen.

De speciatie-modellering laat zien dat er in de natuurlijke wateren aanzienlijke verschillen bestaan in de (berekende) concentratie Cu^{2+} , met als laagste concentraties de wateren met de hoogste concentraties DOC (10^{-11} M Cu^{2+}); voor wateren met $10\times$ lagere DOC gehalten wordt een $10\times$ hogere koperconcentratie berekend (Figuur 0.3). De berekende concentraties vrij koper (als Cu^{2+}) zijn, uitgaande van de totaal-koperconcentraties gevonden voor de 48h-EC50s voor *Daphnia*, voor alle media nagenoeg gelijk (ongeveer 10^{-8} M Cu). Uitzonderingen hierop zijn de atypische wateren Springendalse Beek en DSW. Er blijkt een sterk effect van de pH op de koperconcentratie.

Figuur 0.2. Interne koper-concentratie in *Daphnia* (als BCF nabij de 48h-NOEC) vs het DOC gehalte van de 6 bemonsterde wateren en DSW (Fase II)



Figuur 0.3. Berekende $[Cu^{2+}]$ voor de 6 wateren en DSW bij natuurlijke totaal-koperconcentratie (—) en die bij de EC50 *Daphnia* (---).



Er kan worden gesteld dat deze studie een antwoord geeft op de gestelde vragen. Een consistent beeld wordt gevormd waarbij de toxiciteit van koper in sterke mate wordt bepaald door de aanwezigheid van natuurlijk organisch materiaal. Dat (een deel van) het organisch materiaal koper bindt tot biologisch niet-beschikbare complexen, en dat vrij koper opgenomen kan worden door organismen. De resultaten van zowel de chemische analyses van de waterkwaliteit en de biota, de biologische effect-parameters als de speciatie modellering versterken elkaar. Een groot deel van het Nederlandse oppervlaktewater heeft een

concentratie DOC ≥ 3 mg/L en een pH > 7.5 . Hier zal dus remming van de toxiciteit van koper door natuurlijk 'humus' optreden.

Derhalve kan worden geconcludeerd dat:

- de resultaten van de huidige studie geven aan dat de aanwezigheid van opgeloste organisch materiaal (DOC) voor *Daphnia* de beschikbaarheid, opname en toxiciteit van koper aanzienlijk vermindert;
- met betrekking tot de huidige waterkwaliteitsnormstelling van koper (en andere metalen) kan worden gesteld dat het MTR (en streefwaarde) wordt berekend op basis van de resultaten van laboratorium ecotoxiciteitsexperimenten bij (vrijwel) afwezigheid van opgelost organisch materiaal. In het vastgestelde MTR (en streefwaarde) is het detoxificerende effect van DOC niet verwerkt;
- de resultaten van de huidige studie suggereren dat indien bij de normstelling voor koper (dan wel bij de toetsing aan de norm van gemeten gehalten van koper in oppervlaktewater) rekening gehouden zou worden met de aanwezigheid van DOC in het oppervlaktewater er van een verlaging van 'normoverschrijding' sprake zou zijn;
- alvorens dit kan worden geconcludeerd eerst moet worden onderzocht of de vermindering van de beschikbaarheid, opname en toxiciteit van koper als gevolg van de aanwezigheid van DOC, zoals aangetoond voor *Daphnia*, ook optreedt bij andere organismen zoals algen en vissen. Tevens dienen de effecten als gevolg van chronische blootstelling nader te worden bestudeerd;
- een vervolgonderzoek hiernaar wordt aanbevolen (dat inmiddels is opgestart).

1 INLEIDING

1.1 Onderzoekskader

In het kader van het nationale project 'Integrale Normstelling Stoffen' van de ministeries van VROM, V&W, LNV en EZ is, in samenwerking met de industrie, een programma opgestart met betrekking tot de normstelling voor essentiële metalen (bijvoorbeeld koper (Cu) en zink (Zn)), zie bijvoorbeeld Sijm *et al.* (1999).

In een conceptueel kader is beschreven op welke wijze de normstelling voor essentiële metalen (idealiter) zou moeten plaatsvinden en met welke aspecten (tenminste) rekening gehouden zou moeten worden (Slijkerman *et al.*, 2000). Het gaat hierbij onder meer om:

- natuurlijke achtergrondgehalten,
- het onderscheid tussen totaal gehalten en de zogenaamde 'biologisch beschikbare fractie',
- adaptatie van organismen aan (mogelijk natuurlijke) hogere achtergrondgehalten,
- essentieel zijn van het element en (het voorkomen van) deficiëntieniveaus.

Het doel van het programma is om tot een consensus te komen over de manier waarop essentialiteit van metalen al dan niet in de normstelling moet worden meegenomen, wat uiteindelijk kan resulteren in een veranderde normstelling voor essentiële metalen.

In Nederland worden de concentraties zware metalen, dus ook Cu, beoordeeld naar hun totale concentratie in het milieu. De gemeten concentraties worden vergeleken met het MTR¹⁾, het 'maximaal toelaatbaar risico'. Het MTR wordt berekend als de optelsom van een natuurlijk achtergrondgehalte (dat van gebied tot gebied kan variëren) plus een (vaste) toevoeging. Deze toevoeging (de MTT: maximaal toelaatbare toevoeging) is een ecotoxicologische interpretatie van een (grote) serie ecotoxicologische waarnemingen, uitgevoerd in het laboratorium onder gestandaardiseerde condities (standaard water, temperatuur, lage TOC, optimale conditie van de proefdieren, gebruik van gevoelige stadia, etc.). De MTT wordt afgeleid uit de waarschijnlijkheidsverdeling van NOEC's of andere 'end-points' (zoals EC50 of LC50, voor groei, overleving of reproductie) van een veelheid van organismen uit verschillende trofische niveaus, en zo gekozen dat minimaal 95 % van de soorten als beschermd mag worden verondersteld (Karman & Jak, 1997). Daarnaast zijn streefwaarden opgesteld voor de lange termijn. Deze zijn gebaseerd op het Verwaarloosbaar Risico (VR). Slijkerman *et al.* (2000) geven een gedetailleerd overzicht van de afleiding van ecotoxicologische risicogrenzen.

Voor koper gelden de volgende normen. Het MTR voor opgelost koper bedraagt 1.5 µg/L en voor totaal koper 3.8 µg/L (bij 30 mg/L zwevend stof). Streefwaarden, opgesteld voor de lange termijn, bedragen 0.5 en 1.1 µg/L voor respectievelijk opgelost en totaal koper (Min. V&W, 1998). De achtergrondconcentratie van koper is momenteel voor het Nederlandse oppervlaktewater vastgesteld op 0.3 µg/L. Evenwel, een meer gebiedsgerichte aanpak krijgt vorm door de landelijke achtergrondconcentratie te vervangen door het lokaal of regionaal vastgestelde achtergrondgehalte (Min. V&W, 1998).

Oorzaak-effect relaties op basis van totaal Cu concentraties blijken in het algemeen niet goed de realiteit te beschrijven (Morris & Russel, 1973; Wang, 1987; Sprague, 1985; Allen & Hansen, 1996). Reeds jaren is bekend dat organische verbindingen, bijvoorbeeld natuurlijke humus- en fulvinezuren sterke complexen kunnen vormen met Cu. Men gaat er van uit dat koper, gecomplexed aan 'humus' niet of slechts voor een zeer klein deel biologisch beschikbaar is. Door complexering van vrij koper [Cu²⁺] wordt de concentratie hiervan verlaagd.

¹ Zie voor afkortingen en acronyemen de verklarende woordenlijst aan het begin van dit rapport.

Een MTR voor Cu, gebaseerd op ecotoxicologische gegevens, dus op 'beschikbare' kopergehalten, kan mogelijk de oorzaak-effect relaties meer adequaat te beschrijven (Allen & Hansen, 1996; Renner, 1997).

1.2 Projectdoelstellingen

Totaal koper gehalten, in monitoringsprogramma's vaak gemeten als de som van opgelost en particulier koper, zijn goed bekend uit de rapportages van de waterbeheerders. Het blijkt dat het MTR voor koper in vele gebieden regelmatig wordt overschreden. Aangezien dit ook gebeurt voor wateren die als biologisch gezond worden beschouwd, kan men zich afvragen of de vertaling van de ecotoxicologische laboratorium experimenten naar de veldsituatie geen bijstelling behoeft, bijvoorbeeld door voor koper de detoxificerende werking van natuurlijk organisch materiaal mee te wegen.

Teneinde een idee te krijgen van de 'biologisch beschikbare fractie' en de daaraan gerelateerde biologische effecten, is in dit project gecombineerd milieu-chemisch en ecotoxicologisch onderzoek verricht naar het voorkomen van 'totaal' (opgelost) en het 'biologisch beschikbaar' koper in een doorsnee van Nederlandse oppervlaktewateren. Verschillende karakteristieke wateren zijn in het onderzoek betrokken, ieder met een verschillend gehalte aan (natuurlijke) organische verbindingen inclusief humus- en fulvinezuren, en met een verschillend totaal (en vrij) kopergehalte. De mate waarin deze organische complexvormers significant de toxiciteit van koper verlagen is onderzocht door middel van een toxicologische toets met watervlooiën (48h EC50, *Daphnia magna*, beweeglijkheid), terwijl verschillende analytisch-chemische technieken zijn toegepast om te onderzoeken of de biologisch beschikbare fractie via een analysemethode gekwantificeerd kan worden.

Het project heeft zich in eerste instantie gericht op de biologische beschikbaarheid en de voor Nederland karakteristieke achtergrondgehalten van 'biologisch beschikbaar' koper. Het onderzoek is in twee Fasen uitgevoerd.

In Fase I staan de volgende vragen centraal:

- bestaat er, voor een karakteristiek Nederlands oppervlaktewater, een relatie tussen de hoeveelheid natuurlijk 'humus' en de remming van de toxiciteit van koper (als gevolg van complexering), te detecteren als het ontstaan van een biologisch effect bij watervlooiën (*Daphnia magna*)?
- is er een analytisch-chemische (fractionerings-)methode, die correleert met de gevonden koper-complex / toxiciteit relatie, zodanig dat die de zogeheten 'biologisch beschikbare fractie' kan kwantificeren?

Voor deze Fase is een humusrijk oppervlaktewater (Vinkeveense Plassen) bestudeerd, waarvan door bijmenging met DSW (Dutch Standard Water, zonder organisch materiaal) verdunningen worden gemaakt om zo een reeks toetsoplossingen te creëren met een range aan 'humus'-gehalten (0-100 % natuurlijk niveau). Doordat een verdunningsreeks wordt gemaakt blijft de karakteristiek van het natuurlijke organische materiaal gelijk.

Naast de analyse van totaal Cu, worden drie verschillende koperfractionerings- (speciatie-) methoden gebruikt ter kwantificering van mogelijk 'biologisch beschikbare' fracties.

In Fase II komen additioneel aan de vragen van Fase I de volgende vragen aan de orde:

- wat is de concentratie totaal opgelost en 'biologisch beschikbaar' koper voor verschillende karakteristieke Nederlandse oppervlaktewateren,
- hoe veranderen deze met de seizoenen,
- zijn de koperbindende eigenschappen van de 'humus' fractie op deze locaties vergelijkbaar (bijvoorbeeld per gram opgelost organisch koolstof, DOC).

In Fase II zijn deze vragen met tussenposen van drie maanden steeds getoetst voor een zestal typische Nederlandse oppervlaktewateren, variërend van humusrijk tot humusarm. In ieder watertype zijn, als in Fase I, wederom de chemische en toxicologische karakteristieken bestudeerd.

Twee aanvullende onderzoeken, die in opdracht van het RIZA binnen het project zijn uitgevoerd, zijn in deze rapportage ingebracht.

De vraagstelling betrof allereerst de analyse van koper in de proefdieren (aan het einde van de toxiciteitstoets):

- kan de interne concentratie van de proefdieren gerelateerd worden aan de waterkwaliteit (Cu, DOC), en is er een relatie met de waargenomen biologische effecten (gemeten als EC50).

Verder is er verzocht een korte speciatie-modellering uit te voeren met als invoer van het model de gemeten concentraties anorganische componenten en het organisch materiaal:

- wat is de berekende vrij-koperconcentratie in de verschillende oppervlaktewateren (zes locaties);
- wat is de vrij-koperconcentratie in de media van de toxiciteitstoetsen, met name bij de gemeten EC50 waarden.

1.3 Leeswijzer

De eindrapportage is gericht op zowel de specialist als de geïnteresseerde waterbeheerder of onderzoeker. Aan het begin van het rapport wordt in de verklarende woordenlijst kort uitgelegd wat met de verschillende gebruikte afkortingen en termen wordt bedoeld. Om een herhaling van argumenten en discussiepunten te voorkomen, en aangezien Fase II voortbouwt op de resultaten van Fase I, is de eindrapportage van de Fasen I en II van het project samengevoegd in dit rapport.

Het eerste deel van het rapport (na de *inleiding* de hoofdstukken 2, 3 en 4) geeft de benodigde achtergrondinformatie, die essentieel is voor het begrijpen van de onderzoeksvragen, de uitvoering van de studie en de resultaten.

In *hoofdstuk 2* wordt nader ingegaan op de rol van koper in het milieu. In een kort literatuuroverzicht wordt in detail ingegaan op de rol van de chemische speciatie van koper, het effect daarvan op de biologische beschikbaarheid resulterend in de waargenomen biologische effecten.

Hoofdstuk 3 geeft een overzicht van de belangrijkste onderzoeksmethoden die men kan toepassen in dit chemisch/biologisch speciatie-onderzoek. Een aantal biologische (ecotoxicologische) effectmetingen passeert de revue, die onder meer gebruik maken van bacteriën, algen, mosselen en watervlooien. Van elk van de methoden worden de voornaamste karakteristieken genoemd, met de voor- en nadelen voor gebruik in het kader van dit onderzoek. De belangrijkste chemische analyse methoden die kunnen worden ingezet bij speciatieonderzoek worden kort becommentarieerd. Bijvoorbeeld, methoden die totaal-koper bepalen, maar ook die - vaak experimenteel - gedefinieerde fracties meten, zoals bijvoorbeeld de Chelex-methode, de DGT-methode en elektrochemische technieken komen aan de orde. Van elk van de methoden worden de voornaamste karakteristieken genoemd, met de voor- en nadelen voor gebruik in het kader van dit onderzoek. Aan het eind van de biologisch/toxicologische en chemische secties wordt de keuze van de voor dit onderzoek gebruikte technieken toegelicht.

De opzet van het onderzoek in een korte voorstudie en de Fasen I en II en de praktische invulling hiervan wordt toegelicht in *hoofdstuk 4*. Dit hoofdstuk is voor elke lezer van belang omdat het een gedetailleerd overzicht geeft van de koppeling tussen de onderzoeksvragen en de invulling in het praktisch onderzoek. Twee 'flow-schema's' bieden houvast bij het volgen van de acties in de tijd.

Het tweede deel van het rapport beschrijft het onderzoek en de resultaten. Na de technische informatie omtrent de toegepaste methoden en technieken (*hoofdstuk 5*) worden de resultaten in schematische vorm gepresenteerd (*hoofdstuk 6*). Om het rapport leesbaar te houden zijn hier slechts de belangrijkste chemische en ecotoxicologische resultaten vermeld. Met name die resultaten waarvan in de discussie gebruik wordt gemaakt worden hier gegeven. In de *Annex* (achter in het rapport) vindt men een meer complete set resultaten in tabelvorm.

De discussie in *hoofdstuk 7* gaat in op de onderzoeksvragen en de gevonden resultaten, en geeft een gedetailleerde evaluatie. Mede aan de hand van grafieken worden de resultaten van de Fasen I en II van commentaar voorzien. Getracht is om de resultaten zo te presenteren dat ook de minder gespecialiseerde lezer - eventueel met de hulp van de informatie uit de hoofdstukken 2 en 3 - de discussie goed kan volgen.

De *conclusies* en *aanbevelingen*, en een lijst met verwijzingen naar de gebruikte literatuur besluiten de rapportage.

2 ECOLOGISCHE EFFECTEN VAN KOPER

2.1 Koper als essentieel element

Er zijn een aantal aspecten ten aanzien van koper (Cu) en een aantal andere metalen die belangrijk zijn voor de evaluatie van toxische concentraties op organismen. Belangrijk is, zoals in deze studie wordt onderzocht, de speciatie van koper. Het blijkt dat slechts een kleine fractie van de totaalgehalten aan koper (en sommige andere metalen) daadwerkelijk biologisch beschikbaar is en eventueel tot effecten kan leiden. In de tweede plaats is koper niet alleen toxisch (bij hoge concentraties), maar ook een essentieel (kritisch) element waar organismen niet buiten kunnen. Een te lage koperconcentratie leidt tot deficiëntie, wat net als bij een te hoge concentratie tot biologische effecten zal leiden. Bij de risicoanalyse van koper wordt tot op heden slechts in beperkte mate rekening gehouden met deze aspecten (Karman & Jak, 1997; Slijkerman *et al.*, 2000).

Koper vormt net als een aantal andere metalen (zoals kobalt, mangaan, nikkel, selenium en zink) een kritische component in biochemische structuren zoals enzymen die nodig zijn voor het uitvoeren van metabole functies. Anders dan voor xenobiotische stoffen en niet-essentiële metalen (bijvoorbeeld cadmium) zijn daarom in de loop van de evolutie mechanismen ontwikkeld om deze essentiële elementen op te nemen uit een milieu waar slechts weinig metaal biologisch beschikbaar is, en een teveel aan opgenomen metaal weer actief uit te scheiden (Simkiss & Taylor, 1989). Deze afstelling van de lichaamsconcentratie tot een geprefereerd of aanvaardbaar niveau wordt homeostatische regulatie genoemd. Beneden dit concentratiebereik treedt deficiëntie op, daarboven toxiciteit (Chapman *et al.*, 1996).

Organismen hebben zich aangepast aan de natuurlijke achtergrondconcentraties van zware metalen in het milieu, welke overigens van plaats tot plaats kunnen variëren. Hierdoor is ook de gevoeligheid voor hoge concentraties niet voor elke populatie binnen een soort gelijk. Behalve de hoogte van deze concentraties zijn milieufactoren die de beschikbaarheid beïnvloeden ook van groot belang.

De toxiciteit van koper, zoals vooral is waargenomen in laboratorium experimenten, is relatief hoog voor een grote verscheidenheid aan organismen. Ook bij betrekkelijk lage concentraties ($< 10 \mu\text{g Cu/L}$) kunnen soorten uit verschillende groepen (bacteriën, algen, weekdieren, kreeftachtigen, insecten en vissen) effecten ondervinden (Crommentuijn *et al.*, 1997). Ook binnen elke groep kunnen echter grote verschillen in gevoeligheid bestaan.

2.2 Biologische beschikbaarheid en effecten

Algemeen wordt aangenomen dat vrije, divalente koper-ionen (Cu^{2+}) biologisch actief zijn, dat wil zeggen opgenomen worden door organismen en daardoor bij hoge concentraties tot effecten kunnen leiden. De toxiciteit van metalen wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals veranderingen in redoxpotentiaal, concentraties van macro-elementen (Ca, K, Na, Mg), pH, temperatuur, de concentratie van zuurstof, fosfaten, organische liganden en aanwezigheid van deeltjes (anorganisch en organisch, (micro)organismen) (Wang, 1987; Depledge *et al.*, 1994). Vooral veranderingen in deze factoren, waarbij de biologisch beschikbare fractie toe of af kan nemen, zijn van invloed op de toxiciteit. In zoete wateren komen metalen vooral geadsorbeerd aan deeltjes voor, maar geadsorbeerde en opgeloste concentraties zijn in principe in evenwicht. Bij verlagen van de opgeloste concentratie (bijvoorbeeld door biologische opname) zal een deel van de geadsorbeerde fractie vrijkomen in oplossing. Van uitputting zal niet gauw sprake zijn.

Behalve deze abiotische factoren zijn ook biotische factoren (soort, levensstadium, voedingsgewoonten en -conditie, adaptatie als het niet genetisch vastgelegde gevolg van eerdere blootstelling, en tolerantie als genetisch vastgelegde verminderde gevoeligheid) van belang voor de toxiciteit van een stof.

2.3 Chemische speciatie en kopertoxiciteit

Reeds jaren is bekend dat organische verbindingen, bijvoorbeeld natuurlijke humus- en fulvinezuren, maar ook EDTA of NTA, stabiele complexen kunnen vormen met Cu. Er zijn vele aanwijzingen uit experimenten uitgevoerd in het laboratorium, in mesocosms en in het veld, dat deze sterke kopercomplexen niet biologisch beschikbaar zijn, en dat slechts een (kleine) fractie, het 'vrij koper', de celmembranen kan passeren (Morris & Russel, 1973; Sunda & Lewis, 1978; Creselius *et al.*, 1982; Graneli *et al.*, 1986, en vele anderen). In de literatuur zijn mechanismen beschreven waar sommige uitscheidingsproducten van algen juist bedoeld zijn om (te) hoge vrije koperconcentraties te complexeren, en zo te detoxificeren (Zhou *et al.*, 1989). Er wordt inmiddels vrij algemeen aangenomen dat met name het vrije koper, $[Cu^{2+}]$, en eventueel de kleine (an)organische complexen van belang zijn voor biologische beschikbaarheid (Wright, 1978; Luoma, 1983; Winner, 1984; Campbell *et al.*, 1988; Perdue *et al.*, 1989; Florence *et al.*, 1990).

Recent is aangetoond voor een door mijnbouwactiviteiten sterk met koper vervuuld estuarium (Maquarie Harbour), dat 7 mg/L van nature aanwezig DOC voldoende was om in een 72h algentoets (groeiremming) geen biologische effecten te genereren (toets LOEC = 5 $\mu\text{g Cu/L}$). Opgeloste concentraties totaal koper waren <42 $\mu\text{g Cu/L}$. Sorptie van opgelost organisch materiaal aan het celmembraan verhinderde dat koper niet in de cel kon doordringen (Stauber *et al.*, 2000).

Het gehalte opgelost organisch koolstof (DOC) in oppervlaktewater varieert als gevolg van vele factoren, zoals het soort water (beek, rivier, meer, ven), de grootte en diepte, de hoeveelheid en de soort vegetatie, de bodemgesteldheid (klei, veen, zand), de klimaatzone, het seizoen. DOC varieert van < 1 mg/L voor kleine bergbekken tot 25 mg/L voor water uit moerassen en 'wetlands', met uitschieters tot wel 60 mg/L (Thurman, 1985).

In natuurlijke wateren bestaat een aanzienlijk deel van het opgelost organisch koolstof (DOC) uit humus- en fulvinezuren. Het betreft een heterogene groep natuurlijke – operationeel gedefinieerde – sterk gekleurde organische verbindingen. Ze ontstaan onder andere als (tussen)-producten door afbraak van organisch materiaal (planten), of ze worden door levende algen geproduceerd. Fulvine-zuren zijn middelgrote verbindingen (500-2000 Dalton) die, door het relatief grote aantal functionele plaatsen, liganden zijn voor het vormen van (sterke) metaalcomplexen. Humus-zuren zijn in het algemeen grotere (> 2000 Dalton) en daardoor iets minder reactieve moleculen. Ze zijn minder goed oplosbaar dan fulvine-zuren en vaak aanwezig in de vorm van colloïden. Hoewel men spreekt van humus- en fulvinezuren, of kortweg 'humus', bestaan deze niet uit één of enkele verbindingen, maar met een breed scala aan stoffen die voor een deel vergelijkbare eigenschappen bezitten, zoals bijvoorbeeld de sterke absorptie van UV licht. Deze natuurlijke polymeren zijn slecht afbreekbaar waardoor zij accumuleren in aquatische systemen. Ze vormen meestal de belangrijkste fractie van DOC (afhankelijk van het water 50 % of meer; Thurman, 1985).

Er blijkt uit onderzoek in systemen met een constante concentratie vrij koper (koper-gebufferd), dat een directe $[Cu^{2+}]$ vs biologisch effect relatie aantoonbaar is voor verschillende trofische niveaus, bijvoorbeeld: algen en fytoplankton (Sunda & Guillard, 1976; Gavis *et al.*, 1981), zoöplankton (Winner & Gauss, 1986; Sunda *et al.*, 1987; Winner *et al.*, 1990), bentische organismen (Moffet & Brand, 1996; Kramer & Foekema, 2000). Dat complexgebonden koper niet wordt opgenomen wordt bevestigd door bioaccumulatie experimenten met mosselen in aan- en afwezigheid van de sterke complexvormer EDTA (Peereboom, 1992).

In een recent rapport (Karman *et al.*, 1999) wordt, als onderdeel van een onderzoek naar de mogelijke biologische beschikbaarheid van Cu (vanuit aangroeiwerende verven), een overzicht gegeven omtrent de (berekende) concentraties $[Cu^{2+}]$ die in zeewater worden aangetroffen, en de concentraties waarbij biologische effecten worden waargenomen. Wanneer net als bij de zuurgraad (pH), de pCu wordt

gedefinieerd als $-\log [Cu^{2+}]$, dan kan men in het algemeen stellen dat gevoelige soorten effecten tonen bij een $pCu < 11$, en de meeste soorten bij $pCu < 10$. Het zal duidelijk zijn dat deze getallen orden van grootte verschillen van de totale Cu concentraties in het aquatisch milieu (in de orde van 10^{-6} - 10^{-7} M, $pCu = 6-7$).

2.4 Chemische speciatie en kopertoxiciteit voor *Daphnia* spp.

Omdat in het project KOPERTOX gebruik is gemaakt van de watervlo als toetsorganisme voor de biologische effectstudies (zie sectie 3), volgt hier een overzicht van de literatuurgegevens betreffende de toxiciteit van koper voor *Daphnia* sp.

De toxiciteit wordt doorgaans beschreven met een EC50 of LC50. Deze geeft de concentratie aan waarbij 50 % van de populatie een bepaald effect ondervindt of sterft. Hoe lager de EC50, hoe minder (toxische) stof nodig is om dat effect te bereiken, dus ook hoe hoger de toxiciteit van de stof. Door toevoeging van DOC wordt koper gecomplexed, wordt minder biologisch beschikbaar, en dus moet meer koper worden toegevoegd voordat een bepaald biologisch effect wordt bereikt. De toxiciteit van koper wordt verlaagd, de EC50 neemt dus toe. Zie sectie 3.1 voor een meer gedetailleerde uitleg.

Afname van de toxiciteit van koper is eerder beschreven voor *Daphnia* in relatie tot de organisch materiaal (DOC) of humusconcentratie (Winner, 1984; Paulauskis & Winner, 1988; Meador, 1991), en voor *Ceriodaphnia rubia* (Kim *et al.*, 1999). Ook hier blijkt dat organische liganden een dominante invloed hebben op de toxiciteit van koper (Wang, 1987). Veel van deze studies zijn uitgevoerd met watervlooien (Cladoceren) van het geslacht *Daphnia* of *Ceriodaphnia*, hoewel deze niet altijd de gevoeligste soorten voor koper in aquatische systemen zijn (Winner *et al.*, 1990; Koivisto *et al.*, 1992). Uit deze studies blijkt dat organische liganden de effectconcentraties van koper verhogen, oftewel de toxiciteit op basis van totaal (opgelost) koper verlagen. De aanwezigheid van liganden wordt onder meer beïnvloed door de trofische graad van het systeem (mate van trofie, voedselrijkdom) en het seizoen.

Door Winner *et al.* (1990) zijn in drie perioden in het jaar (voorjaar, zomer, herfst) experimenten uitgevoerd waarbij een oligotrofe planktongemeenschap in een plastic zak (mesocosm) is ingesloten. Na koper addities zijn de effecten vijf weken gevolgd op de levensgemeenschap. Zowel fytoplankton als zoöplankton bleken het gevoeligst in het voorjaar. Geopperd wordt dat dit een gevolg is van lage bindingscapaciteit voor koper van vijverwater vanwege de seizoensveranderingen in de concentratie van opgelost organisch koolstof (DOC). In de zomer worden door biologische activiteit (primaire productie, excretie) hogere concentraties DOC opgebouwd welke in de winter langzaam afgebroken worden. Het type DOC waar het in dit geval om gaat bestaat uit labiele, relatief goed afbreekbare stoffen als koolhydraten, eiwitten, aminozuren, vetten en andere laagmoleculaire stoffen (Wetzel, 1983). Deze stoffen worden samengevat als 'niet-humus' stoffen, die overigens soms ook koper kunnen binden. In de meeste wateren overheersen echter 'humusverbindingen'.

In Tabel 2.1 zijn literatuurgegevens over de reductie van de toxiciteit van koper voor *Daphnia* door organische verbindingen, die hieronder zijn beschreven, samengevat.

Uit onderzoek van Meador (1991) blijkt dat $[Cu^{2+}]$ inderdaad bepalend is voor de toxiciteit van koper voor *Daphnia magna*. De concentratie van Cu^{2+} is door Meador gevarieerd met verschillende concentraties totaal koper (10 tot 75 μg Cu/L), DOC (0 tot 6 mg/L) en pH-waarden (7, 7.5 en 8). Het complexerend vermogen van een oplossing bleek beperkt te worden door lage concentraties DOC en door relatief hoge concentraties Cu. De 48h LC50 voor *Daphnia magna* bij pH 7.0 nam toe van ca. 6 μg /L totaal koper bij een DOC = 0 mg/L naar ca. 74 μg Cu/L bij DOC = 3.8 mg/L. Bij hogere pH-waarden waren de LC50's 20-25 μg Cu/L (bij een DOC = 0-2 mg/L).

Vergelijkbaar onderzoek met *Daphnia pulex* is uitgevoerd door Winner (1984) die 72h-LC50's afleidde in afwezigheid en in aanwezigheid van humuszuren (1.5 mg afdw/L), welke respectievelijk 28.3 en 53.2 μg Cu/L bedroegen bij pH 8.3. Daarbij bleek dat zowel de overleving als de reproductie positief beïnvloed werden door toevoeging van humuszuren aan een oplossing met 30 μg Cu/L. Opmerkelijk is dat er in dit experiment geen verschillen in bioaccumulatie zijn waargenomen. Gesuggereerd werd dat

dermate veel energie in de regulatie van de interne concentratie is geïnvesteerd dat dit ten koste gaat van de overleving en reproductie.

Kim *et al.* (1999) vonden een vergelijkbaar verband voor een DOC range van 0-10 mg/L en een pH = 8 voor de verwante soort *Ceriodaphnia dubia* (Tabel 2.1). Zij laten zien dat de binding van Cu aan natuurlijk organisch materiaal tijd vergt, en dat het equilibreren van de Cu-oplossing vooraf aan de toxiciteitstoets essentieel is.

Tabel 2.1. Literatuurgegevens betreffende de EC50/LC50 waarden voor koper in aanwezigheid van opgelost organisch materiaal (DOC).

Concentratie DOC [mg/L]	pH	Species	Duur [uur]	EC50 / LC50 [µg/L]	Referentie
0	7.0	<i>D. magna</i>	48	6	1)
3.8	7.0			74	
0	7.5			19	
2	7.5			57	
0	8.0			19	
2	8.0			70	
0	8.3	<i>D. pulex</i>	72	28.3	2)
1.5	8.3			53.2	
0	8.0	<i>C. dubia</i>	24 h	25	3)
3	8.0			73	
10	8.0			262	

- 1) Meador, 1991
- 2) Winner, 1984
- 3) Kim *et al.*, 1999

Door Borgmann & Ralph (1983) is de invloed van aminozuren op de toxiciteit van koper voor *Daphnia magna* onderzocht door vaststelling van de 48h EC50 (beweeglijkheid) bij pH 8.4. De EC50 waarden op basis van vrije koper ionen varieerden van pCu = 7.5 in afwezigheid van organische verbindingen tot pCu = 10.5 in aanwezigheid van hoge concentraties glycine (800 µM). Vergelijkbare experimenten zijn uitgevoerd door Khangarot *et al.* (1987) met 18 verschillende aminozuren, afzonderlijk toegevoegd in concentraties van 10 mg/L. De 48h LC50 voor *Daphnia magna* in afwezigheid van aminozuren bedroeg 93 µg Cu/L (bij pH 8.4), en nam afhankelijk van het aminozuur toe met een factor 4.7 tot 27 (tussen de 350 en 2.516 µg/L; Tabel 2.1). Interessant is dat Fish & Morel (1983) uitscheiding van organische stoffen door *Daphnia magna* aantoonde bij blootstelling aan koper in een anorganisch medium. Deze stoffen fungeerden als liganden en hadden stabiliteitsconstanten (K) die overeenkomen met die van humus- en fulvinezuren.

Uit de wetenschappelijke literatuur kan samengevat gesteld worden dat humuszuren en andere organische stoffen de toxiciteit van koper verlagen. Hierdoor kunnen de effectconcentraties (bijvoorbeeld gemeten als EC50) op *Daphnia* spp. meer dan een orde van grootte toenemen. Deze verschillen zijn groter bij lagere pH-waarden (7) dan bij hogere pH (8.5).

Ook voor andere elementen is gerapporteerd over de effecten van organisch materiaal op de toxiciteit voor sporelementen op *Daphnia*. Bijvoorbeeld voor chroom (Cr) bleek dat door de toevoeging van humuszuur aan het testmedium de bio-accumulatie werd verlaagd, terwijl voor cadmium (Cd) het omgekeerde het geval was (Stackhouse & Benson, 1989; Penttinen *et al.*, 1995). Bekend is dat Cr net als

Cu in de natuur organische complexen kan vormen, en dat dat bij Zn minder en bij Cd vrijwel niet gebeurt (bijvoorbeeld: Wilson, 1978; Smies, 1983; Mouvet & Bourg, 1983; Langston & Bryan, 1984).

3 SELECTIE VAN ONDERZOEKSMETHODEN

3.1 Biologische effectmetingen

In het speciatie onderzoek verdient het aanbeveling om biologische variabelen te meten die op relatief korte termijn een resultaat (effect) geven. Immers, men mag aannemen dat de speciatie van koper gedurende langdurige experimenten niet constant zal blijven (behalve bij Cu-gebufferde systemen, maar dat is hier niet aan de orde), en derhalve zal de uitkomst moeilijk te interpreteren zijn.

Het effect van een proefstof, hier dus koper, op organismen kan worden uitgedrukt in de zogenaamde EC50 waarde (= effect concentratie, 50 %). Dit is die blootstellingconcentratie, die in een oneindig grote populatie proefdieren 50 % (biologisch) effect zou veroorzaken. Het biologisch effect hangt af van het organisme dat wordt gebruikt, en dient uiteraard te worden gedefinieerd. De EC50 wordt weergegeven op basis van de blootstellingduur, wat leidt tot een notatie als bijvoorbeeld: '48h EC50, beweeglijkheid', waarbij, in dit geval, beweeglijkheid na 48 uur het (eco)toxicologisch eindpunt is.

Voor de berekening van de EC50 wordt het gemeten biologisch effect (opnieuw bijvoorbeeld de mate van beweeglijkheid) uitgezet tegen de $\log[\text{Cu}]$. Een toets is maximaal interpreteerbaar wanneer er waarnemingen zijn waarbij zowel alle proefdieren nog bewegen ('no effect') als waarbij alle proefdieren niet meer bewegen (100 % effect). Hoe meer waarnemingen liggen tussen deze uitersten, hoe beter de EC50 geschat kan worden.

Gegevens over kortere (of langere) perioden van expositie, of andere effect parameters kunnen nadere informatie verschaffen voor de interpretatie. Daarom worden vaak ook de 24h EC50 (na 24 uur), de EC100 waarden (de laagste blootstellingconcentratie, waarbij 100 % van de blootgestelde dieren een effect vertoont) en de 'no observed effect concentration' (NOEC, de hoogst getoetste concentratie waarbij gedurende de toets geen (gedefinieerde) effecten worden waargenomen) gerapporteerd. Analooft kan een LC50 worden gedefinieerd, waarbij de sterfte als variabele wordt genomen ('letale concentratie').

Verskillende organismen zullen anders reageren op een te testen stof, zij bezitten een verschillende gevoeligheid. Om een indruk te krijgen van de effecten van een stof op het milieu worden daarom meestal meerdere typen organismen getoetst, bij voorkeur afkomstig van verschillende trofische niveaus (bijvoorbeeld representanten uit de volgende groepen: bacteriën, algen, kreeftachtigen, raderdiertjes, vissen, tweekleppigen, en eventueel zoogdieren en vogels als vermoed wordt dat de stof doorvergiftigend werkt). Een voorkeur zou uit moeten gaan naar organismen die van nature in het gebied voorkomen. Soms zijn 'standaard'-organismen voorhanden waardoor een vergelijking met ander wetenschappelijk onderzoek wordt vergemakkelijkt.

Een aantal toxiciteittoetsen die mogelijk kunnen worden ingezet in dit project, wordt hieronder kort besproken.

3.1.1 *Daphnia magna*-test (48h EC50), beweeglijkheid.

Het proefdier is een zoetwater kreeftachtige, de watervlo *Daphnia magna*. Een van de sterke punten van de *Daphnia* test is dat de organismen van nature in het Nederlandse oppervlaktewater voorkomen en, ten opzichte van andere (water)organismen, relatief gevoelig zijn voor koper. Het organisme is een veelgebruikt standaard proefdier, zodat vergelijking met ecotoxicologische gegevens wordt vergemakkelijkt. Als effect-parameter wordt meestal beweeglijkheid gekozen. Na 24 en 48 uur worden de beweeglijke en onbeweeglijke dieren geteld en de conditie van de aan koper blootgestelde dieren

vergeleken met die in het relevante controle medium. Dit wordt uitgevoerd volgens de criteria zoals gegeven in de OECD richtlijn nr. 202.

Bij een standaard *Daphnia*-toets worden voor iedere toetsconcentratie en de controle (in viervoud) vijf individuen uitgezet in 100 mL medium. Door de relatief geringe belading (gewicht van proefdieren per volume medium) zal de aanwezigheid van de proefdieren naar verwachting weinig of geen invloed op de waterkwaliteit hebben (dus Cu-speciatie en blootstellingconcentratie). De toets is kort genoeg (2 dagen) om een min of meer constante Cu-speciatie te mogen aannemen, en relatief goedkoop.

3.1.2 Algen-toetsen, (72h EC50), groeiremming; PAM

Algen staan aan de basis van de aquatische voedselketen, en het is bekend dat algen gevoelig zijn voor koper. Twee verschillende algen-toetsen worden bediscussieerd: de 'algen-groeiremmingstest', en de 'PAM-test'.

Een *algen-groeiremmingstest* betreft een ecologisch relevant eindpunt: groei. Verschillende soorten komen in principe in aanmerking zoals *Selenastrum capricornutum* en *Scenedesmus subspicatus*. Deze test wordt standaard gestart met een dichtheid van 10^4 cellen per mL. Deze dichtheid is hoog ten opzichte van de concentratie aan algen in oppervlaktewater. Gedurende de toetsduur neemt de dichtheid normaal nog toe met een factor 50-100 waardoor de einddichtheid ca. 10^6 per mL bedraagt.

Adsorptie van koper aan het celoppervlak van de algen zal bij deze dichtheden naar verwachting in hoge mate optreden, hetgeen van invloed zal zijn op de blootstellingconcentratie van Cu. Tevens produceren algen complexvormende stoffen (excretieproducten) met, naar men aanneemt, hoge stabiliteitsconstanten. Zowel adsorptie en complexering van Cu zal de pCu dusdanig veranderen dat van een zinvolle interpretatie (pCu vs effect) geen sprake kan zijn.

Deze algentest kan worden uitgevoerd volgens internationale richtlijnen (OECD 201, ISO 8692, EU C.3).

De *PAM-algen-test* (pulse-amplitude modulated fluorescence) is een toets die vooralsnog in een ontwikkelingsstadium verkeert (van Beusekom *et al.*, 1998). Hoewel de gevoeligheid hoger wordt ingeschat in vergelijking met de algen-groeitest, blijkt de test nog steeds belangrijk minder gevoelig voor Cu dan bijvoorbeeld de *Daphnia*-test. Bovendien is de algendichtheid nog steeds vrij hoog. Er is nog geen standaard, (inter)nationaal geaccepteerde, methode beschikbaar.

3.1.3 Mossel-toetsen

Het vluchtgedrag van mosselen (bijvoorbeeld driehoeksmossel, *Dreissena polymorpha*) uit zich doordat de schelpdieren bij chemische of fysische verstoring de kleppen sluiten. Het klepbewegingsgedrag is een goede parameter gebleken om de effecten van 'vrij' koper te meten. Driehoeksmosselen blijken zeer gevoelig voor Cu (NOEC $\approx 5 \mu\text{g/L}$), en er blijkt een duidelijke relatie te bestaan met de aanwezigheid van Cu^{2+} (Tamis, 1994; Kramer & Foekema, 1999). De methode, ontwikkeld als biologisch bewakingssysteem (Kramer *et al.*, 1989), is beduidend sneller dan de andere methoden (effecten zijn binnen ca. 10 min. zichtbaar). Daar er wordt gewerkt met een doorstroomsysteem is de relatie met het test water (Cu-speciatie) direct: er vinden geen verschuivingen plaats in de speciatie. Nadeel is dat de methode (nog) geen standaard methode betreft, en niet is vastgelegd in een ISO of NEN protocol.

Mosselen filteren deeltjes uit het water die dienen als voer. De *filtratie-test* berust op dit eetgedrag, waarbij een minder efficiënt (of ontbrekend) afvangen van deeltjes (het verschil tussen in- en uitstromend water) bepalend is voor de mate van effect (Kraak *et al.*, 1994). Hoewel de methode redelijk gevoelig is voor koper (EC50 $41 \mu\text{g Cu/L}$) is toepasbaarheid in dit project beperkt doordat de algen die essentieel zijn voor de meting zullen interfereren met de koperspeciatie (zie onder 3.1.2).

3.1.4 Bacteriën-toetsen

Bekende standaard toetsen die gebruik maken van luminescerende bacteriën (zoals bijvoorbeeld Microtox) zijn tenminste drie orden van grootte te ongevoelig voor gebruik in dit project (Thomulka *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1999b).

Wel is recent in de literatuur een toets beschreven die gebruik maakt van kopergevoelige bacteriën die door de onderzoekers eerst werden geïsoleerd (Davies *et al.*, 1998). Door gebruik te maken van aangepaste media ('T Medium', zonder organische componenten) bleek het mogelijk om een toets te ontwikkelen (48h EC50, groeiremming) en deze toets toe te passen op oppervlaktewater monsters. De gevoeligheid van de methode lijkt voldoende voor gebruik in dit project. Nadelen zijn de noodzaak de organismen zelf te isoleren, het ontbreken van een standaard ISO of NEN methode, en het ontbreken van ervaring in routineonderzoek.

Een andere methode is gebaseerd op de remming van bacteriegroei, waarbij gebruik wordt gemaakt van opname van ³H-methyl-thymidine door de bacteriën als indicator voor groei (Fuhrman & Azam, 1982). Deze methode werd door Tubbing *et al.* (1994) toegepast in water van de Rijn. De gevoeligheid voor koper lijkt hoog (EC50 ca 10 µg Cu/L), maar dit gegeven is door de hoge achtergrondconcentraties aan Cu moeilijk op zijn waarde te schatten. Nadeel is het gebruik van een radioactief gemerkte verbinding (tritium), en het ontbreken van standaard ecotoxicologische protocollen.

Voor alle bacteriën-toetsen geldt dat bij hogere dichtheden door adsorptie van koper mogelijk verstoring van koperspeciatie kan optreden.

3.1.5 Raderdierpjes (*rotifera*), EC50 (48h), overleving

De test betreft een acute toets met het raderdierpje *Brachionus rubens*.

In opdracht van VROM-DGM is enkele jaren geleden bij TNO een toets ontwikkeld (Evers, 1991; TNO-rapport R91/200), waarmee een QSAR voor organische stoffen is opgesteld. Deze toets is destijds opgezet met de parameter overleving, waaraan eventueel reproductie kan worden toegevoegd. Voor een project als dit zal de toets beperkt moeten worden tot een 48h toets op overleving (in verband met de mogelijke veranderingen in de chemische speciatie). De toets wordt uitgevoerd als een klassieke (statische) ecotoxtoets (niet met toxkits), wat voldoende informatie kan geven over verschillen in de toxiciteit van koper bij blootstelling in de verschillende watertypes.

Raderdierpjes zijn redelijk gevoelig voor koper (LC50 48h ca. 60 µg Cu/L) en zijn relevante organismen in de voedselketen. Het betreft echter organismen die niet zo vaak worden gebruikt, en vergelijking met andere ecotoxicologische gegevens is daardoor minder eenvoudig.

3.1.6 ELS vistoets (EC50, 8d), embryonale ontwikkeling

Vissen worden zeer vaak meegenomen in ecotoxicologische evaluaties van toxische stoffen. Nadeel is dat het een gewerveld organisme betreft, wat de uitvoering bemoeilijkt (mede in het kader van de Wet op de Dierproeven).

Een 'early life stage' (ELS) vistoets valt echter buiten deze wet op de dierproeven omdat met jonge onontwikkelde stadia (eieren) wordt gewerkt. De proef beslaat het meest gevoelige stadium in de ontwikkeling van een vis en wordt daarom vaak gebruikt om chronische toxiciteit te voorspellen.

De zebravis (*Brachydanio rerio*) is één van de aanbevolen vissoorten in de OECD Guideline nr. 212 (Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages) en wordt internationaal overal geaccepteerd gezien de gebleken overeenkomstige gevoeligheid met andere vissoorten. De proef wordt gestart met 10 eieren in het blastula-stadium per testoplossing van 100 mL en duurt 8 dagen. Toetsparameters zijn overleving en afwijkingen in de ontwikkeling. Het is ook mogelijk om de toets met karpereieren uit te voeren; de proef moet dan echter langer duren.

Voor de ELS-vistest is een extreme gevoeligheid voor koper gerapporteerd (LC50 = 0.063 µg Cu/L), een waarde waarvan de correctheid echter wordt betwijfeld (concentratie tenminste een orde van grootte lager dan gerapporteerd voor natuurlijke wateren). Naar verwachting zal het geringe aantal eieren weinig van invloed zijn op de testconcentratie van koper. De langere duur van de toets maakt echter dat de koperspeciesverdeling mogelijk niet constant kan worden verondersteld. Door de lange duur is de proef relatief duur.

3.1.7 Keuze van de ecotoxicologische toets

Kort samengevat zijn er de volgende voor- en nadelen van de hierboven beschreven toetsen:

- *Daphnia*-toets: gevoelig voor Cu, praktisch haalbaar, geen verstoring van het chemisch evenwicht verwacht, standaard methode beschikbaar;
- *Algen*-toets: gevoelig voor Cu, praktisch haalbaar, in ongewijzigde vorm ernstige verstoring van het chemisch evenwicht van Cu verwacht, standaard methode beschikbaar (alleen algen groei-test);
- *Mossel*-toets: gevoelig voor Cu, praktisch moeilijk haalbaar binnen Fase I, geen verstoring van het chemisch evenwicht van Cu verwacht, standaard methode nog niet beschikbaar;
- *Bacteriën*-test: sommige gevoelig voor Cu, praktisch moeilijk haalbaar binnen Fase I, verstoring van het chemisch evenwicht van Cu verwacht, methode niet routinematig beschikbaar.
- *Raderdiertjes*-test: praktisch moeilijk haalbaar binnen Fase I, redelijk gevoelig voor koper; geen verstoring van het chemisch evenwicht van Cu verwacht. Geen OECD methode beschikbaar (wel TNO methode), relatief weinig gebruikt proefdier;
- ELS vis-toets: gevoelig voor koper; geen verstoring van het chemisch evenwicht van Cu verwacht, standaard OECD methode beschikbaar.

Op basis van praktische en wetenschappelijke argumenten is besloten om voor dit project de 'Daphnia test (48h EC50), beweeglijkheid' te kiezen als de toets die in de Fasen I en II wordt toegepast.

3.2 Accumulatie van Cu in *Daphnia*'s

Een verlaagde biologische beschikbaarheid van Cu (onder invloed van DOC) zal in theorie moeten leiden tot een verlaagde interne koper-concentratie. Het zal uiteindelijk deze *in vivo* concentratie zijn die de biologische effecten, uiteindelijk resulterend in een lethaal effect, stuurt.

Voor een groot aantal organische microverontreinigingen is de 'lethal body burden' (LBB) of 'critical body residue' (CBR) benadering, waarbij de toxiciteit verklaard kan worden uit de opbouw van interne concentraties tot aan het kritische lichaamsniveau, met succes toegepast om het narcotiserende effect van individuele stoffen en mengsels te kunnen verklaren (McCarty & Mackay, 1993; McCarty *et al.* 1993; Van Wezel *et al.* 1995; Verbruggen, 1999).

Voor een aantal niet essentiële zware metalen is een vergelijkbare benadering ook toegepast voor ongewervelden (Crommentuijn, 1994), maar blijken de waargenomen LBB/CBR niveaus sterk soort- en stofspecifiek. De sterke verschillen in de veronderstelde biologische beschikbaarheid tussen locaties zouden in deze hypothese moeten leiden tot grote verschillen in de berekende bioconcentratiefactoren (BCF). De BCF is de ratio tussen de interne lichaamsconcentratie ten opzichte van de (vrij opgeloste) externe waterconcentratie (Cu-totaal(F)). Een BCF heeft de eenheid L/kg en is gewoonlijk gedefinieerd voor evenwichtscondities.

In kortdurende experimenten wordt de BCF voor evenwichtscondities gewoonlijk afgeleid op basis van een toxicokinetisch model en de parameterschatting op basis van opname en eliminatie snelheidsconstanten. Bij een 48-h blootstelling (zoals in dit project) is het instellen van evenwichtscondities niet waarschijnlijk. Aangezien als maat voor de dosering het totaal-Cu in 0.45 µm gefiltreerd water is genomen, wordt in deze studie gesproken over *schijnbare* 48h-BCF.

Gezien de grote mate van variatie in de externe milieuomstandigheden, mede gestuurd door de concentraties DOC in de verschillende wateren, lijkt het zinvol om in dit kader te toetsen of er een koppeling is te maken tussen de externe (beschikbare) Cu-concentratie, de interne Cu-concentratie en de biologische effecten. De (overlevende) *Daphnia*'s die aan het eind van de toxiciteitexperimenten beschikbaar komen bieden een uitgelezen mogelijkheid om de interne dosis hypothese te toetsen.

3.3 Chemische analyses van (fracties van) Cu

Voor de analyse van totaal Cu en de verschillende Cu-fracties is een aantal methoden beschikbaar. Naast 'totaal' koper waar de totaal element concentratie wordt bepaald, zijn er analysemethoden waarbij een deel van het totaal, een fractie, wordt geanalyseerd. Onderdeel van een dergelijke methode bestaat uit het afscheiden van een fractie van het totaal. Dergelijke 'fracties' zijn meestal operationeel gedefinieerd. Behalve bij een ion-selectieve elektrode, waar de ionenactiviteit wordt bepaald (zie onder), bestaan de gemeten fracties niet uit louter vrij koper (Cu^{2+}), maar - afhankelijk van de methode en de meetcondities - uit vrij koper, plus anorganische complexen en meestal (kleine) organische complexen. Hoewel men er vooralsnog van uitgaat dat organismen Cu^{2+} opnemen, is het zeker niet uitgesloten dat ook kleinere organische en anorganische complexen biologisch beschikbaar zijn. Hierdoor is het meten van een 'fractie' die meer bevat dan alleen Cu^{2+} niet *a priori* af te wijzen, en kan er een goede relatie van de Cu-fractie en de waargenomen biologische effecten bestaan.

Een overzicht van kopergerelateerde analytisch-chemische technieken volgt hier.

3.3.1 *Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF)*

Traditioneel wordt in meetnetten in Nederland slechts totaal (elementair) Cu bepaald in ongefiltreerde watermonsters. Soms wordt additioneel het opgeloste koper (na filtratie over $0.45 \mu\text{m}$) gemeten. Voor studies naar de biologische beschikbaarheid is vooral de opgeloste fractie van belang. Aangezien er in dit rapport wordt gesproken van totaal koper en van de onderscheiden fracties (allen in oplossing) en in enkele gevallen van een totaal monster (waar bedoeld wordt: zonder filtratie) licht verwarring voor de hand. Daarom wordt in dit rapport bij de beschrijving van 'totaal'-koper steeds vermeld of dit wel of niet gefiltreerde monsters betreft, wat respectievelijk wordt weergegeven als Cu-totaal(F) en Cu-totaal(NF). Bij de toxicologische experimenten (Cu-totaal en de Cu-fracties) is altijd sprake van gefiltreerde monsters.

Bij de totaal-koper analyse worden door een behandeling met salpeterzuur zowel de anorganische als de organische complexen gedestruerd, en het element koper gemeten.

3.3.2 *Cu-Chelex*

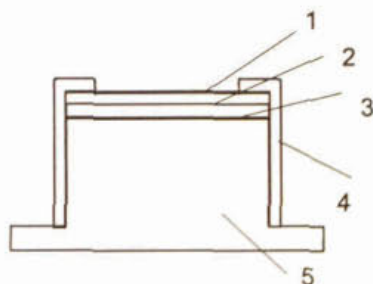
De Chelex-100 methode berust op het verschil in dissociatiekinetiek tussen de verschillende anorganische en organische Cu-complexen. Bij deze methode wordt het monster over kolom materiaal (Chelex-100) geleid met een kation uitwisselingskarakter waarbij een sterke binding tussen het vrije koper en het kolom materiaal (functionele groep: $\text{R-N}-(\text{CH}_2\text{COO})_2$) plaatsvindt. De doorstromingsnelheid van het monster bepaalt de tijdschaal waarbij uitwisseling van Cu^{2+} tussen anorganische en organische complexen enerzijds en het Chelex-100 anderzijds kan plaatsvinden (Donat *et al.*, 1994). Een lage doorstromingsnelheid (1.2 mL/min) bevordert de reproduceerbaarheid van het systeem. Door de betrekkelijk lange contacttijd zullen alleen de relatief sterke organische kopercomplexen het kolom materiaal passeren. De 'Chelex-gebonden' koperfractie wordt vervolgens met een zure oplossing geëluëerd waarna het gehalte koper in het eluens bepaald wordt met de methode voor Cu-totaal.

Chelex-100 is reeds jaren in gebruik bij het speciatieonderzoek (Batley & Florence, 1976; Chakrabarty *et al.*, 1994). Donat *et al.* (1994) gebruikten dezelfde techniek maar daar heet het CRCP (chelating resin column partitioning). Door Van de Meent *et al.* (1993) is deze methode veelbelovend genoemd, er is zelfs een relatie gevonden tussen de 'Chelex-100' gebonden fractie en een biologisch effect (algen toets).

3.3.3 *Cu-DGT*

DGT ('diffusive gradients in thin films') is een relatief nieuwe techniek (Davison & Zhang, 1994) voor het kwantitatief bepalen van metalen *in situ*. In een cassette zitten achter elkaar een laagje Chelex-100 (0.4 mm), geïmpregneerd in een waterige gel, een laagje gel en een filter (zie Figuur 3.1). Het filter, $0.45 \mu\text{m}$ cellulose-nitrat, dient om verstopping van de gel te voorkomen.

Figuur 3.1. Schematische doorsnede van de DGT-cassette (1: 0.45 µm cellulose nitraat membraanfilter; 2: diffuse gel; 3: Chelex-100; 4: houder met schroefdraad; 5: zuiger)



Alleen Cu-ionen, anorganische complexen en organische complexen met een laag molecuulgewicht diffunderen door het filter en de diffuse gellaag, en worden vervolgens in de Chelex vastgelegd. Grote organische complexen en colloïden zullen de gel niet passeren (Zhang & Davison, 1995). De vorming van een constante concentratiegradiënt in de diffuse laag vormt de basis voor de techniek. Na een goed bekende expositieperiode (ook mogelijk *in situ*, in natuurlijke wateren), wordt het in de Chelex geaccumuleerde Cu bepaald middels de Cu-totaal methode. De oorspronkelijke concentratie van de fractie Cu-DGT kan dan worden berekend (Zhang *et al.*, 1998). Gezien het nieuwe karakter wordt in meer detail op de achtergronden van de techniek ingegaan.

De DGT methode is gebaseerd op de 'eerste diffusiewet van Fick'. Tussen de gellaag met dikte Δg (zie Figuur 3.2) en de bulkoplossing bevindt zich een diffuse grenslaag (DBL) waar transport van ionen enkel door moleculaire diffusie plaatsvindt. Als de dikte van de diffuse grenslaag verwaarloosbaar klein is ten opzichte van Δg dan wordt de concentratie in de bulk oplossing volgens formule (1) beschreven:

$$C_b = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A} \quad (1)$$

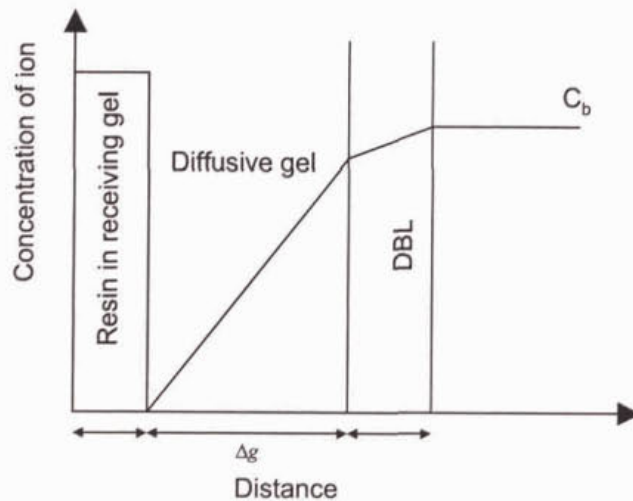
waar

- C_b = concentratie in bulk oplossing ($\mu\text{g/L}$)
- M = massa verzameld in Chelex gel (ng)
- Δg = dikte diffuse laag (cm)
- D = diffusie coëfficiënt ($= 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)
- t = expositietijd (s)
- A = blootstellingoppervlakte (cm^2)

De massa aan koperionen verzameld in de Chelex gel wordt experimenteel bepaald door de gel in een HNO_3 oplossing te plaatsen waarna de koperionen uit de gel elueren met een experimenteel bepaalde efficiëntie (f_e) (zie formule 2). De concentratie koper in de elutievlloeistof (C_e) wordt bepaald via de Cu-totaal methode.

$$M = \frac{C_e \cdot (V_{\text{HNO}_3} + V_{\text{gel}})}{f_e} \quad (2)$$

Figuur 3.2. Schematische weergave van het concentratieverloop in de Chelex gel en diffuse gel (zie tekst voor details).



3.3.4 Cu-ISE

Een ion-selectieve elektrode (ISE) heeft het voordeel dat direct de ionen-activiteit [Cu^{2+}] wordt gemeten. Reeds jaar en dag is het de wens om met behulp van ISEs in natuurlijke wateren vrij Cu te kunnen bepalen. Avdeev *et al.* (1983) publiceerden resultaten waaruit een lineair verband bleek voor de range $p\text{Cu} = 3-19$, wat ruim voldoende is voor de Cu-activiteit in natuurlijke wateren. Echter, veelal bleek het lineaire bereik van de elektroden voor onderzoek aan natuurlijke monsters niet groot genoeg. Recent tonen enkele studies aan dat er toch mogelijkheden zijn bij gebruik van de 'Jalpaite' elektrode, ook voor gebruik in oppervlaktewater (Camosso & Tartari, 1991; Xue & Sunda, 1997; Zirino *et al.*, 1998). Voorwaarde is een goed gedefinieerde voorbehandeling van de elektrode.

3.3.5 Andere technieken

De electroanalytische techniek 'polarografie' heeft in potentie mogelijkheden voor toepassing in speciatieonderzoek. Echter, deze techniek is niet toepasbaar in natuurlijke wateren door de (te) hoge detectiegrenzen.

De techniek 'differentiële puls anodische heroplossingsvoltammetrie' (DPASV) bezit wel de benodigde gevoeligheid (Kramer, 1985). Echter, de bepaling resulteert in een (empirisch bepaalde) 'elektrochemisch labiele fractie'. Dit hoeft geen belemmering te zijn, mits er een causaal verband kan worden gelegd met bijvoorbeeld de biologische effecten. Dit is jaren geprobeerd, en tot op heden met weinig of geen succes. Tubbing *et al.* (1993), maar ook Van de Meent *et al.* (1993) geven aan dat er geen duidelijk verband zichtbaar is tussen ASV-labiel koper en waargenomen biologische effecten.

Donat & Van den Berg (1992) en Campos & Van den Berg (1994) laten zien dat door toevoeging van een sterke complexvormer (met een grote, goed bekende stabiliteitsconstante K), bijvoorbeeld salicylaldoxime, en meting met cathodische heroplossingsvoltammetrie (CSV), er uit de metingen op basis van evenwichtsberoeeningen een vrij-koperconcentratie kan worden berekend (zie ook Miller & Bruland, 1997). Deze methode is onder meer toegepast door Gerringa *et al.* (1996). In potentie is deze methode waardevol. Echter, het tijdsintensieve karakter (2-3 monsters per dag) geeft de nodige beperkingen, zeker in het kader van routinematig onderzoek.

Er is nog een aantal andere technieken die mogelijk ingezet zouden kunnen worden voor een onderzoek naar de relatie tussen chemische speciatie van Cu en biologische effecten. Genoemd kunnen worden, bijvoorbeeld:

- watergevulde dialyse membranen (ook wel 'peepers', del Castilho *et al.*, 1984),
- Chelex-100 gevulde dialysemembranen (Tao & Liang, 1997),
- C₁₈ SEP-PAK kolommetjes (Sunda & Hanson, 1987),
- ligand-competitie met chemiluminescentie detectie (Sunda & Huntsman, 1991).

Deze worden niet verder besproken omdat ze niet routinematig worden toegepast.

3.3.6 Keuze koper-analysemethoden

Op basis van bovengenoemde praktische en wetenschappelijke argumenten is besloten om de volgende Cu-methoden te kiezen voor toepassing in Fase I:

- Cu-totaal(F),
- Cu-Chelex,
- Cu-DGT,
- Cu-ISE,
- Cu-daphnia.

Additioneel wordt Cu-totaal(NF) bepaald in het natuurlijk monster. In dit rapport wordt ook gesproken van nominaal koper (Cu-nominaal). Dit betreft de koperconcentratie die bij de toxiciteitstoetsen aan het test medium is toegevoegd, dus formeel is dit de expositieconcentratie Cu-nominaal plus het van nature aanwezige Cu.

Voor Fase II diende één van de speciatie-methoden af te vallen.

3.4 Speciatie-modellering

In (natuurlijke) wateren zijn verschillende metalen en (an)organische liganden aanwezig. Wanneer een metaal bindt aan een ligand ontstaat een zogeheten 'complex'. De binding is een evenwichtssituatie tussen de vorming (associatie) en het verbreken, dissociatie. De sterkte van de binding (en de dissociatie) is constant voor een gedefinieerd complex, en wordt uitgedrukt als de stabiliteits- of evenwichtsconstante, K (gezien de grootte meestal als log K). Hoe groter deze K, des te stabielier het complex is. De verschillende ionen in het water, de 'componenten', kunnen in principe allemaal met elkaar reageren, wat resulteert in een ingewikkeld mengsel van chemische combinaties, reactieproducten, meestal 'species' genoemd. Welke species in een systeem domineren hangt af van de componenten en de respectievelijke stabiliteitsconstanten.

Indien alle reactanten en alle mogelijke reacties bekend zijn (en dus ook alle reactieproducten) dan kan in principe de Cu-speciesverdeling worden berekend. Hiervoor is nodig:

- de definitie van de componenten;
- de totaalconcentratie van de componenten;
- de definitie van de Cu-species, die worden gevormd, en
- de stabiliteits-constanten van de Cu-species.

Meestal wordt er van uitgegaan dat het systeem in evenwicht is. Voor een eenvoudig systeem, dus met een beperkt aantal componenten en species, is het mogelijk de species-verdeling met de hand uit te rekenen. Voor meer ingewikkelde systemen is het beter om gebruik te maken van een PC en zogeheten speciatie-modellen. De meeste modellen zijn gebaseerd op het oplossen van een set niet-lineaire vergelijkingen die de stabiliteitsconstanten en massabalans gegevens bevatten (Jenne, 1979; Morel, 1983; Kramer & van de Meent, 1988).

Er is een aantal speciatie-modellen ontwikkeld. Bekende voorbeelden zijn 'MINEQL' en 'MICROQL'. Meer recente, en gebruikersvriendelijke modellen zijn 'TITRATOR' (Cabaniss, 1987), 'GECHEQ' (Verweij, 1996) en 'CHEAQS' (Verweij, 2000).

In Karman *et al.* (1999) is uitvoerig aandacht besteed aan de modellering (berekening) van vrij koper (pCu) als functie van met name de (gesimuleerde) concentraties organische liganden, Cu-ligand stabiliteits-constanten, de macrochemische watercondities en de totaal Cu concentratie. Dit resulteerde in een eerste indicatie van de 'risk assessment' voor $[Cu^{2+}]$ in havens en kustwateren (Karman *et al.*, 1998).

Ervaring leert dat voor het oppervlaktewater slechts een beperkt aantal componenten en Cu-species behoeft te worden gedefinieerd om een redelijke schatting te kunnen maken van de pCu. Belangrijkste anorganische componenten (voor complexering van koper) in oppervlaktewater zijn, naast Cu, Ca en Mg, de anionen CO_3^{2-} of HCO_3^- (Morel, 1983). De pH levert de gegevens H^+ en OH^- . Deze componenten zijn allemaal in het dit project bepaald. Het is de verwachting dat deze beperkte set componenten een redelijke schatting geeft van de verdeling van de anorganische species.

Voor de organische complexen is de situatie minder eenvoudig omdat DOC geen component is maar een complexe set van organische verbindingen die niet bekend is, en waarvan bovendien slechts een deel als potentiële liganden kan worden aangemerkt, ieder met hun eigen stabiliteitsconstante (die ook meestal niet bekend is). Hier dient dus een keuze te worden gemaakt op basis van eerder onderzoek. Door deze onzekerheden is de uitkomst van speciatie-modellering indicatief, dus ook de uitkomst pCu (Zuehlke & Byrne, 1984).

Toch mag men verwachten dat er een relatie zal bestaan tussen de berekende pCu en de samenstelling van de verschillende (natuurlijke) oppervlaktewateren.

4 OPZET VAN HET ONDERZOEK

4.1 Vooronderzoek

Uitgangspunt bij het onderzoek van Fase I was het gebruik van een humusrijk oppervlaktewater, bijvoorbeeld uit een veenrijke plas. Gekozen is voor de Vinkeveense Plassen.

Via de uitvoerder van het routine monitoringprogramma in het gebied, de Dienst Water en Riolerings (DWR, Hilversum) zijn monitoringsgegevens beschikbaar voor een serie standaard macro-componenten. DOC wordt niet standaard gemeten. In overleg met DWR is gekozen voor de Vinkeveense Plassen, bemonsteringslocatie Baambrugse Zuwe.

Teneinde te controleren of genoemd water inderdaad voldoet aan de gestelde eisen ten aanzien van voldoende hoog DOC en humusgehalte, en ten aanzien van de veronderstelde remmende werking op kopertoxiciteit voor *Daphnia*, zijn bij de start van het onderzoek enkele analyses uitgevoerd. Dit betrof de analyse van DOC, en een 'range-finding' voor de toxicologische toets.

4.2 Fase I

Uitgangspunt voor het onderzoek van Fase I is een Nederlands oppervlaktewater dat humusrijk is. Naar verwachting zal dit een hoog Cu-complexerend vermogen hebben. Door bijmenging met water zonder organisch materiaal, dus zonder complexvormers, kan een verdunningsreeks worden aangemaakt met afnemend gehalte 'humus', dus - volgens de theorie - ook met afnemend complexerend vermogen en dus ook met afnemende EC50 (dat wil zeggen een toenemende toxiciteit). Hoewel bij voldoende hoge DOC concentratie in het gebruikte oppervlaktewater de verdunningsreeks vrijwel alle DOC-concentraties zal omvatten die in het Nederlandse oppervlaktewater zullen voorkomen (behoudens extreme situaties), hoeft de samenstelling van dit DOC, niet representatief te zijn voor alle wateren. In Fase II wordt hier nader aandacht aan besteed.

In de experimenten van Fase I is gebruik gemaakt van twee soorten water, namelijk 0.45 µm gefiltreerd water afkomstig van de Vinkeveense plassen en organische stof vrij Dutch Standard Water (DSW) (zie sectie 5.2). Hiermee is een verdunningsreeks gemaakt van 0 %, 25 %, 50 %, 75 % en 100 % oppervlaktewater. Iedere verdunning is vervolgens opgesplitst in 5 submonsters, waaraan koper (als CuCl₂) is toegevoegd in een oplopende serie (gezien de lage concentraties is geen effect van het chloride te verwachten). Het doel van deze Cu-serie is om de EC50 van iedere verdunning te kunnen bepalen. Aldus is een 'matrix' van 5 verdunningen × 5 Cu-concentraties gecreëerd.

Het is uit de literatuur bekend dat de kinetiek van de complexvormingsreactie van grote invloed is op de toxiciteit van (bijvoorbeeld) koper (Hering & Morel, 1988). Zonder voldoende tijd voor het instellen van het evenwicht is er - na koper additie aan het medium - een (nog) niet gecomplexeerde Cu²⁺ fractie die leidt tot overschatting van de effectparameter (zie ook Slijkerman *et al.*, 2000). Om dit te voorkomen is bij de bereiding van de toetsmedia na additie van koper 20 uur gewacht voordat de organismen werden ingezet. Ma *et al.* (1999) bevestigen dat deze tijd voldoende is.

Na instelling van het evenwicht van de Cu-'humus' complexen, is de serie 48h EC50 *Daphnia* (beweeglijkheid) toetsen uitgevoerd. De (overlevende) watervlooiën uit de test zijn na afloop van het experiment verzameld voor analyse op intern kopergehalte (Cu-daphnia).

Onmiddellijk na beëindiging van de toetsen zijn monsters genomen van alle (25) toetsoplossingen ten behoeve van de chemische analyses voor Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF), de verschillende Cu-fracties, DOC en 'humus'-gehalte, en de andere ondersteunende macrovariabelen.

Een flow-schema (Figuur 4.1) geeft een overzicht van de activiteiten betreffende het vooronderzoek en Fase I. In dit schema staan ook de verschillende analyses weergegeven.

4.3 Fase II

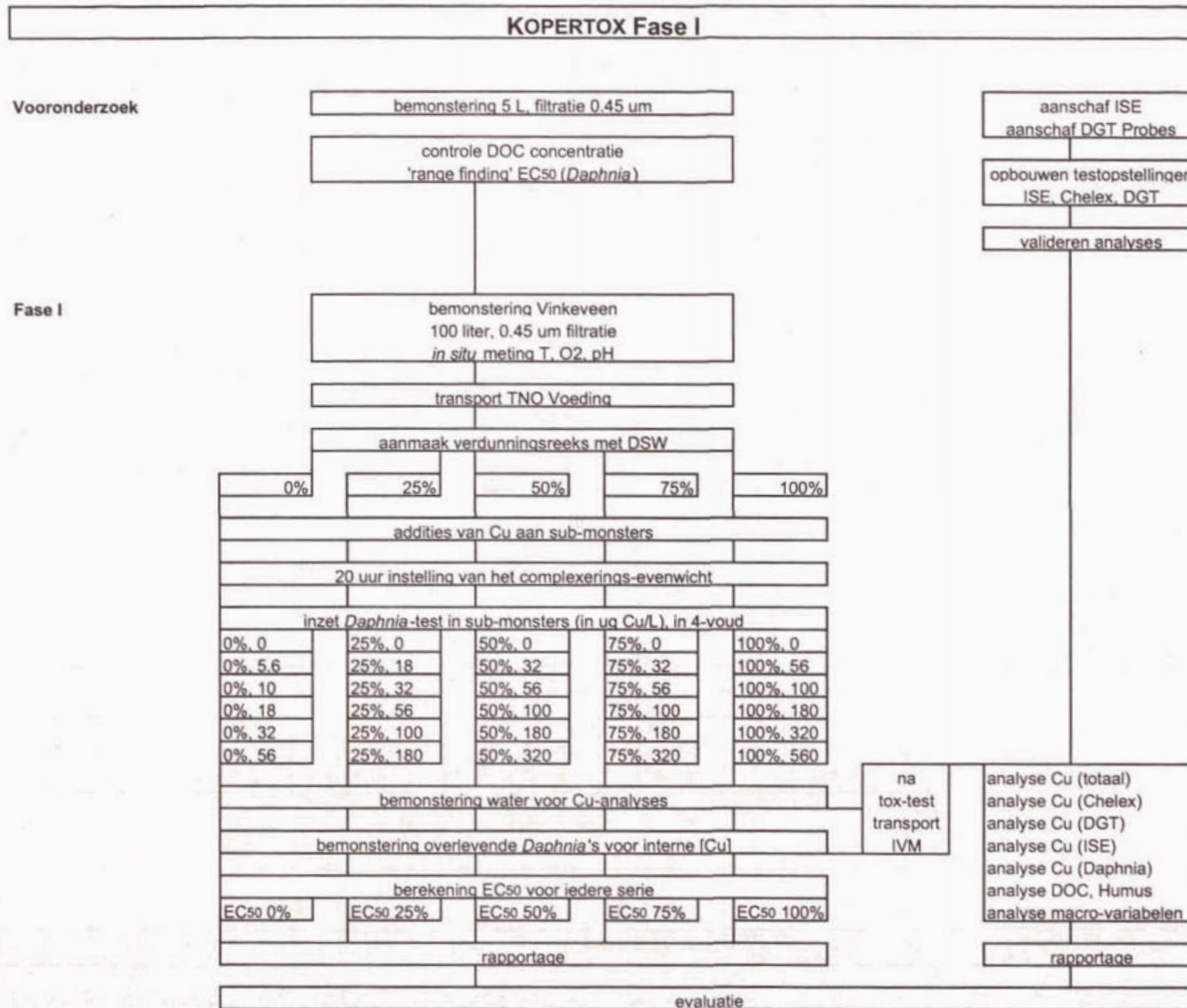
Uitgangspunt voor het onderzoek van Fase II is dat Nederlands oppervlaktewater een variatie vertoont in DOC- en 'humus'-gehalte, zowel in kwantitatief als (mogelijk) in kwalitatief opzicht. Ook is er een seizoensinvloed in de samenstelling van het 'humus' te verwachten, bijvoorbeeld door de bijdrage van excretie-producten van algen in het groei-seizoen. Dit betekent dat er verschillen in complexering van koper kunnen optreden, wat dus mogelijk leidt tot verschillen in de remming van de Cu-toxiciteit, en dat in zowel een geografische als temporele context.

Teneinde deze hypothese te toetsen zijn zes locaties over vier seizoenen bemonsterd. Bij de keuze van de locaties is rekening gehouden met de wens om een breed spectrum aan voor Nederland karakteristieke wateren te bemonsteren: een veenplas, een kleipolder, een middelgrote rivier, een kleine, niet vervuilde beek en de twee grote rivieren, Rijn en Maas. De locaties worden nader toegelicht in sectie 5.1.1.

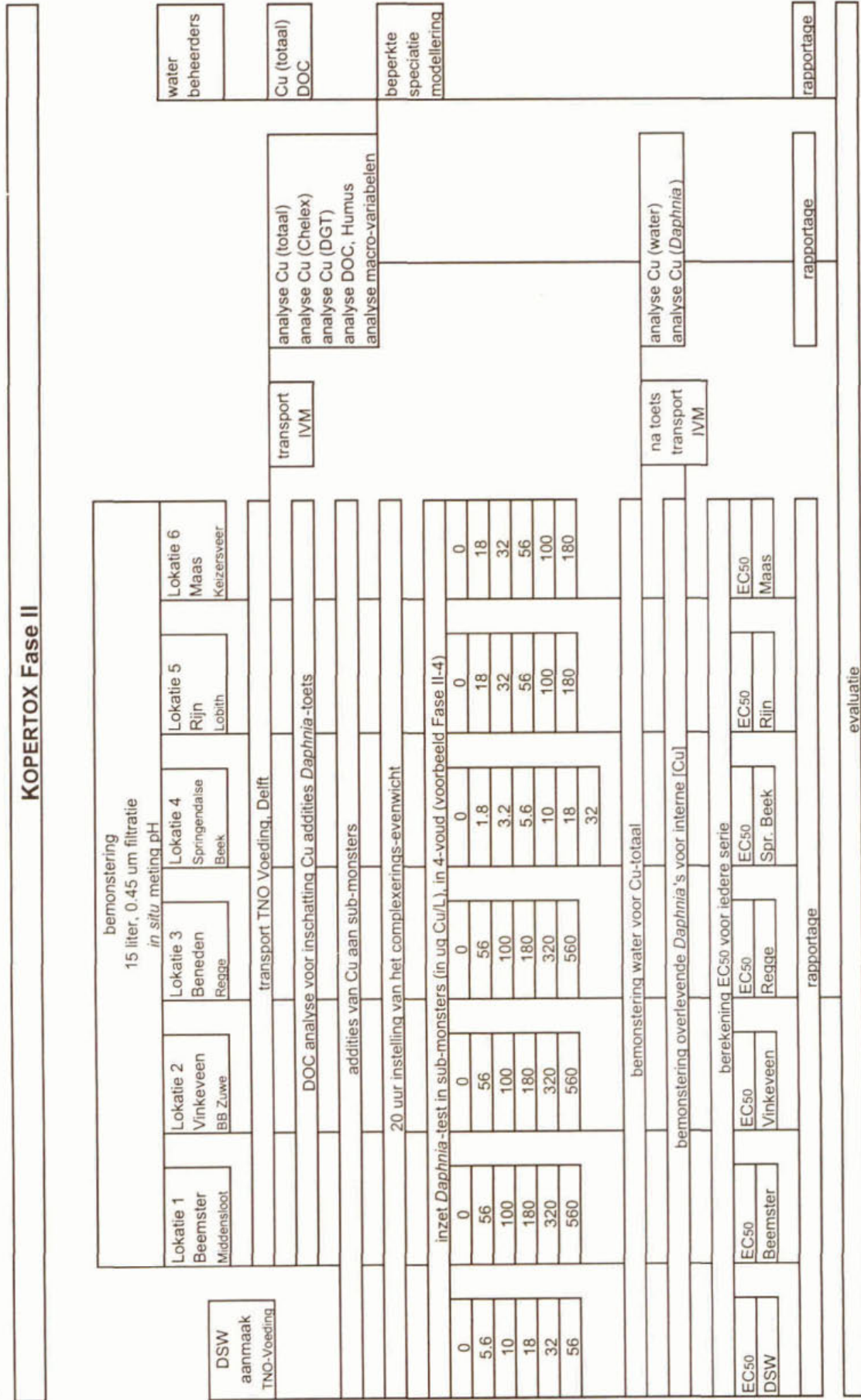
Na additie van verschillende doseringen Cu aan de gefiltreerde wateren, en na instelling van het complexeringsevenwicht gedurende 20 uur, zijn de 48h EC50 *Daphnia* (beweeglijkheid) toetsen uitgevoerd. De (overlevende) watervlooien uit de test zijn na afloop van het experiment verzameld voor analyse op intern kopergehalte (Cu-daphnia). Een deel van het water is gebruikt voor de chemische analyses voor Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF), de verschillende Cu-fracties (behalve Cu-ISE), DOC en 'humus'-gehalte, en de ondersteunende macrovariabelen.

Een flow-schema (Figuur 4.2) geeft een overzicht van de activiteiten betreffende Fase II. In dit schema staan ook de verschillende analyses weergegeven.

Figuur 4.1. Flow-chart van de acties uitgevoerd binnen Fase I van KOPERTOX



Figuur 4.2 Flow-chart van de acties uitgevoerd binnen Fase II van KOPERTOX



5 TOEGEPASTE METHODEN EN TECHNIEKEN

5.1 Monstername

5.1.1 Keuze locaties

Voor Fase I is gekozen voor de locatie *Vinkeveense Plassen* (Baambrugse Zuwe, nabij de brug in de provinciale weg). Dit punt is geselecteerd als karakteristiek voor water uit een veenplas.

Beheerder: Dienst Water en Riolering, Hilversum.

Voor Fase II zijn de volgende wateren en bemonsteringslocaties geselecteerd:

1. *Middensloot* (Beemster, ter plaatse van de duiker in de Wormerweg);
Karakteristiek voor water uit een kleipolder
Beheerder: Uitwaterende Sluizen Hollands Noorderkwartier, Edam;
2. *Vinkeveense Plassen* (Baambrugse Zuwe, identiek aan Fase I);
3. *Beneden Regge* (ter plaatse van de brug aan de Lemelerweg, Ommen);
Karakteristiek voor een middelgrote rivier met soms een verhoogd Cu-gehalte
Beheerder: Waterschap Regge en Dinkel, Almelo
4. *Springendalse Beek* (noordtak), ca. 4 km NW van Ootmarsum
Karakteristiek voor de bovenloop van een jonge zandige beek;
Beheerder: Waterschap Regge en Dinkel, Almelo
5. *Rijn* (Meetstation Lobith, ponton RIZA)
Karakteristiek voor grote rivier
Beheerder: Rijkswaterstaat
6. *Maas* (Meetstation Keizersveer, RIZA)
Karakteristiek voor grote rivier
Beheerder: Rijkswaterstaat

5.1.2 Bemonsteringen Fase I en II

De bemonstering is uitgevoerd door middel van een slangenpomp (Masterflex) met een maximale doorvoer van 10 L/min. Er is gebruik gemaakt van Teflon leidingen en een polytheen opvangvat van 100 liter voor Fase I, en voor iedere locatie een polytheen vat van 15 liter voor Fase II. De Teflon aanzuigleiding is verzwaard met een Teflon blokje. Leidingen, opvangvat en monsterflessen zijn ter voorkoming van contaminatie voorgespoeld met zuur (HNO₃ Supra Pur). Tussen de uitvoer van de pomp en het opvangvat is een Versaflo in-lijn kaarsfilter (Gelman) geplaatst, voorzien van een voorfilter (8 µm) en een eindfilter (0.45 µm). Deze filters hebben door het grote filteroppervlak een grote capaciteit. Hierdoor is het niet altijd nodig het filter voor iedere monstername te vervangen. Vooraf aan het opvangen van het water zijn het systeem en filter steeds doorgespoeld met enkele liters water van de locatie. Op de locatie Keizersveer werd het monster betrokken uit de metaalvrije ringleiding van het meetstation, op alle andere locaties werd het water direct bemonsterd.

Tijdens de bemonstering is *in situ* de pH gemeten.

In Tabel 5.1 zijn de basisgegevens van de bemonsteringen voor de Fasen I en II opgenomen. Fase I vond plaats in september 1999, en betrof slechts 1 locatie waarvoor 1 kaarsfilter is gebruikt.

Tabel 5.1. Overzicht van de bemonsteringslocaties en –data, en -tijden

	Monster [no]	Datum	Tijd [h]
<i>Fase I</i>			
Vinkeveense Plassen	101	20-09-1999	10:45-11:30
<i>Fase II</i>			
Middensloot (Beemster)	211	10-01-2000	10:20-10:50
	212	10-04-2000	10:00-10:30
	213	10-07-2000	10:15-10:45
	214	16-10-2000	10:30-10:50
Vinkeveense Plassen	221	10-01-2000	11:35-11:50
	222	10-04-2000	11:30-11:50
	223	10-07-2000	12:30-12:50
	224	16-10-2000	11:55-12:10
Beneden Regge	231	10-01-2000	14:15-14:45
	232	10-04-2000	14:00-14:20
	233	10-07-2000	14:45-15:20
	234	16-10-2000	14:20-14:40
Springendalse Beek	241	10-01-2000	15:45-16:10
	242	10-04-2000	15:45-16:05
	243	10-07-2000	17:00-17:30
	244	16-10-2000	16:15-17:05
Rijn (Meetstation Lobith)	251	11-01-2000	10:10-10:30
	252	11-04-2000	10:00-10:20
	253	11-07-2000	09:45-10:10
	254	17-10-2000	09:50-10:05
Maas (Meetstation Keizersveer)	261	11-01-2000	12:15-12:30
	262	11-04-2000	12:40-12:50
	263	11-07-2000	12:30-12:50
	264	17-10-2000	12:20-12:35

De bemonsteringen voor Fase II vonden plaats in 2000, en wel in de maanden januari, april, juli en oktober. Ze zijn steeds uitgevoerd in de volgorde:

Dag 1: Middensloot – (nieuw filter) Vinkeveen – Beneden Regge – (nieuw filter) Springendalse Beek

Dag 2: Rijn – Maas.

De keuze voor het vervangen van de filters is gebaseerd op het dichtslaan van het filter (met name het water van de locatie in de Beemster was steeds moeilijk te filtreren). Om mogelijke (organische) contaminatie te voorkomen werd voorafgaand aan de bemonstering van de Springendalse Beek een nieuw filter geïnstalleerd.

Om logistieke redenen werden de monsters van Fase II steeds tegelijk op dag 2 naar TNO-Delft en vervolgens naar IVM-VU getransporteerd voor verdere verwerking.

5.2 *Daphnia*-test (48h EC50), beweeglijkheid

De watervlo *Daphnia magna* is gekweekt in het laboratorium onder standaard omstandigheden in DSWL-E. Dit standaardwater is bereid uit grondwater afkomstig van een locatie bij Linschoten; het medium wordt in grote hoeveelheden (batches van 10,000 liter) bereid door toevoeging van zouten en sporenelementen, tezamen met wat EDTA. De pH van het medium is 8.0-8.2. Het DSWL-E water is geschikt gebleken voor het kweken van *Daphnia magna*.

Om de invloed van DOC op de toxiciteit van koper uit te sluiten is voor de expositie-experimenten geen gebruik gemaakt van DSWL-E. Het gebruikte Dutch Standard Water (DSW) is bereid door toevoeging van anorganische zouten aan gedestilleerd water. De eindconcentratie van de zouten was: NaHCO₃: 0.100 g/L, KHCO₃: 0.025 g/L, CaCl₂·2H₂O: 0.200 g/L en MgSO₄·7H₂O: 0.180 g/L. DSW is een medium dat redelijk representatief is voor de anorganische component in Nederlands oppervlaktewater. Het gebruikte medium bevat alleen anorganische zouten en is vrij van organische verbindingen (dus vrij van organische complexvormers).

De toxicologische toetsen zijn uitgevoerd volgens OECD richtlijn no. 202 (OECD, 1984) en de EU richtlijn no. C.2 (EU, 1992), met een blootstellingduur van 48 uur. De toets is in een geconditioneerde ruimte uitgevoerd onder een licht/donker regime van 16h licht/8h donker met schemerperiodes van 30 minuten.

De toets is uitgevoerd in 150 mL bekerglaasjes, die elk gevuld zijn met 100 mL toetsoplossing. Voor elke toetsconcentratie en de controle zijn vier bekersglazen (4 replica's), met daarin elk vijf *Daphnia*'s gebruikt. De inhoud van de bekersglazen is niet belucht of vervangen. Tijdens de toets zijn de *Daphnia*'s niet gevoerd. De pH, temperatuur en zuurstofconcentratie zijn gemeten (Annex 1).

Na 24 en na 48 uur zijn de beweeglijke en onbeweeglijke dieren geteld en is de conditie van de aan koper blootgestelde dieren vergeleken met die in het relevante controle medium. Dit is uitgevoerd volgens de criteria zoals gegeven in de OECD richtlijn nr. 202 (dieren die 15 seconden na voorzichtig bewegen van het proefvat niet in staat zijn om te zwemmen zijn als onbeweeglijk beschouwd). Tegelijkertijd is de conditie van de proefdieren (zwemgedrag, kleur of elk ander visueel waarneembaar effect) vergeleken met die van de controle dieren. Aan het eind van de toetsen is de conditie van de dieren uit de twee hoogste koperconcentraties ook onder het microscoop gecontroleerd.

De EC50 waarden en hun 95 % betrouwbaarheidsinterval zijn berekend met behulp van een parametrisch model, zoals ontwikkeld door Kooijman (1981). Voor deze berekeningen zijn de gecombineerde gegevens over beweeglijkheid gebruikt. Voor de berekening van de EC50 waarden is de 'maximum likelihood' schatting van de EC50 waarden berekend onder aanname van een log-logistische dosis-effect relatie (van der Hoeven, 1991). Ter ondersteuning van de discussie zijn additioneel de EC50-24h (beweeglijkheid), de 48h EC100 (beweeglijkheid), de 48h NOEC (beweeglijkheid) (= 48h EC0) en de 48h NOEC (conditie) bepaald. De helling van de sigmoidale curven is tevens in de rapportage opgenomen. Voor een meer uitgebreide beschrijving van de methoden wordt verwezen naar de rapportages van de respectievelijke tests (Hoofman *et al.*, 1999; 2000a,b,c,d).

Naast de berekeningen op basis van de nominale (toegevoegde) Cu-concentraties, is ook de EC50 berekend op basis van de gemeten concentraties, en voor Fase I voor de concentraties van de gemeten Cu-fractions.

Aangezien er uit de literatuur slechts een algemeen idee bestond ten aanzien van de EC50 van Cu voor *Daphnia*, is in een voorstudie gekozen voor een brede range van Cu addities, met tussenstappen van een factor 3.2. In dit vooronderzoek is ook de LC50 van Cu voor organisch-vrij Dutch Standard Water (DSW) bepaald.

De nominale concentraties die werden getest in de voorstudie zijn weergegeven in Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Nominale Cu concentraties voor de *Daphnia* tests in de voorstudie.

Type water	Cu-nominaal
Vinkeveense Plassenwater	0, 5.6, 18, 56, 180 en 560 µg Cu/L,
Dutch Standard Water (DSW)	0, 0.56, 1.8, 5.6, 18, 56, 180 en 560 µg Cu/L.

Voor Fase I zijn op basis van het vooronderzoek de nominale Cu-concentraties gedefinieerd (Tabel 5.3); tussenstappen zijn een factor 1.8 (water zonder toevoeging diende als blanco).

Tabel 5.3. Nominale Cu concentraties voor de *Daphnia* tests in Fase I.

Type water	Cu-additie
100 % Vinkeveense plassen	0, 56, 100, 180, 320 en 560 µg Cu/L
75 % Vinkeveense plassen + 25 % DSW	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
50 % Vinkeveense plassen + 50 % DSW	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
25 % Vinkeveense plassen + 75 % DSW	0, 18, 32, 56, 100 en 180 µg Cu/L
100 % DSW	0, 5.6, 10, 18, 32 en 56 µg Cu/L

Een controle is uitgevoerd op de correctheid van de monsterbereiding door middel van een meting van de geleidbaarheid van de verschillende submonsters.

Voor Fase II zijn de nominale Cu-concentraties gekozen op basis van de resultaten van Fase I, en mede op basis van het DOC gehalte van de verschillende wateren (Tabel 5.4); tussenstappen zijn een factor 1.8 (water zonder toevoeging diende als blanco).

De reden voor de aanpassing van de Cu-addities in Springendalse Beek water vanaf periode 2 is de (op basis van de concentratie DOC) onvoorziene lagere EC50 die is gevonden voor januari 2000. De afwijkende Cu-addities in april 2000 voor de andere locaties berust op een aanpassing gebaseerd op een (naar later bleek) foutieve DOC bepaling.

Ter controle van de Cu-concentraties in de media zijn per serie enkele submonsters genomen en geanalyseerd op Cu-totaal. Deze submonsters werden genomen in het gebied van de EC50.

Tabel 5.4. Nominale Cu concentraties voor de *Daphnia* toetsen in Fase II.

Locatie	Fase II periode	Cu-addities:
Middensloot (Beemster)	1, 3, 4	0, 56, 100, 180, 320 en 560 µg Cu/L
	2	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
Vinkeveense Plassen	1, 3, 4	0, 56, 100, 180, 320 en 560 µg Cu/L
	2	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
Beneden Regge	1, 3, 4	0, 56, 100, 180, 320 en 560 µg Cu/L
	2	0, 18, 32, 56, 100 en 180 µg Cu/L
Springendalse Beek	1	0, 10, 18, 32, 56, 100 en 180 µg Cu/L
	2, 3, 4	0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 en 32 µg Cu/L
Rijn (Lobith)	1, 3, 4	0, 18, 32, 56, 100 en 180 µg Cu/L
	2	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
Maas (Keizersveer)	1, 3, 4	0, 18, 32, 56, 100 en 180 µg Cu/L
	2	0, 32, 56, 100, 180 en 320 µg Cu/L
Standaard water (DSW)	1, 2, 3, 4	0, 5.6, 10, 18, 32 en 56 µg Cu/L

5.3 Chemische analyses

Van de analysemethoden wordt in het volgende een beschrijving gegeven.

- *Cu-totaal(F)*, *Cu-totaal(NF)*

Totaal Cu-analyses zijn uitgevoerd, conform de methoden beschreven in Van Hattum *et al.* (1996). De analyses zijn in drievoud uitgevoerd. Hiervoor is 8 mL monster gepipetteerd in een 10 mL buis (polypropyleen) waarin zich reeds 100 µL van een 70 % HNO₃ (Ultrex II, Baker) oplossing bevindt. Deze oplossingen zijn direct of na verdunnen met 0.2 M HNO₃ geanalyseerd door middel van injectie in de grafietoven - AAS (Perkin-Elmer Z3030; HGA 600) met Zeeman-correctie (GF-AAS).

In verband met de lage gehalten in de natuurlijke monsters is voor de veldmonsters gewerkt met een verhoogd injectievolumen (3 × 30 µL). De instrumentele detectielimiet bedraagt bij dit verhoogde injectievolumen 0.03 µg/L maar kan alleen gerealiseerd worden bij toepassing van gespecialiseerde 'clean-room' faciliteiten, die buiten de orde van dit project vallen. De onder de standaard laboratorium condities gerealiseerde detectiegrens van de methode bedroeg 0.2 µg/L (LOD, 'limit of detection', 3× standaard afwijking van de procedurele blanco; Prichard, (1995)). De bijbehorende kwantitatieve bepalingsgrens (LOQ, 'limit of quantification', 10× standaard afwijking van de blanco) bedroeg 0.7 µg/L. Bij alle stappen van de procedures is gebruik gemaakt van de schoonst verkrijgbare chemicaliën (Ultrex of Supra Pur kwaliteit), zijn alle materialen en hulpmiddelen vooraf gespoeld met detergent, HNO₃ oplossing en dubbel-gedeïoniseerd water (Millipore, in de rapportage verder aangeduid als 'superdemi'), en heeft uitvoerige controle van blanco niveaus plaatsgevonden.

● *Cu-Chelex*

Deze methode is uitgevoerd conform van de Meent *et al.* (1993) en Donat *et al.* (1994). Bij de Chelex-methode is gebruik gemaakt van een Baker 12SPE (J.T. Baker, Deventer) opstelling en 3 mL lege glazen kolommetjes met frit (Merck, Darmstadt, Duitsland). Van de Chelex-100 (100-200 mesh size, Bio-Rad Laboratories, Veenendaal) is 1 g afgewogen in een telpotje en aangevuld met 1.5-2 mL superdemi water. Dit geheel is kwantitatief overgebracht in de lege glazen kolom en 2 keer nagespoeld met 1.5-2 mL superdemi water. De Chelex-100 is geprepareerd en in de calciumvorm gebracht (volgens van de Meent, 1993) door achtereenvolgens te wassen met 2 mL 2 M HNO₃, 6 mL superdemi water, 4 mL 2 M CaNO₃ en 6 mL superdemi water. Alle chemicaliën zijn vooraf getest op de afwezigheid van Cu.

Vervolgens is in triplo een bekende hoeveelheid (± 100 mL) monster onder vacuüm over het geprepareerde Chelex-kolommetje geleid met gemiddelde snelheid van 1.2 mL per minuut.

In het vooronderzoek is het benodigde elutievolume aan 2 M HNO₃ bepaald. Het blijkt dat het overgrote deel van het koper in de eerste 4 mL elueert. Er is zekerheidshalve gekozen voor een elutie volume van 6 mL. De totale gemiddelde recovery voor vrij koper bedraagt 89 % (n=3; CV=5 %). Dit eluaat is na verdunnen tot 0.2 M HNO₃ geanalyseerd op dezelfde wijze als Cu-totaal. De detectielimiet (LOD) van de methode gebaseerd op variabiliteit van het blanco niveau tijdens de 4 meetcampagnes bedroeg 0.3 µg/L; de kwantitatieve bepalingsgrens (LOQ) bedroeg 0.9 µg/L.

● *Cu-DGT*

In het vooronderzoek is bepaald, uitgaande van de detectielimiet van Cu-totaal, gedurende welke periode de DGT-cassettes in de monsteroplossing uitgehangen dienen te worden om voldoende koperionen te concentreren. Hierbij is in acht genomen dat er niet meer dan 5 % van de koperionen uit de expositieoplossing wordt weggevangen om verstoring van de evenwichtssituatie te voorkomen (bij expositie in het veld is de aanvoer van Cu in principe onbegrensd). De elutie-efficiëntie is bepaald door in drievoud DGT-cassettes in een 10 µg Cu/L oplossing uit te hangen. Na toepassen van de formules (1) en (2) (sectie 3.3.3) is een elutie-efficiëntie van 83 % gevonden (n=3; CV=15 %).

De DGT-cassettes bestonden uit een Chelex-gel met een dikte van 0.4 mm, een diffuse gel met een dikte van 0.8 mm en een 0.45 µm cellulose-nitrat filter. Dit is vevat in een houder van polypropyleen (DGT-Research, Lancaster, UK). Na het assembleren van de DGT-houders zijn deze in drievoud in 3 liter monster uitgehangen in 4 liter polytheen vaten. Via een 'jaknikker' werden de houders in de oplossing bewogen teneinde uitputting van de oplossing nabij het gel-oppervlak te voorkomen. De maximale bewegingssnelheid van de DGT-houders bedroeg ca. 1 cm/s. Na een expositie van 22 uur zijn de units gedemonteerd en is de Chelex overgebracht in een 1.5 mL centrifugebuisje (Eppendorf); hieraan is 1 mL van een 2 M HNO₃ oplossing toegevoegd. Na extractie en verdunnen tot 0.2 M HNO₃ is de oplossing geanalyseerd als voor Cu-totaal. Bij de blanco controles van het gel-materiaal bleek het achtergrondniveau niet verwaarloosbaar en zijn de gegevens hiervoor gecorrigeerd. De detectielimiet (LOD) van de methode, gebaseerd op variabiliteit van het blanco niveau, bedroeg 0.2 µg Cu/L; de kwantitatieve bepalingsgrens (LOQ) bedroeg 0.8 µg/L.

● *Cu-ISE*

Deze methode is uitgevoerd conform de methoden beschreven in Xue & Sunda (1997). Experimenten zijn uitgevoerd met een Orion model 9429 koper-ion selectieve elektrode (Orion Research, Beverly, MA, USA) in combinatie met een Orion 'double junction' model 90-02 referentie elektrode. Beide elektroden zijn aangesloten op een Metrohm model 744 pH meter met mV uitlezing (Metrohm, Herisau, Zwitserland).

In het vooronderzoek is de respons van de ISE elektrode als functie van de koperconcentratie bepaald. In het concentratie gebied tussen 1 en 700 µg Cu/L blijkt de respons conform de theorie logaritmisch toe te nemen met de concentratie.

De ISE elektrode is gekalibreerd door middel van een ijklijn. Aan 100 mL van een 10 mM NaNO₃ oplossing zijn respectievelijk 10 µL, 100 µL, 0.9 mL en 6 mL van een 1 mg/L CuCl₂ oplossing toegevoegd. Het concentratie bereik bedroeg derhalve 1 tot 663 µg Cu/L. De respons van de ISE is gedurende het verloop van de meetserie gecontroleerd door tussentijdse ijklijnen.

- *Cu-daphnia*

Nog levende *Daphnia*'s zijn na afloop van de ecotoxicologische toetsen met een nylon zeef verzameld en in polytheen buisjes (Eppendorf) bij -20 °C bewaard. Na transport naar het laboratorium zijn de monsters gevriesdroogd, gedestruerd met een micro-destructiesysteem en aansluitend geanalyseerd met GF-AAS. De toegepaste methoden zijn beschreven in Van Hattum *et al.* (1990, 1996). Alle concentraties zijn op basis van drooggewicht (d.w.).

- *DOC, alkaliniteit*

Opgelost organisch koolstof (DOC) en alkaliniteit zijn tijdens Fase I en de eerste twee bemonsteringen van Fase II uitgevoerd door het analytisch-chemisch laboratorium van OMEGAM (Amsterdam) en bepaald volgens standaard methoden (accrediatiecertificaten L086 en L167). De door dit laboratorium toegepaste methode voor de DOC/TOC bepaling (NEN-EN 1484) is gebaseerd op de verschilmeting van totaal koolstof (TC) en totaal anorganisch koolstof (TIC) met behulp van IR-spectrometrie in een hoge temperatuur TOC-analyser. Deze methode is echter vooral gericht op afvalwater. Het organisch gebonden koolstof (TOC, total organic carbon) wordt hierbij niet direct bepaald. Bij de door OMEGAM toegepaste indirecte methode (TOC = TC - TIC) behoeft het monster niet separaat doorlucht te worden, waardoor blootstelling aan blauwzuurgas in cyanidehoudend afvalwater wordt vermeden. Met name bij (bi)carbonaatrijke wateren (bijv. Beemster-Middensloot met een bicarbonaat gehalte van 520 - 570 mg HCO₃/L) en relatief lage DOC gehalten (0-15 mg C/L) kan de verschil methode tot grote afwijkingen leiden.

Bij vergelijking van de OMEGAM-resultaten met DOC-metingen uitgevoerd door TNO-Voeding (uitgevoerd ten behoeve van het inschatten van de toxicologische Cu-addities), bleken soms grote verschillen te bestaan. De TNO-methode resulteerde in beter reproduceerbare resultaten. Er is derhalve besloten om voor genoemde periode de TNO-resultaten te gebruiken.

Voor oppervlaktewater heeft de directe bepaling van TOC de voorkeur. Als voorafgaand aan de analyse na aanzuren van het monster het anorganisch koolstof wordt uitgeblazen, meet men in feite DOC. Tijdens Fase II is overgegaan op deze directe methode, uitgevoerd door het IVM. De metingen zijn uitgevoerd met een hoge temperatuur infrarood TOC analyzer (Rosemount Analytical, Dohrman DC190), conform de directe methode beschreven in NEN-EN 1484. Uit de vergelijking van de januari en april (Tabel 6.9a, c) resultaten tussen de 3 laboratoria blijkt dat de DOC gehalten bepaald door IVM en TNO goed met elkaar overeenkomen. Voor de perioden juli en oktober zijn de IVM resultaten gebruikt.

De bepalingen van alkaliniteit in monsters uit juli en oktober zijn uitgevoerd door het Hydrologisch Laboratorium van de faculteit Aardwetenschappen-VU.

- 'Humus'

'Humus' is gekarakteriseerd met spectrofotometrie op basis van de absorptiespectra en enkele karakteristieke absorptiebanden bij 380 en 440 nm, zoals toegepast in Rijkeboer *et al.* (1998). De gefiltreerde watermonsters werden gekoeld en donker naar het laboratorium vervoerd, waar de absorptiespectra van opgelost organisch stof zijn bepaald. Nadat de monsters op kamertemperatuur zijn gekomen, zijn de meetcuvetten voorgespoeld met 10 mL monster. Vervolgens zijn de absorptiespectra $a(\lambda)$ gemeten ten opzichte van milli-Q water volgens:

$$a(\lambda) = 2.303A(\lambda) / L$$

met $A(\lambda)$ de optische dikte bij golflengte λ , en L de cuvet lengte in meters (Rijkeboer *et al.*, 1998). De absorptie is gefit aan een exponentiële functie, en vervolgens geïnterpoleerd naar de golflengtes 380 en 440 nm (Stedmon *et al.*, 2000; Markager & Vincent, 2000) volgens:

$$a(\lambda) = a(\lambda_0) \exp[S(\lambda_0 - \lambda)] + K$$

met S de exponentiële helling en λ_0 een referentie golflengte, in dit geval 440 nm. De offset waarde K verdisconteert voor absorptie die niet door opgeloste humuszuren veroorzaakt wordt.

Voor de monsters en verdunningen in Fase I, en de Fase II monsters genomen in januari en april 2000, werd gebruik gemaakt van een 5 cm cuvet en een Philips PU8800 UV/VIS spectrofotometer. De spectra werden gemeten tussen 350 en 750 nm, met 1 nm intervallen. Voor de monsters genomen in juli en oktober werd gebruik gemaakt van een 10-cm cuvet en een Ocean Optics SD2000 systeem. Deze spectra werden gemeten tussen 400 en 900 nm, met 0.3 nm intervallen.

Hoewel dus de gehele spectra zijn gemeten is alleen de absorptie bij 380 nm en 440 nm gerapporteerd met als eenheid: m^{-1} . De absorptie bij 380 nm is een van de gebruikte methoden en wordt onder meer ook toegepast door Warnock *et al.* (1999) als indicator voor 'yellow substance'. Hautala *et al.* (2000) gebruikt weer 350, 400 en 465 nm.

- *Overige parameters*

Door de faculteit der Aardwetenschappen van de Vrije Universiteit van Amsterdam zijn SO_4 , NO_3 , PO_4 , Cl en NH_4 alsmede de elementen Fe, Mn, Si, Ca, Mg, Na en K bepaald conform methoden beschreven in NEN normen en APHA (1985).

De hardheid (als mg equivalent $CaCO_3$) is berekend volgens de formule:

$$\text{Hardheid (berekend)} = 2.497 \times [Ca] + 4.118 \times [Mg]$$

De pH en opgelost zuurstof zijn bepaald volgens standaard methoden (APHA, 1985).

- *Herhaalbaarheidsonderzoek*

Teneinde een idee te verkrijgen omtrent de reproduceerbaarheid van de verschillende analyses zijn voor Cu-totaal (F, NF), Cu-DGT en Cu-Chelex analyses in meervoud uitgevoerd ($n=2$ of 3). Ook werd onderzocht of de bulk-bemonsteringen en daaropvolgende filtratie effect hadden op het kopergehalte (contaminatie). Hiertoe werden parallel aan de bemonstering van de 15 liter oppervlaktewater ook 100 mL flesjes gevuld met gefiltreerd/niet-gefiltreerd water (controle monsters). Deze extra bemonstering vond alleen plaats in april en juli 2000.

Voor de perioden juli en oktober 2000 werd ook de bepaling van DOC (IVM) in drievoud uitgevoerd.

- *Test op expositie-concentraties*

Van elke serie expositiemedia zijn aan het einde van de toxiciteitstoetsen sub-monsters genomen om te onderzoeken of de (gemeten) toets-concentraties (= Cu-totaal(F)) niet te sterk afweken van de nominale koperconcentraties. In het belang van het onderzoek zijn deze sub-monsters met name genomen in de range van concentraties nabij de EC50 waarden.

5.4 Speciatie Modelling

Voor de chemische speciatie-berekeningen is gebruik gemaakt van het programma CHEAQS (Verweij, 2000). Van de 6 oppervlaktewateren van Fase II (januari) is de Cu-species-verdeling bepaald voor a) het natuurlijk water, en b) bij het kopergehalte waar biologische effecten zijn waargenomen (EC50), ingevoerd als de concentratie nominaal + Cu-totaal(F).

Voor de anorganische componenten zijn de volgende 'componenten' geselecteerd: calcium, koper, magnesium en (bi)carbonaat (alkaliniteit), en (via de pH) H^+ en OH^- . De stabiliteitsconstanten ($\log K$) voor de anorganische complexen zijn gebruikt zoals in CHEAQS (chemical equilibria in aquatic systems) aanwezig; ze zijn afkomstig uit de NIST database (Martell & Smith, 1995; Verweij, 2000).

Voor de organische complexvormers is uitgegaan van het '5-site' model van Cabaniss & Shuman (1988a,b). Daarin zijn 'typische' representanten van natuurlijk organisch materiaal in rivierwater (Suwannee River, Canada) gedefinieerd. In Tabel 5.5 zijn de karakteristieken van de invoer gegeven. De (typen) liganden zijn arbitrair 1L, 2L, 3L, 4L en 5L genoemd. Voor het relatieve voorkomen van de (totaal) concentraties van deze liganden is voor de Nederlandse wateren (op basis van DOC) dezelfde ratio gekozen als gevonden voor de beste fit in de Suwannee River (Cabaniss & Shuman (1988a,b)). Met name 2 typen organische liganden blijken vaak voor te komen: 1L, een groep liganden met een lage bindingsconstante, en de groep 4L, met een hoge bindingsconstante. Verder hebben met name de ligandtypen 2L en 5L een lage relatieve bijdrage maar hoge stabiliteitsconstanten. Voor de liganden is geen onderscheid gemaakt voor de bindingsconstanten met H, gedefinieerd voor ieder van de typen HL en H_2L .

De informatie die beschikbaar is voor de verschillende wateren ten aanzien van de organische verbindingen is de (bulk)parameter DOC. Aangenomen is, dat 50 % van het DOC bindende eigenschappen heeft (Dwane & Tipping, 1998). Dit samen met de aanname van een gemiddeld molecuulgewicht van 500, levert voor 10 mg

DOC een totaal liganden concentratie van 10^{-5} M. Dit is het uitgangspunt geweest voor alle verdere berekeningen met organisch materiaal en de complexering van koper.

Tabel 5.5. Overzicht van de componenten en Cu-species voor een 5-liganden model (Cu-Suwannee) voor organische complexvorming (naar Cabaniss & Shumann, 1988a,b)

Liganden		Stabiliteits-constanten (als log K)		
naam	relatieve bijdrage	CuL	HL	H2L
1L	31.19 %	3.896	--	--
2L	1.18 %	13.494	12	--
3L	6.86 %	11.636	12	--
4L	59.86 %	13.950	12	24
5L	0.90 %	16.517	12	24

De berekeningen zijn uitgevoerd op basis van de (totaal) concentraties van de gedefinieerde componenten die in het kader van het project zijn gemeten voor de maand januari 2000 (zie Tabel 6.9a, en Annex 10). Voor de andere perioden zijn pH, DOC, HCO_3^- , Ca, Mg en Cu gemeten (Tabellen 6.9c-d), en zijn voor de overige parameters dezelfde waarden als voor januari gebruikt.

6 RESULTATEN

6.1 Resultaten Vooronderzoek

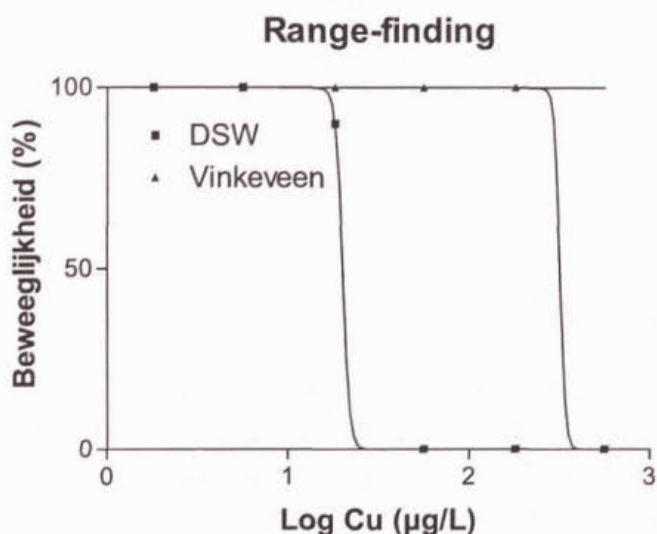
Via de Dienst Water en Riolering (Hilversum) zijn de totaal Cu concentraties verkregen van het routine monitoringsprogramma (meerjarig gemiddelde: 2 µg Cu/L). Ook een (ongefiltreerd) watermonster, genomen ten behoeve van de toxicologische 'range-finding' gaf een Cu-totaal(NF) concentratie van 2 µg Cu/L.

De concentraties DOC voor deze getoetste wateren zijn weergegeven in Tabel 6.1. Hieruit blijkt dat Vinkeveense Plassenwater een relatief hoge concentratie DOC bevat. De verhoogde concentratie DOC in DSWL-E, het medium waarin de *Daphnia*'s worden opgekweekt, wordt veroorzaakt door de toevoeging van EDTA aan dit medium. De waarnemingen voor DSW tonen een grote spreiding doordat deze dicht nabij de detectiegrens van de methode liggen.

Tabel 6.1. DOC gemeten in de testwateren van de voorstudie (in mg C/L)

	Vinkeveense Plassen	DSW	DSWL-E
	13.5	0.03	ca 2
	13.5	0.04	
	13.7	0.35	
gemiddelde	13.6	0.14	
standaard afwijking	0.1	0.18	

Figuur 6.1. Grafische presentatie voor de 'range-finding' voor respectievelijk DSW en Vinkeveen water



Behoudens in de (grote) rijkswateren wordt DOC nauwelijks door de waterbeheerders gemeten. Daarom worden ter vergelijking in Tabel 6.2 enkele DOC concentraties verkregen uit rapportages van eerder projectonderzoek gepresenteerd. De grote Rijkswateren (Rijn en Maas) bevatten een betrekkelijk laag DOC

gehalte (3-6 mg/L), terwijl in de (getoetste!) regionale wateren tot bijna tien maal hogere concentraties kunnen voorkomen.

De toxicologische resultaten voor de eindleden van de verdunningsreeks in Fase I (DSW en Vinkeveense Plassenwater), zoals uitgevoerd in de voorstudie, zijn grafisch weergegeven in Figuur 6.1. Deze twee ecotoxicologische 'range-finding' tests laten zien dat, hoewel de stappen tussen de Cu-addities vrij groot zijn, de EC50 voor DSW ligt bij ca. 30 µg Cu/L, en voor Vinkeveen water bij ca. 300 µg Cu/L. Voor DSWL-E werd een 48h EC50 van ca. 100 µg Cu/L gevonden (ten gevolge van de complexvormer EDTA).

Conclusie van de experimenten voor de verificatie van de geschiktheid van Vinkeveenwater laat zien dat aan alle voorwaarden is voldaan: de Cu concentratie is niet te hoog, en het DOC gehalte is relatief hoog voor Nederlandse oppervlaktewateren, zeker als men bedenkt dat ca 65 % van het Nederlandse oppervlaktewater afkomstig is van Rijn, met een DOC gehalte van 2-4 mg/L. Tenslotte, er is ruwweg een factor 10 verschil in de EC50-waarden van de twee wateren waarmee de verdunningen zijn aangemaakt (DSW en Vinkeveen).

Tabel 6.2. Selectie van in de literatuur gerapporteerde concentraties DOC in een aantal Nederlandse wateren (in mg C/L).

Locatie	DOC gemiddeld	DOC range	periode	bron
Rijn (Lobith)	2.8	2-4	2000	RIZA [1]
Hollands Diep	3		1991	IVM [2]
Biesbosch	3		1991	IVM [2]
Maas (Eijsden)	3.3	2-6	2000	RIZA [1]
Dommel		4-7	1989-94	IVM [2]
Maarsseveen (grote plas)		3-8	1991	IVM [2]
Ketelmeer	6		1991	IVM [2]
Maarsseveen (kleine plas)		3-12	1991	IVM [2]
Oostvaardersplassen		6-10	1989-94	IVM [2]
Nieuwe Meer	12		1991	IVM [2]
Vijfherenlanden	13		1989-94	IVM [2]
Loosdrechtse Plassen (9)	14.5	11-21	1989	Limnol. Inst. [3]
Amstel	17		1991	IVM [2]
Brouwerskolk	18		1991	IVM [2]
Oude Venen (5 locaties)	19	12-23	1991-92	IVM [4]
Tjeukemeer (10 locaties)	19.1	11-30	1989	Limnol. Inst. [3]
Amstel	24		1989-94	IVM [2]
Alblasserwaard	38		1989-94	IVM [2]
Krimpenerwaard	41		1989-94	IVM [2]

[1] RIZA, voorlopige resultaten Monitoring Rijkswateren, 2000.

[2] IVM, Diverse locaties. Periode (1989-1994); Van Hattum *et al.* (1996, 1998).

[3] Limnologisch Instituut Oosterzee/Nieuwersluis, Intern Verslag 1990-93.

[4] IVM, Oude Venen project (1991-1992). Van Hattum *et al.* (1992).

Tabel 6.3. Overzicht van de concentraties van de verschillende fracties koper in de verdunningsreeks Vinkeveenwater:DSW: Cu-nominaal, Cu-totaal(F), Cu-Chelex, Cu-DGT en Cu-ISE, alsmede de berekende fracties t.o.v. Cu-totaal(F)

1 Monster no	2 % opp. water	3 Cu-nominaal µg Cu/L	4 gemeten							5 % t.o.v. Cu-totaal(F)				
			6 Cu-totaal(F)		7 Cu-Chelex		8 Cu-DGT		9 Cu-ISE		11 Cu-nominaal %	12 Cu-Chelex %	13 Cu-DGT %	14 Cu-ISE %
			µg/ CuL	CV(%)	µg Cu/L	CV(%)	µg Cu/L	CV(%)	µg Cu/L	CV(%)				
651WA001	0	5.6	6.0	1.7	5.6	4.3	1.4	34.7	0.136	94	93	24	2.279	
651WA002	0	10	9.7	0.6	9.3	1.3	4.6	10.1	0.125	103	96	48	1.278	
651WA003	0	18	17.1	1.0	17.0	1.0	10.8	20.2	0.176	105	99	63	1.032	
651WA004	0	32	32.4	1.9	31.1	1.5	25.5	4.9	0.353	99	96	79	1.092	
651WA005	0	56	59.0	0.4	53.2	2.8	40.1	21.7	0.708	95	90	68	1.201	
651WA006	25	18	17.6	2.0	14.3	5.8	6.8	4.4	0.176	103	81	39	1.004	
651WA007	25	32	32.9	2.1	28.7	1.8	12.7	23.8	0.708	97	87	39	2.152	
651WA008	25	56	60.1	2.3	51.1	3.9	29.1	4.6	0.546	93	85	48	0.908	
651WA009	25	100	108.1	1.2	93.6	3.9	52.0	13.7	0.546	92	87	48	0.505	
651WA010	25	180	190.7	3.4	158.9	1.6	128.7	35.4	0.595	94	83	67	0.312	
651WA011	50	32	34.1	0.3	26.7	2.1	12.0	20.1	0.105	94	78	35	0.307	
651WA012	50	56	60.3	2.8	48.5	1.7	24.6	3.7	0.081	93	80	41	0.134	
651WA013	50	100	113.2	6.3	87.9	3.0	45.0	8.8	0.088	88	78	40	0.078	
651WA014	50	180	178.6	2.8	152.7	4.8	82.1	9.6	0.096	101	85	46	0.054	
651WA015	50	320	299.3	1.5	269.4	1.6	157.7	5.9	0.192	107	90	53	0.064	
651WA016	75	32	34.2	4.3	23.9	1.4	11.9	9.0	0.018	94	70	35	0.054	
651WA017	75	56	56.1	1.0	44.3	7.2	22.0	8.9	0.272	100	79	39	0.486	
651WA018	75	100	103.7	1.6	82.1	3.3	43.4	5.9	0.105	96	79	42	0.101	
651WA019	75	180	183.5	1.8	151.3	5.6	79.5	7.4	0.088	98	82	43	0.048	
651WA020	75	320	329.4	3.2	263.2	37.7	171.8	1.9	0.096	97	80	52	0.029	
651WA021	100	56	58.0	1.6	45.0	6.2	21.8	12.5	0.057	96	77	38	0.098	
651WA022	100	100	101.3	0.9	83.3	7.3	38.6	7.5	0.026	99	82	38	0.026	
651WA023	100	180	186.3	3.6	147.1	0.1	65.3	12.2	0.026	97	79	35	0.014	
651WA024	100	320	317.1	1.8	305.2	7.9	143.9	3.4	0.022	101	96	45	0.007	
651WA025	100	560	574.5	1.0	459.5	3.0	256.4	14.3	0.031	97	80	45	0.005	

6.2 Resultaten Fase I

6.2.1 Chemische parameters

• Analyses voor Cu en de Cu-fracties

De resultaten van de analyses (gemiddelde van metingen in 3-voud) en de daarbij behorende variatie-coëfficiënt (CV in %) van Cu-totaal(F), Cu-Chelex, Cu-DGT en Cu-ISE staan vermeld in Tabel 6.3. In de tabel worden weergegeven de karakteristieken van de verschillende monsters in termen van % Vinkeveen-water en additie van Cu (Cu-nominaal; kolommen 1-3). Verder zijn de gemeten Cu resultaten gerapporteerd (kolommen 4-10), de ratio's Cu-totaal(F)/Cu-nominaal (kolom 11), en de ratio's Cu-(fractie)/Cu-totaal(F) (gemeten) (kolommen 12-14).

Uit Tabel 6.3 blijkt duidelijk dat de in Fase I gemeten *Cu-totaal(F)* parallel loopt aan de Cu-nominaal, de bij de toetsen toegevoegde hoeveelheid koper. De Cu-nominaal is meestal een fractie lager dan Cu-totaal(F), wat zijn oorzaak vindt in de van nature aanwezige hoeveelheid Cu.

De controle op de aangemaakte media voor de toxiciteitstoetsen laat zien dat het toegevoegde koper (Cu-nominaal) in alle gevallen op of nabij Cu-totaal(F) ligt (Tabel 6.3).

De fractie Cu-Chelex is steeds ca. 80-90 % van het Cu-totaal (F), met betrekkelijk kleine verschillen tussen de behandelingen (verduunningen en Cu-additie; Figuur 6.2a,b). Wel blijkt dat voor 100 % DSW, waar in principe alle koper als vrij ion of anorganisch gebonden aanwezig is, de fractie het hoogst is: 90-100 %.

De ratio voor Cu-DGT ten opzichte van Cu-totaal(F) is beduidend lager dan de Cu-Chelex, ongeveer 40-50 %. Bij DSW blijken de percentages weer hoger (Figuur 6.3a,b). Echter, waar men ca 100 % zou verwachten wordt slechts 60-80 % gevonden, voor de laagste 2 doseringen nog lager.

De Cu-ISE meet alleen $[Cu^{2+}]$, en geen andere (an)organische complexen. Er is een duidelijke afname te zien in de ratio ten opzichte van Cu-totaal(F). Is de fractie in DSW nog 1.2-2.3 %, bij 100 % Vinkeveenwater en totaal-koper gehalten van 180 $\mu\text{g/L}$ en hoger daalt dit tot onder de 0.015 %. (Tabel 6.3; Figuur 6.4a,b). Bezie men de trend binnen één verduunning, bijvoorbeeld 100 % Vinkeveen water, dan blijkt er bij toenemende Cu-totaal(F) (van 56 tot 560 $\mu\text{g Cu/L}$) een afname van Cu-ISE ten opzichte van Cu-totaal(F).

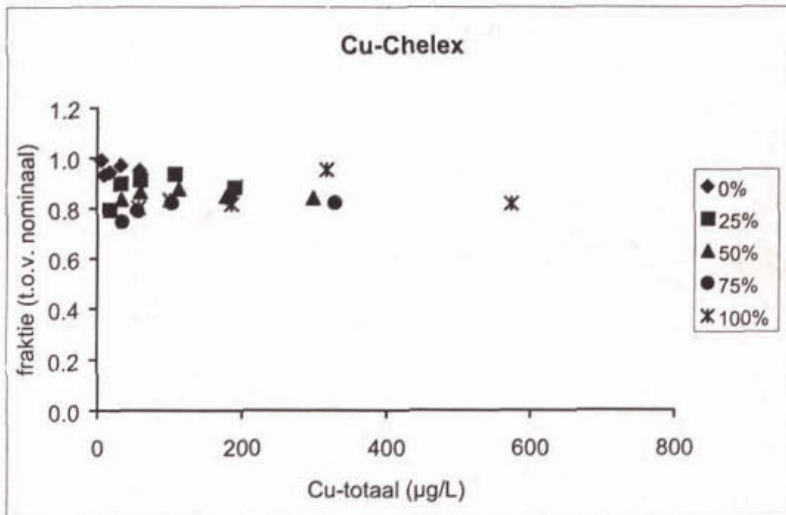
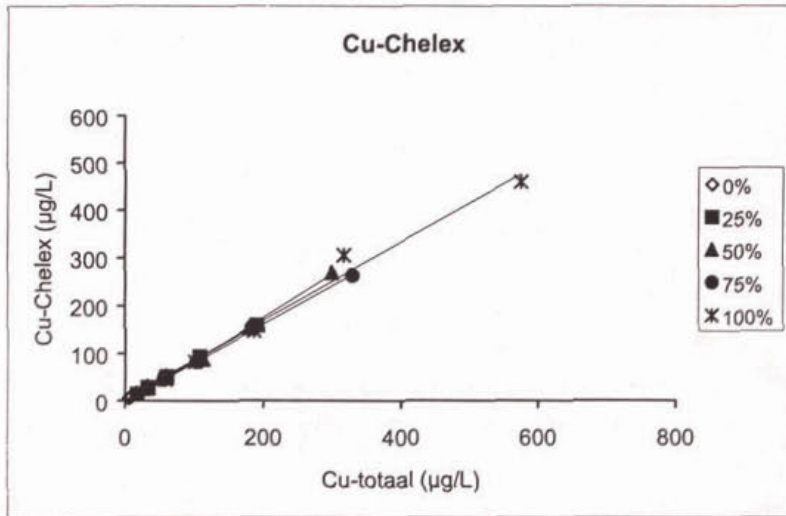
• Analyses voor de ondersteunende parameters

In Tabel 6.4 zijn de resultaten voor de analyses van DOC en de UV-karakterisering (gemeten als absorptie bij 380 en 440 nm) van het humusmateriaal weergegeven. Deze parameters zijn steeds geanalyseerd voor een representatief monster van de DSW-Vinkeveenwater verduunningsreeks.

De analyses voor de organische componenten in de monsters van Fase I, DOC en 'humus', vertonen een overeenkomstig beeld (Tabel 6.4, Figuur 6.5b-d). Er is een lineair verband tussen de concentraties en de mate van verduunning met DSW, echter voor beide parameters geldt dat de analyse-resultaten bij het onverdunde Vinkeveenwater zeer sterk lijken op die bij 75 % Vinkeveenwater. Additionele analyse van alle monsters voor geleidbaarheid en van een selectie voor totaal (opgelost) koolstof (TC) (Tabel 6.4) gaf wel een lineair verband, ook voor de 100 % Vinkeveenwater monsters. Hieruit blijkt dat er geen verduunningsfouten zijn gemaakt, maar dat er abusievelijk een verkeerd submonster is uitgestuurd voor de analyse van DOC en 'humus'. Het is daardoor juist om uit te gaan van een waar lineair verband, en de concentraties DOC en 'humus' in 100 % Vinkeveen water via extrapolatie (vanuit de 25-75 %) te berekenen. Dit levert voor (100 % Vinkeveen): DOC = 16.8 mg/L, $a(\text{ah}380) = 7.49$ en $a(\text{ah}440) = 2.24$. Deze berekende waarden zijn in de verdere evaluatie gebruikt.

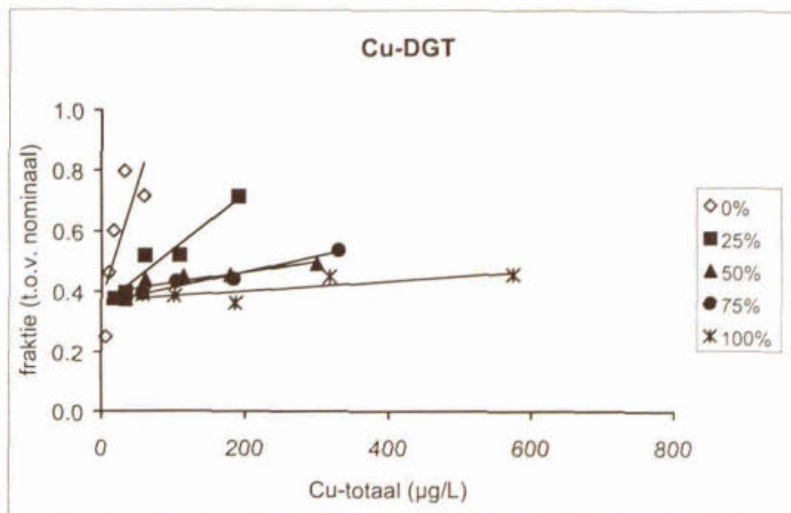
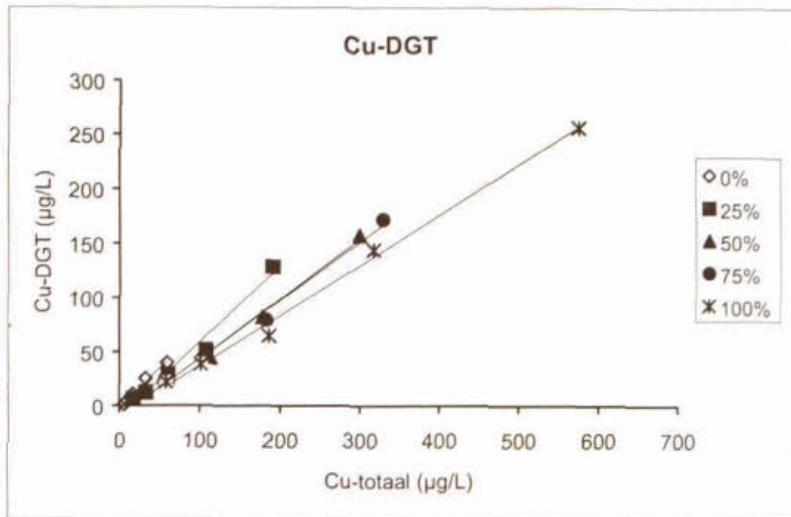
Figuur 6.2a. Cu-Chelex vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater

Figuur 6.2b. Ratio Cu-(Chelex, per Cu-nominaal) vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater



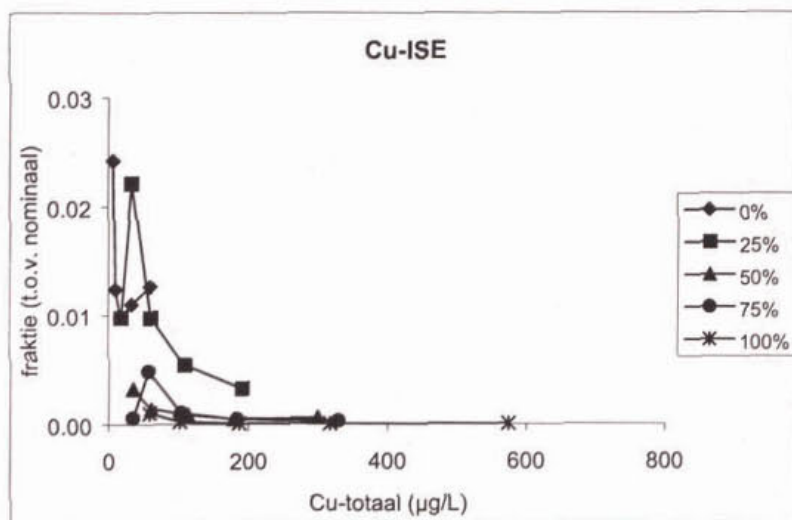
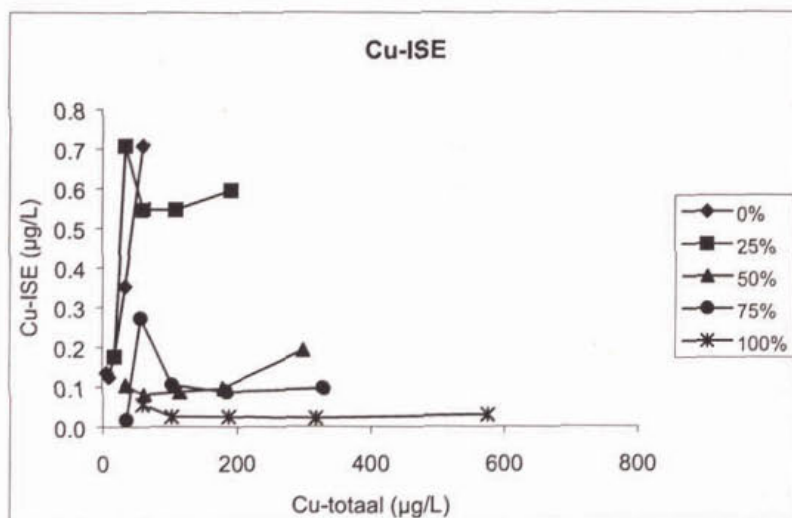
Figuur 6.3a. Cu-DGT vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater.

Figuur 6.3b. Ratio Cu-(DGT, per Cu-nominaal) vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater.

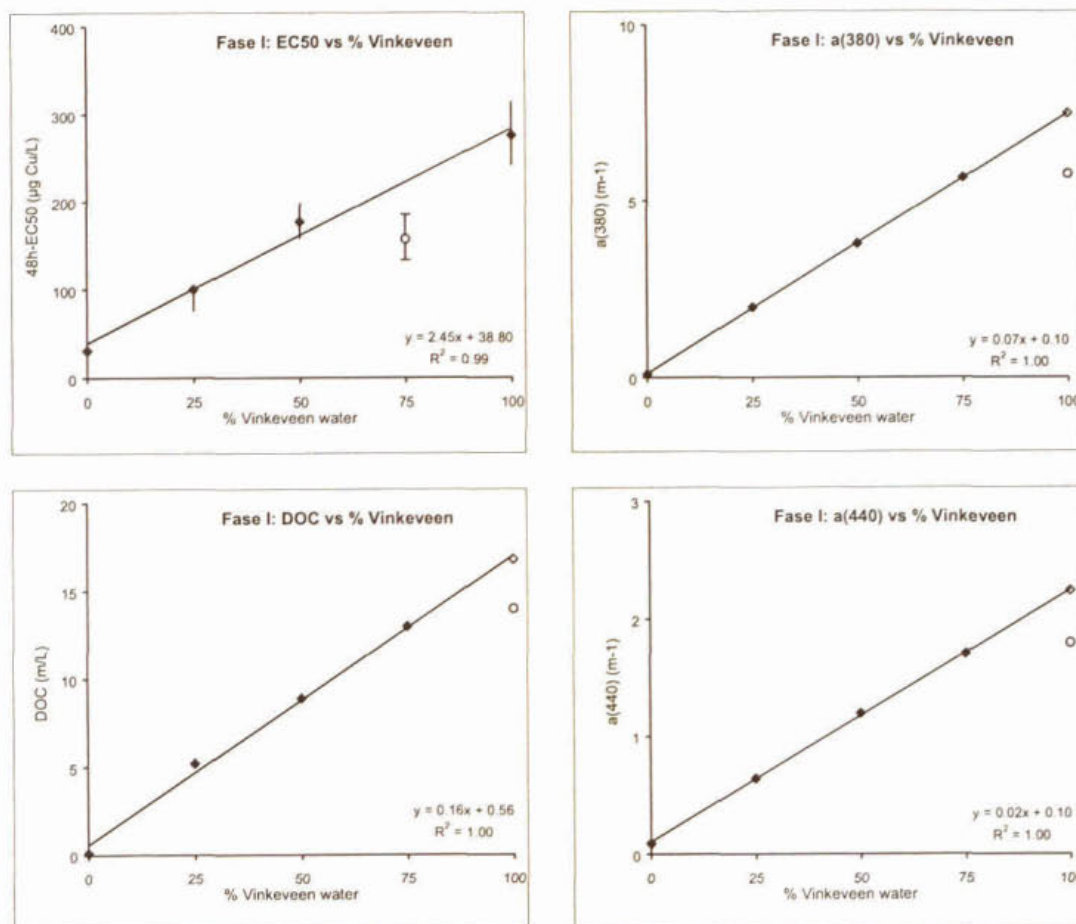


Figuur 6.4a. Cu-ISE vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater

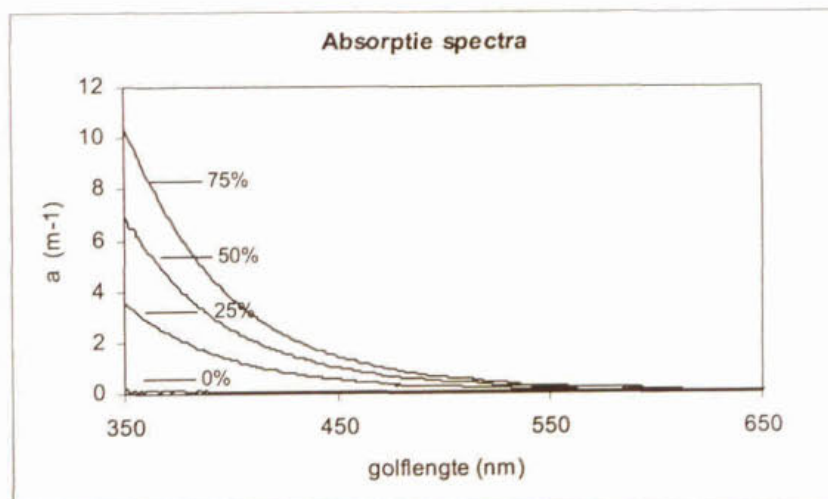
Figuur 6.4b. Ratio Cu-ISE, per Cu-nominaal) vs Cu-totaal(F) als functie van het percentage Vinkeveenwater



Figuur 6.5. 48h-EC50 (met 95 % betrouwbaarheidsinterval), DOC en absorptie (bij 380 en 440 nm) als functie van de verdunningsreeks Vinkeveenwater / DSW; de open cirkels zijn meetresultaten die niet voor de berekening trendlijn zijn meegenomen, de open ruiten zijn uit de trend berekende waarden.



Figuur 6.6. Grafische presentatie van de UV-absorptie spectra van de verdunningsreeks (Fase I).



Het absorptiespectrum voor deze monsters is weergegeven in Figuur 6.6. De monsters gemeten als 75 en 100 % Vinkeveen water vallen nagenoeg over elkaar, en daarom is alleen die van 75 % in de figuur weergegeven. De afstanden tussen opvolgende spectra blijken bij een vaste golflengte gelijk. Het spectrum voor DSW is nagenoeg gelijk de blanco situatie.

In Tabel 6.4 staan tevens voor de monsters met 0 % en met 100 % Vinkeveen water de resultaten van de analyses voor de macro-componenten Na, K, Mg, Ca, Al, Fe(totaal) en Mn, en de ionen NH₄, Cl, SO₄, NO₃, PO₄ en Si. Hoewel met DSW een 'standaard' water wordt verondersteld, blijken er relatief grote verschillen voor een aantal componenten. Vinkeveen water is rijker aan Si (× 8), Na en NH₄ (×5), K, Mg, Cl en NO₃ (×2), Ca en Al (× 1.5), PO₄ is een factor 2 lager. De geleidbaarheid is als gevolg hiervan een factor 2 hoger.

Tabel 6.4. Resultaten voor DOC, en UV absorptie, alkaliniteit, en de ondersteunende parameters (Fase I)

parameter	eenheid	monster					
		0	0	25	50	75	100
Vinkeveen water	%	0	0	25	50	75	100
DSW	%	100	100	75	50	25	0
bicarbonaat	mg/L		77	115	158	205	245
DOC	mg/L		0	5.2	8.9	13.0	(14.0) ¹⁾
TC	mg/L		16.2	26.2	36.2	49.4	57.5
a(ah380)	m-1		0.092	1.980	3.776	5.664	(5.756) ¹⁾
a(ah440)	m-1		0.092	0.645	1.197	1.704	(1.796) ¹⁾
geleidbaarheid	µS/cm	618	617	776	933	1098	1240
Na	mg/L	13.9					74
K	mg/L	16.3					25.7
Mg	mg/L	33.6					52.7
Ca	mg/L	92.5					146
NH ₄	mg/L	0.03					0.15
Cl	mg/L	93.3					229
SO ₄	mg/L	74.8					100
NO ₃	mg/L	0.4					1
PO ₄	mg/L	0.07					0.03
Si	mg/L	0.12					0.95
Al	mg/L	0.035					0.061
Fe-tot	mg/L	0.034					0.034
Mn	mg/L	0.017					0.019

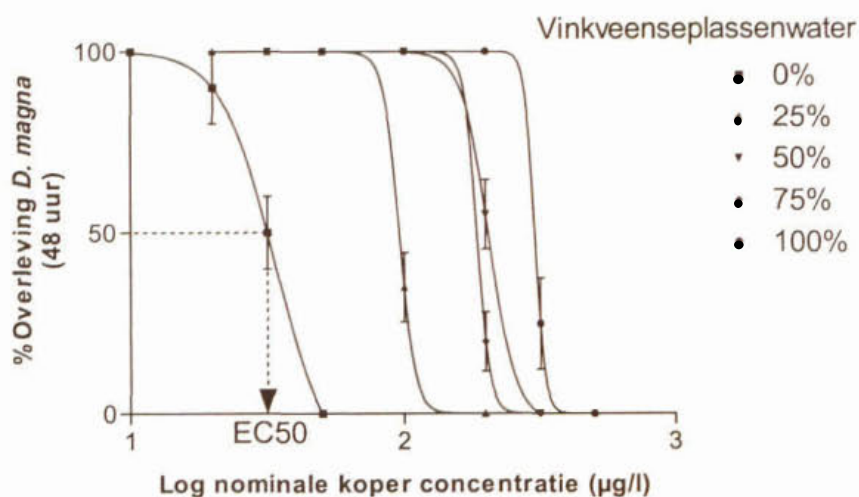
- 1) deze drie waarnemingen zijn niet voor 100 % Vinkeveen water (zie sectie 6.2.1); de volgende berekende waarden zijn in de verdere evaluatie gebruikt: DOC = 16.8 mg/L, a(ah380) = 7.490 m⁻¹, a(ah440) = 2.241 m⁻¹.

6.2.2 Biologische parameters

● Daphnia, 48h EC50 (beweeglijkheid)

Een samenvatting van de ecotoxicologische resultaten, met name die van de 48h EC50, die dient ter ondersteuning van de discussie, zijn voor Fase I gegeven in de Tabel 6.5 (berekend op basis van Cu-nominaal) en Tabel 6.6 (berekend op basis van de gemeten Cu-fracties Cu-Chelex en Cu-DGT). Figuur 6.7 geeft de curven voor de berekening van de EC50s, met 95 % betrouwbaarheidsintervallen.

Figuur 6.7. % Overleving vs log [Cu-nominaal] plots voor de berekening van de EC50 waarden, als functie van het % Vinkeveen water.



Tabel 6.5. Een samenvatting van de toxicologische resultaten van de Fase I toetsen, berekend op basis van de nominale Cu concentraties (in µg Cu/L).

Verdunning	DOC [mg C/L]	24h EC50 beweeglijkheid	48h EC50 beweeglijkheid	48h NOEC beweeglijkheid	48h NOEC conditie
Vinkeveen 100 %	16.8	387	276	180	180
Vinkeveen 75 %	13.0	285	157	100	100
Vinkeveen 50 %	8.9	251	177	100	100
Vinkeveen 25 %	5.2	ca. 100	100	56	56
Vinkeveen 0 % /DSW 100 %	< 0.1	51	31	10	10

Tabel 6.6. Een samenvatting van de toxicologische resultaten 48h EC50 (beweeglijkheid) van de Fase I toetsen berekend op basis van de Cu-totaal(F), Cu-Chelex en Cu-DGT concentraties (in µg Cu/L); voor Cu-ISE kon geen dosis-respons worden berekend.

Verdunning	48h EC50	48h EC50	48h EC50	48h EC50
	beweeglijkheid	beweeglijkheid	beweeglijkheid	beweeglijkheid
	Cu-nominaal	Cu-totaal(F)	Cu-Chelex	Cu-DGT
Vinkeveen 100 %	276	300	282	138
Vinkeveen 75 %	157	172	141	71
Vinkeveen 50 %	177	180	154	81
Vinkeveen 25 %	100	104	90	49
Vinkeveen 0 % / DSW 100 %	31	36	35	22

De toxicologische resultaten (48h EC50, *Daphnia* (beweeglijkheid)) van de verdunningsreeks laten voor nominaal koper duidelijk zien dat er een lineair verband is met de hoeveelheid Vinkeveen water (Tabel 6.5, Figuur 6.5a). De EC50 voor Cu-totaal (nominaal) en voor Cu-totaal (gemeten) zijn binnen de onzekerheid van de metingen gelijk.

De bevindingen van de 'range finding' zijn bevestigd in Fase I: de 48h EC50 voor DSW is 31 (95 % CI: 26-37) µg Cu/L (nominaal), voor Vinkeveen water is dat 276 (95 % CI: 242-314) µg Cu/L (nominaal), een factor van ca. 10 verschil.

Bekijkt men de tussenliggende verdunningsreeks, dan liggen de EC50's voor 25 en 50 % nagenoeg op de ideale mengcurve.

Duidelijk is te zien dat de biologische effect parameters (NOECs, EC50s) afnemen met een afname van de concentratie DOC. Dit geldt zowel voor de effect-parameters berekend op basis van totaal-koper (Tabel 6.5), als voor de EC50s berekend op basis van de gemeten fracties Cu-Chelex en Cu-DGT (Tabel 6.6). De EC50 voor 75 % Vinkeveenwater blijkt duidelijk af te wijken (te laag).

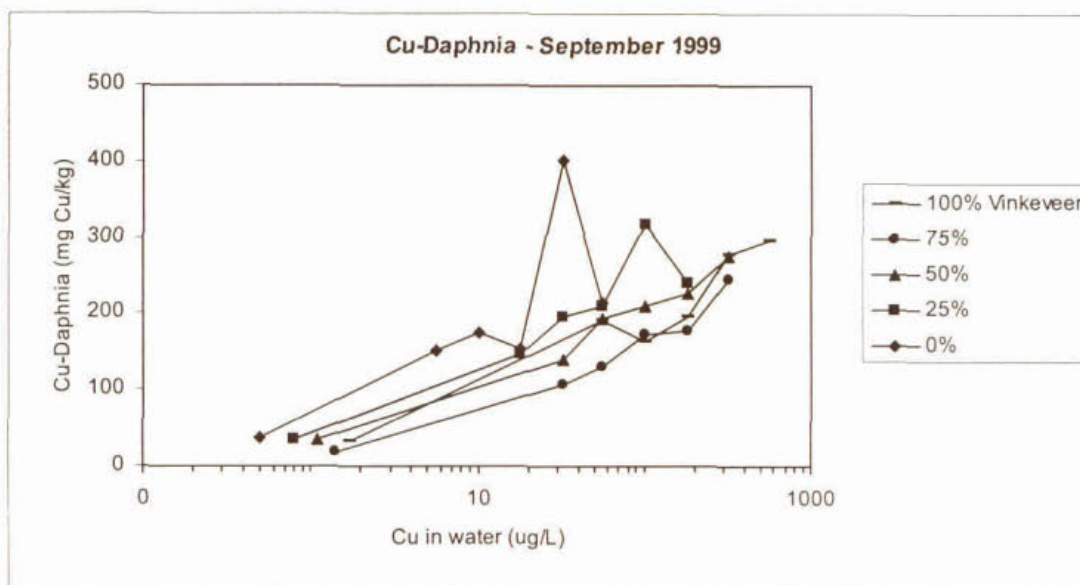
Een meer gedetailleerd verslag van de resultaten van de toxicologische toetsen is opgenomen in Annex 2. Voor een volledige rapportage van deze toetsen zie Hooftman *et al.* (1999). Zowel de pH als de zuurstof en temperatuur bleven tijdens de toxiciteitstoetsen binnen de voor de toets geldende randvoorwaarden.

- *Cu-daphnia*

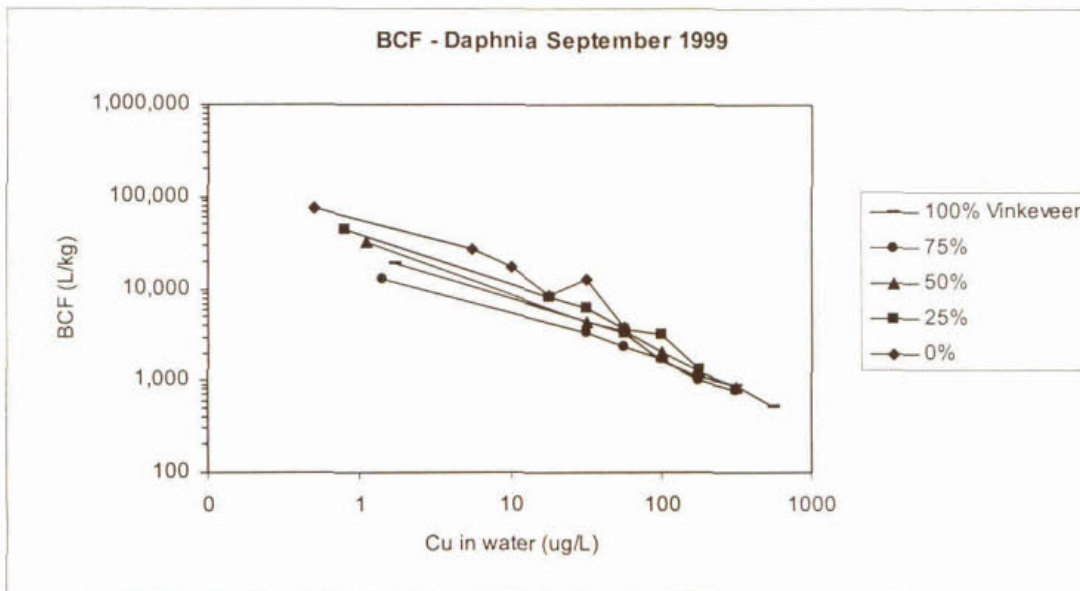
De Cu-daphnia, ook wel de 'critical body residue' (CBR) genoemd, is in Tabel 6.7 gepresenteerd als een range van blootstellingniveaus rondom het mediane effect-niveau (EC50). Deze getallen hebben betrekking op monsters die zijn genomen aan het einde van de toxicologische experimenten in Fase I (voor de totale gegevensset zie Annex 8). De concentraties zijn vermeld op basis van drooggewicht (d.w.).

De opname van Cu in de watervlooiën bij de reeks van Fase I uit de Vinkeveense Plassen in een oplopende verdunning met DSW water is weergegeven in Figuur 6.8a (en Annex 8). Daar er geen koperanalyses zijn uitgevoerd in het water zonder koper additie, zijn deze concentraties geschat als een lineaire relatie (DSW = 0.5 µg Cu/L, Vinkeveen = 1.7 µg Cu/L). Duidelijk is te zien dat de sterkste accumulatie optreedt in het DSW water (0 % Vinkeveen) met laag DOC gehalte en dat een afnemende bioaccumulatie te zien is (bij overeenkomstige Cu doseringen) bij een toenemend aandeel van 25 %, 50 % en 75 % Vinkeveenwater. De accumulatie in 100 % Vinkeveenwater lijkt van dit patroon af te wijken en komt overeen met de waarden gevonden bij de 50 % en 75 % verdunningen. Regulatie van de opname van Cu door het organisme is hiervan mogelijk de oorzaak.

Figuur 6.8a. Relatie interne Cu-daphnia vs. de Cu-concentratie (nominaal) in water van de verdunningsreeks van Fase I (percentage Vinkeveenwater).



Figuur 6.8b. Berekende BCFs voor de Daphnia's uit de toxiciteitsproeven uit Fase I als functie van de nominale Cu concentratie en het percentage Vinkeveenwater.



De Cu-daphnia neemt voor alle verdunningen vanaf een beginniveau van 18-35 mg/kg (als er geen koper is toegevoegd) toe met oplopende concentratie van Cu-nominaal.

Tabel 6.7. Samenvatting van de Cu-daphnia (range) voor de externe Cu-nominaal concentraties rond de gevonden EC50 waarden.

Verdunning	DOC mg C/L	48h EC50 µg Cu/L	Cu- nominaal *) µg Cu/L	Cu-daphnia (range) *) mg Cu/kg
Vinkeveen 100 %	16.8	276	180-320-560	196 – 297
Vinkeveen 75 %	13.0	157	100-180-320	173 – 244
Vinkeveen 50 %	8.9	177	100-180-320	209 – 275
Vinkeveen 25 %	5.2	100	56-100-180	209 – 317
Vinkeveen 0 % / DSW 100 %	< 0.1	31	18-32-56	155 – 403

*) range over 3 doseringsniveaus rondom de EC50

Met behulp van de gemeten waterconcentraties zijn BCF waarden berekend (Annex 8) en in Figuur 6.8b uitgezet tegen de nominale koperconcentratie. In verband met de co-variantie met doseringsniveau, is voor het vergelijken van de 48h-BCF waarden tussen de verschillende wateren gekozen voor de doseringsniveaus nabij de NOEC. De nuldoseringen zijn niet meegenomen. Het is niet bekend in welke mate de jonge Daphnia's voorafgaand aan de experimenten al koper uit het kweekwater (DSWL-E) hebben opgenomen (concentratie niet bekend, maar doordat in dat medium de complexvormer EDTA aanwezig is, mag men aannemen dat de vrij-koper concentratie ook laag is) en de in de nuldoseringen gemeten interne concentraties het gevolg zijn van eliminatie bij blootstelling aan veldwater en DSW water met relatief lage concentraties. De laagste Cu doseringen in de experimenten liggen naar mag worden aangenomen boven de Cu gehalten in het kweekwater. De hoge blootstellingsniveaus, waarbij het optreden van effecten zijn waargenomen, zijn voor de vergelijkende berekeningen eveneens niet meegenomen. De aldus geschatte 'schijnbare' 48h-BCFs bij lage concentraties zijn samengevat in Tabel 6.8. De BCFs zijn individuele waarden bij de aangegeven nominale koperconcentraties. Uit de tabel is te zien dat bij toenemende concentratie DOC de BCFs af nemen.

Gebruikt men uitsluitend de (schijnbare) BCF waarden onder of nabij het NOEC niveau (dus voor gezonde organismen) dan blijkt dat er aanzienlijke verschillen bestaan tussen de exposities in de verschillende verdunningen, die samen lijken te vallen met de verschillen in waargenomen toxiciteit. In Vinkeveenwater (100 %) is de BCF (ca. 1,100-3,400 L/kg) bijna een factor 10 lager dan in het DSW water (18,000-27,000 L/kg) (Tabel 6.8).

Tabel 6.8. Samenvatting van de schijnbare BCF voor Daphnia (range) voor de externe Cu-nominaal concentraties rond de gevonden NOEC waarden.

Verdunning	DOC mg C/L	48h NOEC µg Cu/L	Cu- nominaal µg Cu/L	BCF (range) *) L/kg
Vinkeveen 100 %	16.8	180	56-100-180	3403 – 1642 – 1090
Vinkeveen 75 %	13.0	100	32-56-100	3338 – 2331 – 1728
Vinkeveen 50 %	8.9	100	32-56-100	4354 – 3471 – 2095
Vinkeveen 25 %	5.2	56	18-32-56	8135 – 6132 – 3740
Vinkeveen 0 % / DSW 100 %	< 0.1	10	5.6-10	27089 – 17597

*) 3 doseringsniveaus rondom de NOEC

6.3 Resultaten Fase II

6.3.1 Chemische parameters

• Analyses voor Cu en de Cu-fracties

De resultaten voor de analyses (gemiddelde van metingen in 2-voud) en de daarbij behorende variatie coëfficiënt (CV in %) van Cu-totaal(F) en Cu-totaal(NF), Cu-Chelex en Cu-DGT staan voor de vier bemonsterde perioden vermeld in de Tabellen 6.9a-d. De Cu-DGT resultaten voor januari zijn gebaseerd op metingen in enkelvoud, die voor april op triplo's.

Tabel 6.9a. Overzicht van de analyseresultaten van de bemonsteringen in Fase II-1 (januari 2000)

Parameter	Locatie datum monsternr.	Beemster	Vinkeveen	B. Regge	Spr. Beek	Rijn	Maas
		10-Jan 211	10-Jan 221	10-Jan 231	10-Jan 241	11-Jan 251	11-Jan 261
Koper							
Cu-totaal(NF)		1.4	1.1	1.9	3.5	2.2	3.0
Cu-totaal(F)		1.3	1.0	1.4	0.4	1.8	1.8
Cu-Chelex	µg/L	0.4	0.4	0.7	0.2	1.1	1.2
Cu-DGT	µg/L	0.6	0.5	0.3	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Koper als fractie van Cu-totaal(F)							
Cu-Chelex	%	30 %	45 %	52 %	58 %	59 %	64 %
Cu-DGT	%	50 %	50 %	23 %	< 50 %	< 11 %	< 11 %
Overige parameters							
DOC (Omegam)	mg/L	4.1	11	13	2.2	3	3.8
DOC (TNO)	mg/L	17.5	13.8	14.6	1.5	3.0	3.7
DOC (IVM)	mg/L	17.3	14.2	14.7	3.7	5.0	5.3
a(ah380)	m-1	34.2	17.7	34.6	1.3	5.5	8.2
a(ah440)	m-1	10.7	5.3	11.2	0.34	2.1	3.1
pH Lab		7.84	7.98	7.46	6.53	7.79	7.74
Geleidbaarheid	µS/cm	1635	1242	630	278	634	401
Na	mg/L	149	147	36	17	37	14
K	mg/L	16	12	11	5	4	4
Mg	mg/L	38	26	9	7	10	6
Ca	mg/L	174	75	77	20	71	60
Cl-	mg/L	194	310	58.9	30.9	81.7	29.3
HCO ₃ ⁻ (Lab AW)	mg/L	577	239	189	8.8	164	148
HCO ₃ ⁻ (OMEGAM)	mg/L	520	220	180	20	130	120
CO ₃ ²⁻ (OMEGAM)	mg/L	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12
SO ₄	mg/L	185	93.7	58.7	31.5	51.1	38.4
NO ₃	mg/L	16	7.5	23.3	68	19.4	20.8
NO ₂	mg/L	0.27	< 0.01	0.33	< 0.01	0.2	0.17
Si	mg/L	17.1	1.51	6.69	8.11	3.47	3.67
Al	mg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Fe	mg/L	0.011	< 0.01	0.44	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Mn	mg/L	0.54	< 0.01	0.39	< 0.01	0.01	0.036

Tabel 6.9b. Overzicht van de analyseresultaten van de bemonsteringen in Fase II-2 (april 2000)

	Locatie	Beemster	Vinkeveen	B. Regge	Spr. Beek	Rijn	Maas
	datum	10-Apr	10-Apr	10-Apr	10-Apr	11-Apr	11-Apr
	monsternr.	212	222	232	242	252	262
Parameter	eenheid						
Koper							
Standaard bemonstering							
Cu-totaal(NF)	µg/L	2.0	1.1	1.4	1.4	3.3	2.0
Cu-totaal(F)	µg/L	0.9	1.2	1.4	< 0.05	2.0	1.9
Cu-Chelex	µg/L	0.5	0.6	0.9	0.6	1.3	1.4
Cu-DGT	µg/L	< 0.2	0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Controle monsters (100 ml)							
Cu-totaal(NF)	µg/L	1.7	1.0	1.6	0.2	2.6	2.0
Cu-totaal(F)	µg/L	1.1	1.1	1.4	< 0.05	1.5	1.8
Koper als fractie van Cu-totaal(F)							
Cu-Chelex	%	55 %	50 %	66 %		65 %	71 %
Cu-DGT	%	< 23 %	16 %	< 15 %		< 10 %	< 10 %
Overige parameters							
DOC (Omegam)	mg/L	26	18	17	4.4	6.5	5.6
DOC (TNO)	mg/L	22.4	13.3	12.4	1.1	3.0	3.4
DOC (IVM)	mg/L	21.6	13.3	12.4	2.4	3.5	4.0
a(ah380)	m-1	17.5	7.2	10.5	0.6	2.5	2.9
a(ah440)	m-1	6.1	2.3	3.6	0.2	1.1	1.2
pH Lab		8.05	8.05	7.65	6.94	7.7	7.86
Geleidbaarheid	µS/cm	1709	1264	668	271	704	460
Mg	mg/L	36	25	8	7	11	7
Ca	mg/L	92	78	76	21	74	64
HCO ₃ ⁻ (OMEGAM)	mg/L	380	220	210	16	170	160
CO ₃ ²⁻ (OMEGAM)	mg/L	24	10	< 6	< 6	6	< 6

Tabel 6.9c. Overzicht van de analyseresultaten van de bemonsteringen in Fase II-3 (juli 2000)

Parameter	Locatie	Beemster	Vinkeveen	B. Regge	Spr. Beek	Rijn	Maas
	datum monsternr.	10-Jul 213	10-Jul 223	10-Jul 233	10-Jul 243	11-Jul 253	11-Jul 263
Parameter	eenheid						
Koper							
Standaard bemonstering							
Cu-totaal(NF)	µg/L	3.7	1.2	3.5	1.1	3.3	3.6
Cu-totaal(F)	µg/L	1.3	2.1	1.5	0.5	2.1	3.5
Cu-Chelex	µg/L	0.6	0.9	1.1	0.5	1.2	1.8
Cu-DGT	µg/L	< 0.2	0.40	0.70	< 0.2	0.36	0.35
Controle monsters (100 mL)							
Cu-totaal(NF)	µg/L	1.3	1.8	1.6	0.7	2.7	2.8
Cu-totaal(F)	µg/L	1.1	1.7	1.5	0.4	2.3	2.6
Koper als fractie van Cu-totaal(F)							
Cu-Chelex	%	48 %	45 %	74 %	92 %	59 %	52 %
Cu-DGT	%	< 15 %	19 %	47 %	< 38 %	17 %	10 %
Overige parameters							
DOC (IVM)	mg/L	14.4	14.0	12.3	1.9	3.1	5.0
a(ah380)	m-1	14.7	9.2	13.2	2.3	3.1	4.7
a(ah440)	m-1	4.5	3.3	4.5	1.0	1.4	1.9
pH Lab		7.72	8.14	7.52	6.65	7.66	7.69
Geleidbaarheid	µS/cm	1233	1255	696	276	763	562
Mg	mg/L	26	25	7	6	12	8
Ca	mg/L	80	71	66	20	74	64
HCO ₃ ⁻ (Lab AW)	mg/L	280	221	189	12.7	150	170
CO ₃ ²⁻ (Lab AW)	mg/L	< 5	6	< 5	< 5	< 5	< 5

Tabel 6.9d. Overzicht van de analyseresultaten van de bemonsteringen in Fase II-4 (oktober 2000)

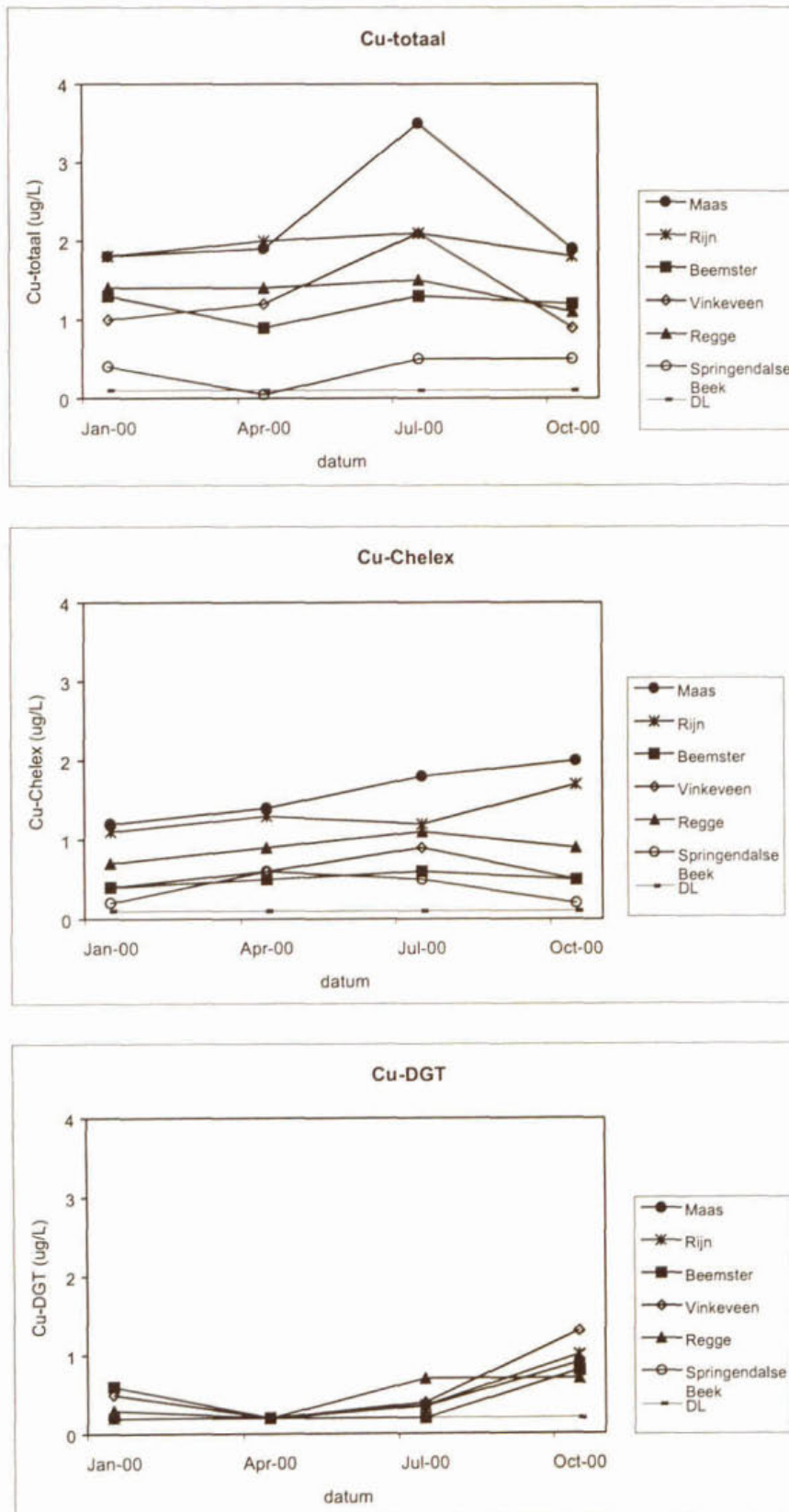
	Locatie	Beemster	Vinkeveen	B. Regge	Spr. Beek	Rijn	Maas
	datum	16-Oct	16-Oct	16-Oct	16-Oct	17-Oct	17-Oct
	monsternr.	214	224	234	244	254	264
Parameter	eenheid						
Koper							
Cu-totaal(NF)	µg/L	2.5	1.0	1.8	0.3	4.2	3.2
Cu-totaal(F)	µg/L	1.2	0.9	1.1	0.5	1.8	1.9
Cu-Chelex	µg/L	0.5	0.5	0.9	0.2	1.7	2.0
Cu-DGT	µg/L	0.8	1.3	0.7	0.8	1.0	0.9
Koper als fractie van Cu-totaal(F)							
Cu-Chelex	%	40 %	51 %	83 %	48 %	96 %	100 %
Cu-DGT	%	67 %	> 100 %	68 %	> 100 %	54 %	49 %
Overige parameters							
DOC (IVM)	mg/L	18.0	14.3	15.1	0.9	4.3	4.1
a(ah380)	m-1	13.0	6.4	14.1	0.9	2.7	2.9
a(ah440)	m-1	5.0	2.2	6.2	0.3	1.1	1.1
pH Lab		7.66	8.12	7.35	6.71	7.81	7.76
Geleidbaarheid	µS/cm	1383	1247	572	291	737	576
Mg	mg/L	26	23	7.2	6.6	11	7.6
Ca	mg/L	150	67	63	20	63	65
HCO ₃ ⁻ (Lab AW)	mg/L	485	243	218	13	153	173
CO ₃ ²⁻ (Lab AW)	mg/L	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Voor de bemonsteringen in april en juli zijn ook de resultaten (Cu-totaal(F), en Cu-totaal-(NF)) gegeven van de contaminatie-controles (bemonstering in 100 mL potjes). In de tabel worden voor de 6 bemonsteringslocaties tevens de berekende ratio's Cu-fractie / Cu-totaal(F) weergegeven.

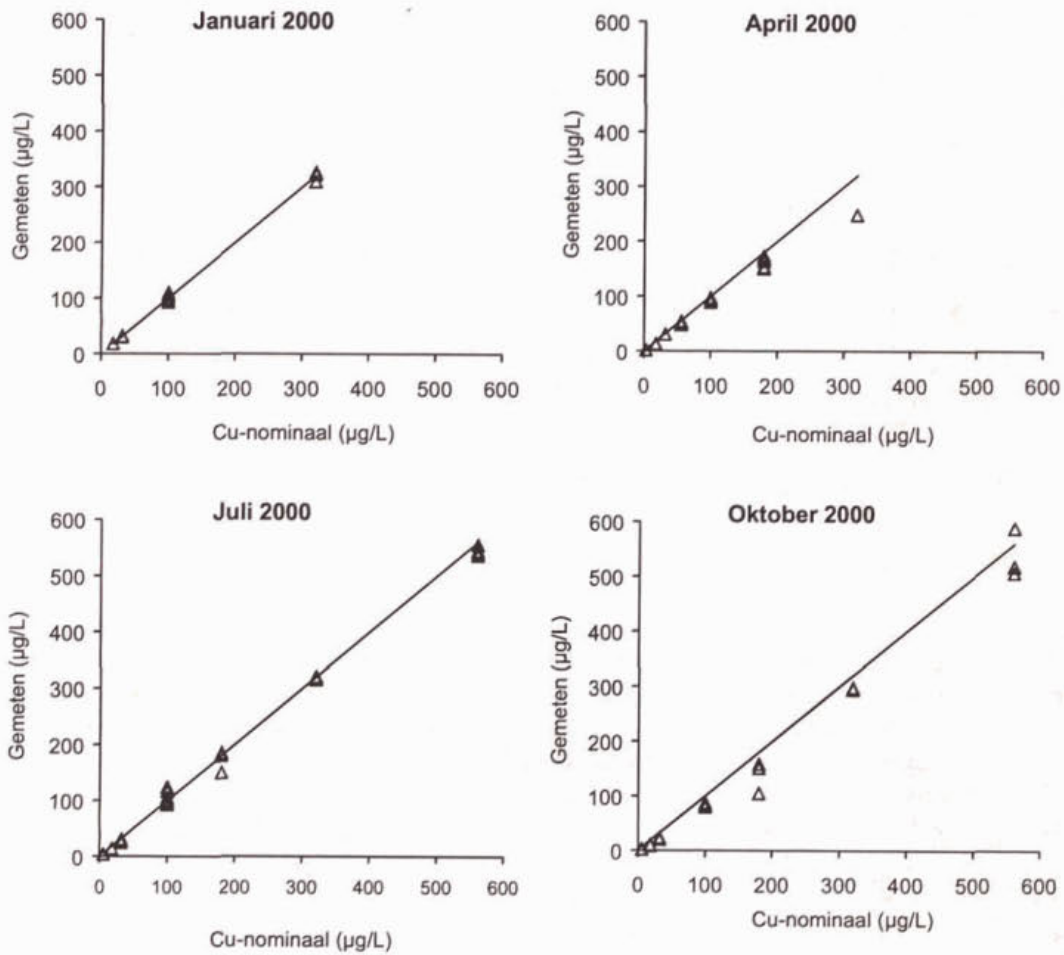
Voor de biologische beschikbaarheid is met name de opgeloste (dus gefiltreerde) fractie van belang. De variatie in Cu-totaal(F) over de seizoenen is in Figuur 6.9a weergegeven. Behoudens de juli waarnemingen voor Cu-totaal(F) in de Maas en het Vinkeveense Plassenwater lijken de concentraties redelijk constant. De hoogste concentraties worden gevonden in Rijn en Maas, en de laagste in de Springendalse Beek. Uiteraard is in vrijwel alle gevallen de gefiltreerde concentratie kleiner dan de niet-gefiltreerde (Tabellen 6.9a-d).

De controle op de aangemaakte media voor de toxiciteitstoetsen laat zien dat het toegevoegde koper (Cu-nominaal) in alle gevallen op of nabij Cu-totaal(F) ligt (Figuur 6.10a-d). Ca. 60 % van de toetsmedia, betrokken in het bioaccumulatie-onderzoek, zijn gecontroleerd en zijn verspreid over de doseringsniveaus de concentraties geanalyseerd. Per periode zijn de nominale waarden vergeleken met de gemeten waarden. Op basis van lineaire regressie werd vastgesteld dat per periode de werkelijk teruggemeten concentratie varieerde van gemiddeld 87 % (April, n=24, R²=0.98) tot 100 % (Januari, n=12, R²=0.99). Daar waar de gemeten Cu-concentraties ontbreken zijn interpolaties genomen van de lineaire trends door de waarnemingen (Figuur 6.10) voor de berekeningen.

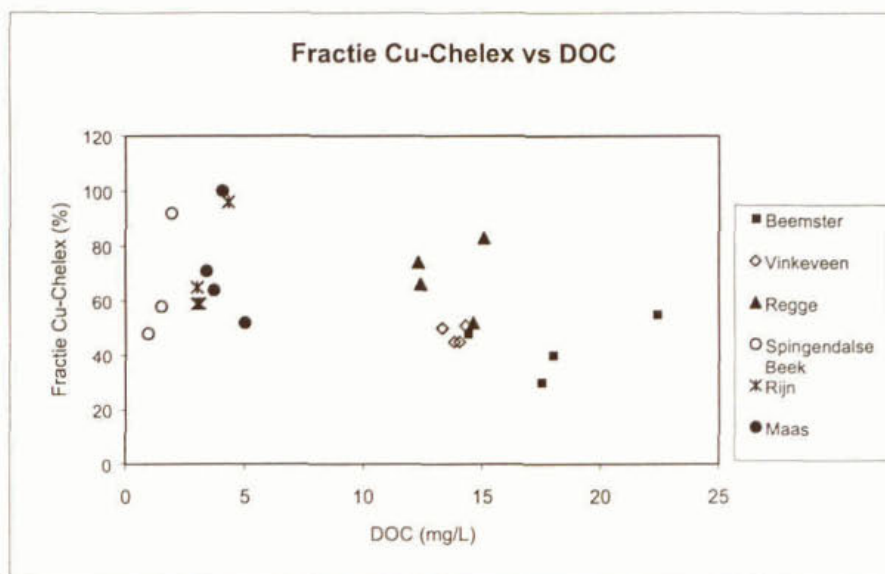
Figuur 6.9a-c. Seizoensvariatie voor de 6 locaties in Fase II: a) Cu-totaal(F), b) Cu-Chelex, en c) Cu-DGT (in $\mu\text{g/L}$)



Figuur 6.10. Controle van de Cu-addities voor de toxiciteits-toetsen van Fase II (Cu-nominaal vs Cu-totaal(F), in $\mu\text{g/L}$); de lijn is de 1:1 ratio.



Figuur 6.11. Relatie tussen de fractie Cu-Chelex / Cu-totaal(F) vs de concentratie opgelost organisch koolstof (DOC)



De resultaten voor de analyses en de daarbij behorende variatie coëfficiënt (CV in %) van Cu-DGT staan voor de vier bemonsterde perioden vermeld in de Tabellen 6.9a-d. De Cu-DGT resultaten voor januari zijn gebaseerd op metingen in enkelvoud, die voor april gemiddelden voor triplo's. Voor Fase II is alleen de Cu-DGT in het oorspronkelijke, dus niet met koper verrijkte, watermonster gemeten. De seizoensvariatie is grafisch uitgezet in Figuur 6.9c. De concentraties zijn beduidend lager dan Cu-totaal. Voor de eerste 3 perioden varieert de fractie van 5 % tot 50 % van Cu-totaal (Tabel 6.9a-d), in oktober toenemend tot een range van 50 % tot 100 %, afhankelijk van het monster.

De resultaten voor de analyses (gemiddelde van metingen in 2-voud) en de daarbij behorende variatie coëfficiënt (CV in %) van Cu-Chelex staan voor de vier bemonsterde perioden vermeld in de Tabellen 6.9a-d. Voor Fase II is de Cu-Chelex alleen in het oorspronkelijke, niet met koper verrijkte, monster gemeten. De concentraties zijn als in Fase I lager dan Cu-totaal. Voor de Maas is een lichte toename zichtbaar in de tijd, de andere wateren geven een meer constant beeld. De fractie Cu-Chelex/Cu-totaal(F) varieert echter per soort water. In Figuur 6.11 is deze fractie uitgezet tegen het DOC. Er is een lichte trend zichtbaar: hoe hoger het DOC, des te lager de fractie Cu-Chelex.

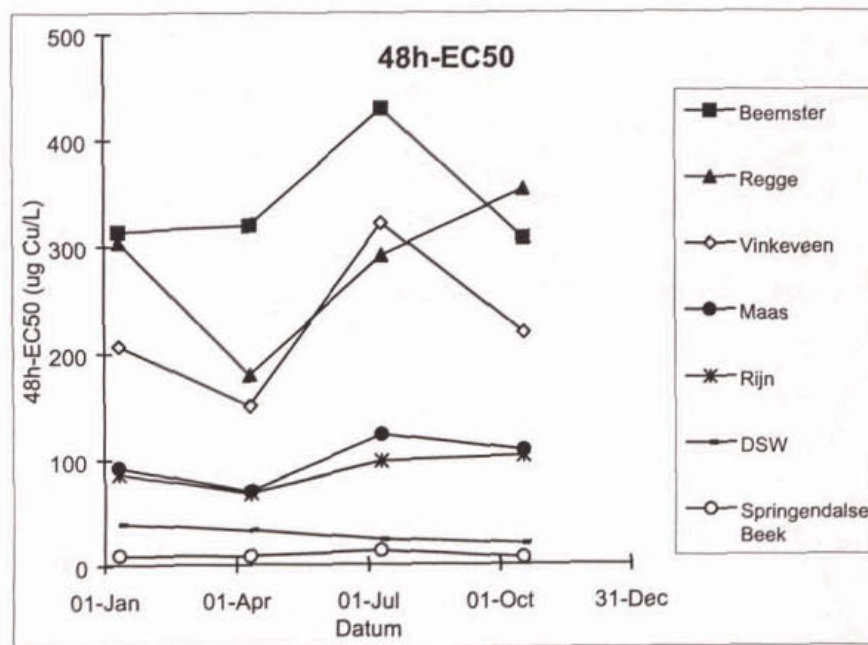
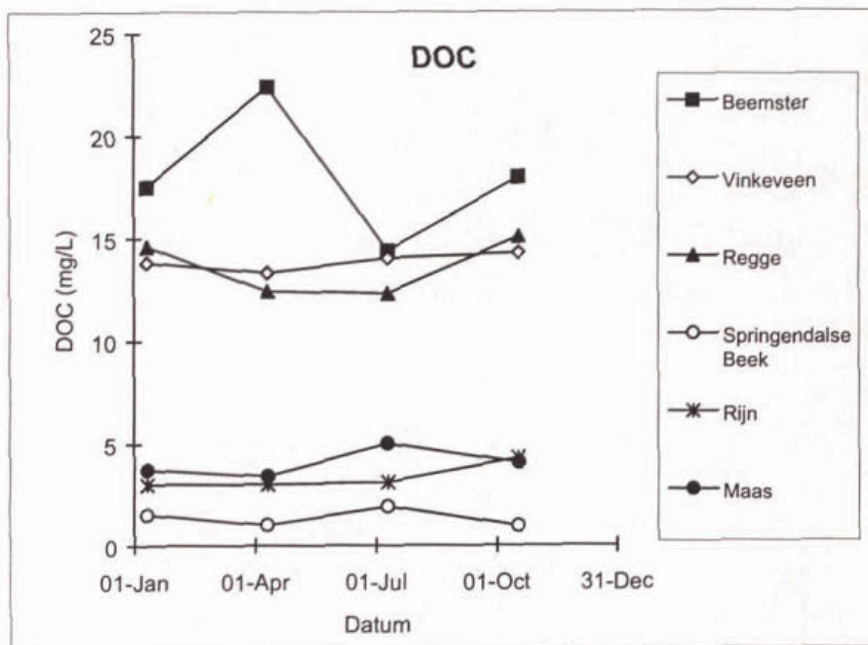
● *Analyses van ondersteunende parameters*

In de Tabel 6.9a-d zijn de resultaten voor de analyses van DOC (afhankelijk van de periode I tot 3 laboratoria), alkaliniteit, UV-absorptie (bij 380 en 440 nm), pH, geleidbaarheid en Mg en Ca gegeven. Ter karakterisering van de watertypen zijn alleen voor de januari monsters tevens Al, Fe(totaal), K, Na, Mn, Si en Cl⁻, SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ en SO₄²⁻ gemeten (Tabel 6.9a).

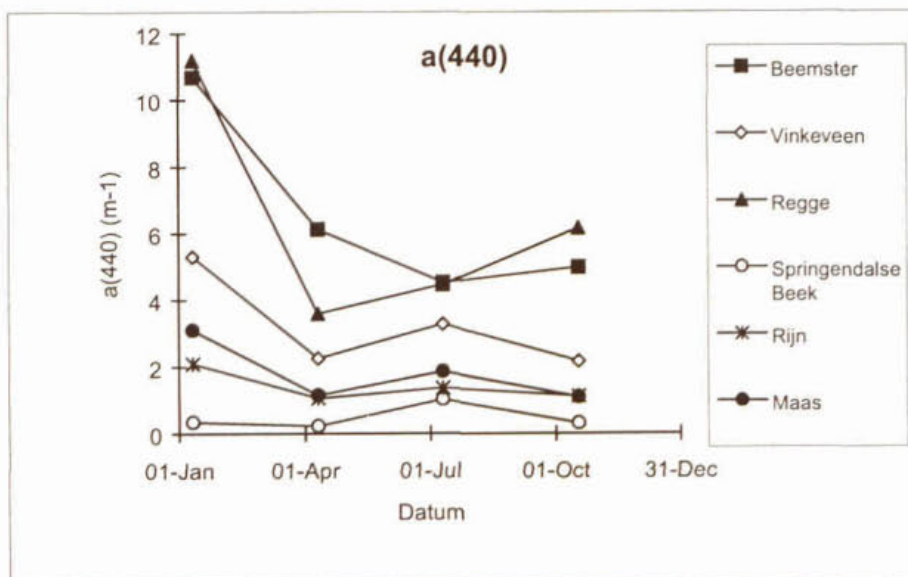
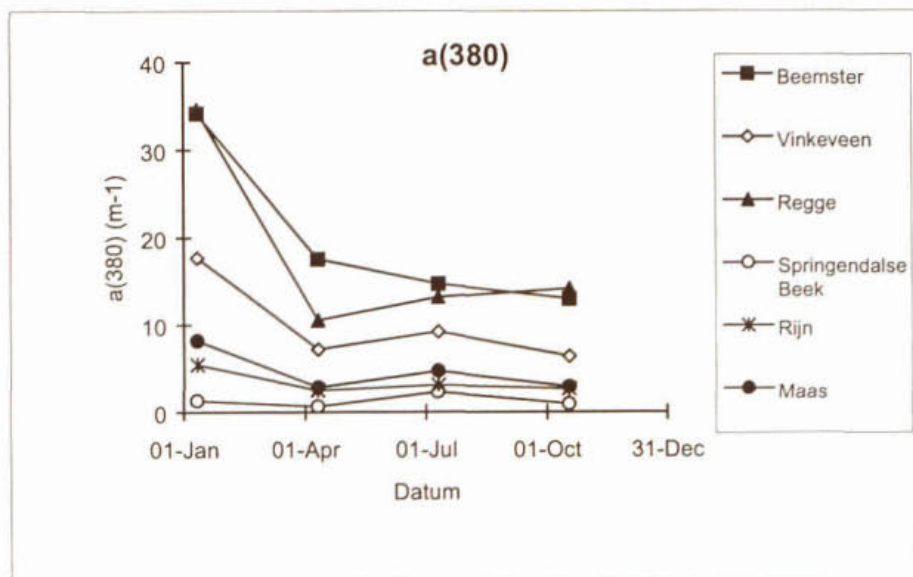
Er blijkt dat de bemonsterde wateren duidelijke karakteristieken hebben ten aanzien van het DOC gehalte. Beemster Middensloot hoog (range 14.4-22.4 mg/L), Vinkeveense Plassen (13.3-14.3 mg/L) en Beneden Regge (12.3-15.1 mg/L) iets lager, Rijn (3.0-4.3 mg/L) en Maas (3.4-5.0 mg/L) duidelijk lager en nagenoeg gelijk, de Maas evenwel meestal iets hoger. Dit komt overeen met de gegevens van het RIZA monitoringsprogramma (voor 2000 tot medio oktober: Rijn: 2.8 ± 0.8 (n=20), Maas (bij Eijsden): 3.5 ± 0.9 (n=41)). Tenslotte de Springendalse Beek als laagste DOC gehalten (0.9-1.9 mg/L).

De DOC resultaten zijn voor de zes locaties van Fase II als functie van de vier seizoenen weergegeven in Figuur 6.12a. In het algemeen is er weinig temporele variatie in de DOC concentraties, behalve voor het water uit de Beemster Middensloot.

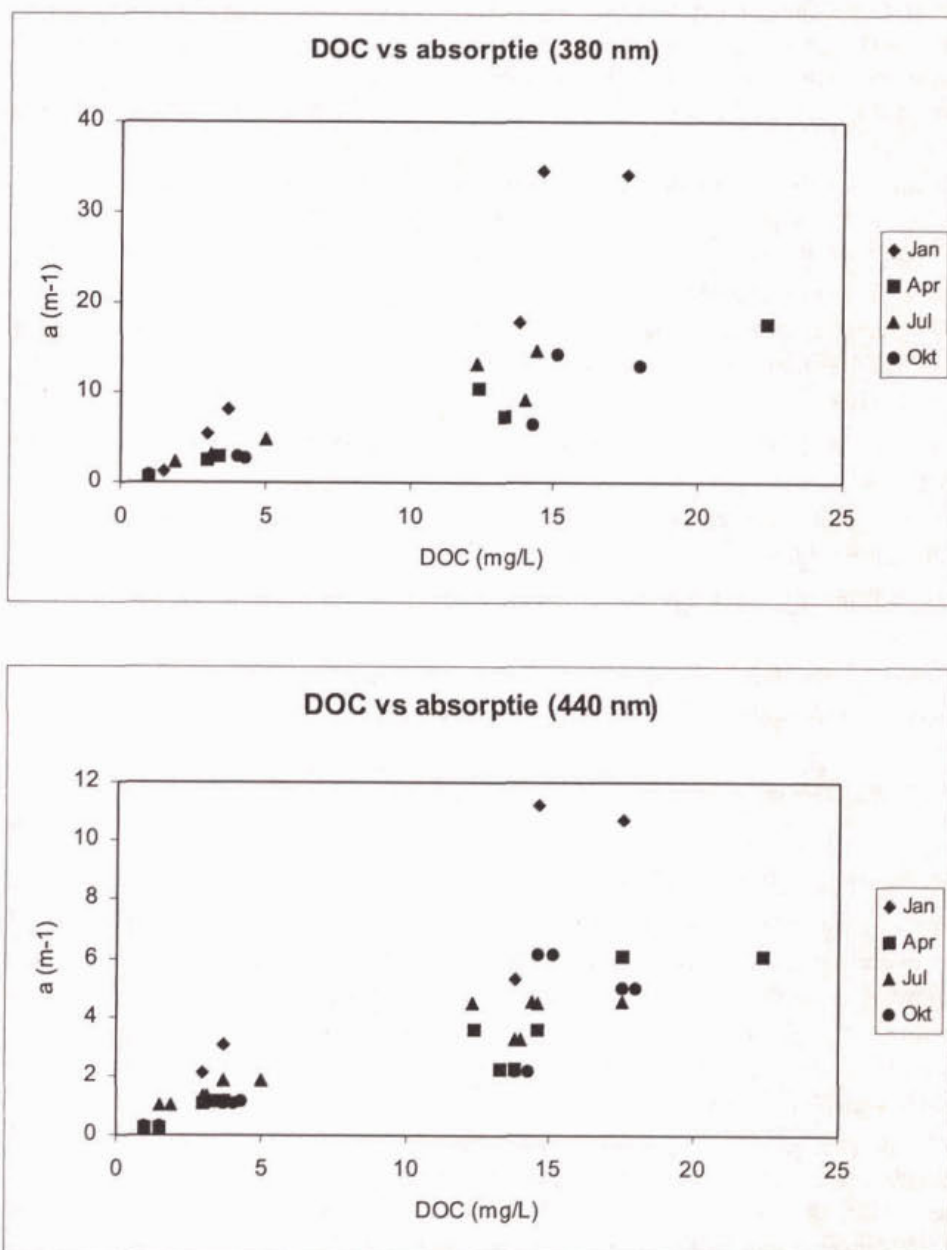
Figuur 6.12. DOC en 48h EC50 *Daphnia* (beweeglijkheid) als functie van de seizoensvariatie voor de 6 locaties in Fase II



Figuur 6.12. vervolg. Absorptie (bij 380 en 440 nm) als functie van de seizoensvariatie voor de 6 locaties in Fase II



Figuur 6.13. Relatie tussen DOC en de absorptie (bij 380 en 440 nm) voor de 6 locaties en de 4 seizoenen van Fase II.



De resultaten voor de absorptiemetingen laten een vergelijkbaar patroon zien voor beide golflengten (380 en 440 nm). Als voorbeeld, voor de absorptie bij 380 nm zijn Beemster en Beneden Regge vrijwel gelijk en relatief hoog, Vinkeveense Plassen is gemiddeld, Maas en Rijn ongeveer gelijk en laag, met de Springendalse Beek daar nog weer onder. Voor deze parameters zijn er waarnemingen voor alle vier seizoenen. Opmerkelijk is de hogere waarden (voor alle locaties) voor de bemonstering in januari (Tabel 6.9a-d, Figuur 6.12c,d). Opmerkelijk zijn de verhoogde waarden voor de monsters genomen in januari; met name de resultaten voor de Beemster en Vinkeveen water springen er uit.

Wordt de absorptie uitgezet tegen DOC dan blijkt een lineair verband, dat beter wordt als de januari metingen, met name de genoemde twee resultaten, niet worden meegenomen (Figuur 6.13a,b).

De trend bij de algemene chemische karakterisering van de wateren is, dat de Beemster Middensloot hoge concentraties heeft voor een groot aantal variabelen: K, Mg, Ca, Cl, HCO₃, SO₄, Si en Mn, en dus ook in de geleidbaarheid van het water. Het Vinkeveen water is hoog voor Cl en SO₄ (en geleidbaarheid). Als verwacht, is de Springendalse Beek laag voor veel variabelen: Na, K, Mg, Ca, Cl, SO₄ en zeer laag in HCO₃ (10-30 keer lager dan de andere wateren). Uiteraard is dan ook de geleidbaarheid laag. Deze beek is opmerkelijk hoog in NO₃. De Beneden Regge is beduidend hoger in opgelost Fe en Mn.

De *in situ* pH (Annex 7) is duidelijk lager voor het slecht gebufferde Springendalse Beek water (pH 6.2-6.8), de meeste wateren zijn ronde pH 8, waar de Beneden Regge wat lager is (pH 7.2-7.6) en de Vinkeveense Plassenwater juist weer relatief hoog (pH 8.2-8.4) voor de vier seizoenen.

Alkaliniteit geeft als volgorde: Beemster >> Vinkeveen > Regge > Rijn = Maas > Springendalse Beek. De beek is extreem laag in alkaliniteit (meer dan 10x lager dan de Maas of Rijn. Geleidbaarheid tenslotte, geeft laat zien dat Beemster > Vinkeveen > Regge = Maas = Rijn > Springendalse Beek.

Samenvattend kan gesteld worden dat er binnen de beperkte set wateren drie 'soorten' zijn te onderscheiden:

- Beemster, Vinkeveen en Beneden Regge, met hoge concentraties DOC (maar verschillen in alkaliniteit/hardheid),
- Maas en Rijn, vergelijkbaar, met gemiddelde concentraties concentraties DOC, alkaliniteit/hardheid en pH,
- de Springendalse Beek met voor vrijwel alle parameters (inclusief pH, DOC, alkaliniteit) veruit de laagste concentraties (alleen Si en NO₃ zijn verhoogd).

6.3.2 *Biologische parameters*

- *Daphnia*, 48h EC50 (beweeglijkheid)

Hieronder volgt in Tabel 6.10 een samenvatting van de ecotoxicologische resultaten van Fase II, die dient ter ondersteuning van de discussie. Een meer gedetailleerd verslag van de resultaten van de toxicologische toetsen is opgenomen in Annex 3-6. Voor een volledige rapportage van deze toetsen zie Hoofman *et al.* (2000a,b,c,d). De pH (*in situ* en tijdens de toetsen) is weergegeven in Annex 7. Zowel de pH als de zuurstof en temperatuur bleven tijdens de toxiciteitstoetsen binnen de voor de toets geldende randvoorwaarden.

De 48h EC50, *Daphnia* (beweeglijkheid) resultaten (Tabel 6.10) zijn voor de 4 seizoenen en voor de 6 bemonsterde locaties en voor DSW grafisch weergegeven in Figuur 6.12b. Hoogste EC50's zijn gevonden voor de Beemster Middensloot (range 308-430 µg Cu/L), daaronder met elkaar vergelijkbaar de Beneden Regge en Vinkeveense Plassen (resp. > 180-354 en 151-322 µg Cu/L). Ook Maas en Rijn zijn nagenoeg gelijk (resp. 71-124 en 69-104 µg Cu/L), tenslotte de Springendalse Beek als laagste (8-14 µg Cu/L), lager nog dan het DSW (21-40 µg Cu/L).

Laagste EC50 waarden zijn over het algemeen gevonden in april, maar de EC50 waarden voor de Beemster Middensloot en voor de Beneden Regge vielen toen buiten het meetbereik van de toxiciteitstoets en zijn derhalve ondergrenzen (respectievelijk gegeven als > 320 en > 180 µg Cu/L). In juli worden de hoogste waarden bereikt (de Beneden Regge is in oktober nog hoger). Grootste variaties treden op bij de wateren met de hoogst gevonden EC50's. De zeer lage EC50 die voor alle vier seizoenen is gevonden voor de Springendalse Beek is opmerkelijk, aangezien die nog lager ligt dan het DSW wat vrij is van organische stof.

Tabel 6.10. Resultaten van de toxiciteitsexperimenten uitgevoerd in Fase II voor de 6 locaties en DSW (in µg Cu/L).

Locatie	Periode	24h EC50 beweeglijkheid	48h EC50 beweeglijkheid	48h NOEC beweeglijkheid	48h NOEC conditie
Beemster	jan	464	314	180	100
Middensloot	apr	> 320	> 320	320	180
	jul	632	430	180	180
	okt	512	308	100	180
Vinkeveense Plassen	jan	473	207	100	56
	apr	427	151	56	56
	jul	526	322	180	100
	okt	512	220	100	100
Beneden Regge	jan	371	304	180	180
	apr	> 180	> 180	180	100
	jul	488	292	180	180
	okt	489	354	180	180
Springendalse Beek	jan	< 10	< 10	< 10	< 10
	apr	15	9.2	3.2	1.8
	jul	27	14	10	5.6
	okt	11	7.7	1.8	1.8
Rijn	jan	112	87	56	56
	apr	102	69	32	32
	jul	158	99	56	56
	okt	133	104	56	56
Maas	jan	118	93	56	56
	apr	88	71	32	32
	jul	154	124	56	56
	okt	135	109	56	56
DSW	jan	56	40	18	5.6
	apr	48	34	10	10
	jul	82	25	10	10
	okt	46	21	5.6	5.6

• *Analyses voor Cu-daphnia*

Een samenvatting van de resultaten voor het interne kopergehalte in de *Daphnia*'s (Cu-daphnia) die aan het einde van de toxicologische experimenten in Fase II zijn verkregen staat in Tabel 6.11 (voor een volledige set gegevens zie Annex 9). De concentraties zijn vermeld op basis van droog-gewicht (d.w.). De Cu-daphnia, of wel de 'critical body residue' (CBR) is gepresenteerd als range van blootstellingniveaus rondom het mediane effect-niveau (EC50). De range van de CBR genomen over alle seizoenen en locaties bedraagt ruwweg 100-400 mg/kg

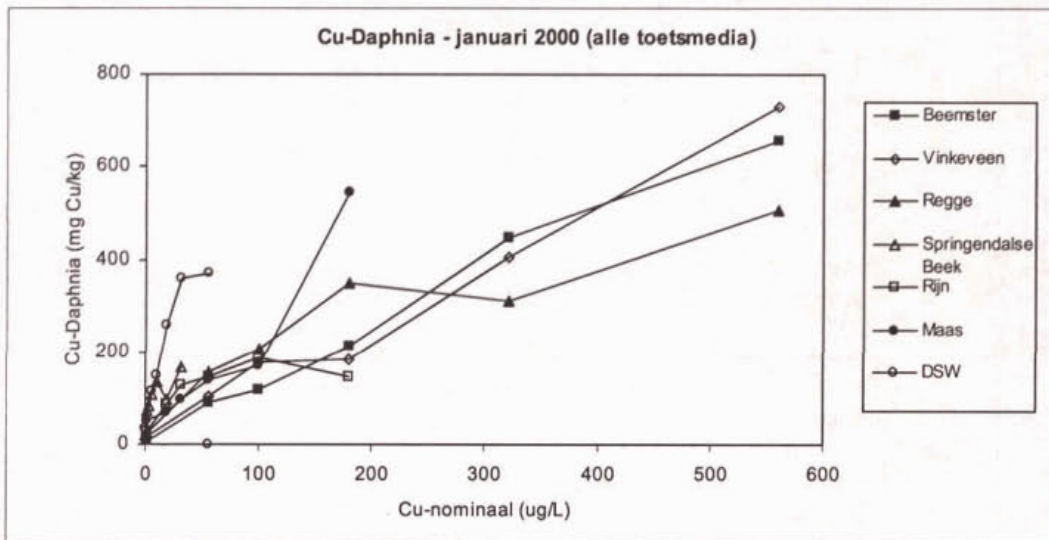
Tabel 6.11. 'Critical body residues' bij externe blootstellingniveaus rondom de waargenomen mediane effectniveaus (EC50). De schijnbare 48h-BCF is gegeven bij niveaus nabij de NOEC, of als laagste Cu dosering als gemiddelde \pm SD

Locatie / periode	DOC mg/L	48h EC50 μ g/L	CBR		BCF	
			Cu- nominaal*) μ g/L	Cu-daphnia range *) mg/kg d.w.	Cu- nominaal μ g/L	48h-BCF **) L/kg
januari						
Beemster	17.3	314	180-320	213-447	56-100	1415 \pm 325
Vinkeveen	14.2	207	180-320	179-184	56-100	1828 \pm 49
Regge	14.7	304	180-320	350-309	56-100	2430 \pm 527
Rijn	5.0	87	56-100	147-180	18-32	4430 \pm 591
Maas	5.3	93	56-100	140-170	18-32	3425 \pm 526
DSW	0.2	40	32-56	360-371	5.6-10	17808 \pm 3699
april						
Beemster	21.6	> 320	180-320	168-280	180	931
Vinkeveen	13.3	151	100-180	129-212	100	1293
Regge	12.4	> 180	100-180	171-308	100	1706
Springendalse Beek	2.4	9.2	5.6-10	107-138	3.2	19776
Rijn	3.5	69	56-100	311-248	56	5557
Maas	4.0	71	56-100	316-260	56	5645
juli						
Beemster	14.4	430	56-320	103-433	56	1849
Vinkeveen	14.0	322	56-320	193-403	56	3448
Regge	12.3	292	56-320	134-200	56	2399
Springendalse Beek	1.9	14.3	10-18	138-99	1.8-3.2	33405 \pm 9899
Rijn	3.1	99	56-100	234-260	56	4180
Maas	5.0	124	56-100	193-282	56	3454
DSW	0.1	25	18-56	185-412	18	10329
oktober						
Beemster	18.0	308	56-320	110-301	56	1971
Vinkeveen	14.3	220	56-320	145-494	56	2583
Regge	15.1	354	56-320	147-386	56	2619
Springendalse Beek	0.9	7.7	3.2-18	115-119	1.8	52716
Rijn	4.3	104	56-100	192-220	56	3425
Maas	4.1	109	56-100	277-233	56	4948
DSW	0.1	21	18-56	237-135	18	13161

In Figuur 6.14 is de opname van Cu in de watervlooiën (Cu-daphnia) voor alle locaties weergegeven voor de maand januari (de Springendalse Beek is evenwel voor juli). Vergelijkbaar met Fase I nemen de interne concentraties in de meeste gevallen toe met oplopende dosering vanaf een startniveau van ca. 5-50 mg/kg. De sterkste accumulatie vindt plaats in de behandelingen met DSW en water uit de Springendalse Beek, met DOC gehalten van respectievelijk < 0.1 en 1.9 mg/L. De laagste opname bij een externe blootstellingconcentratie van 10-100 μ g Cu/L (dus in het gebied van de NOECs) vindt plaats in de behandelingen met water uit de Beemster Middensloot, waar ook de hoogste DOC gehalten zijn gemeten (17.3 mg/L). De overige locaties nemen een intermediaire positie in. Voor de andere perioden dan januari zijn steeds slechts enkele Cu-daphnia resultaten per locatie geanalyseerd; een vergelijkbaar beeld komt naar voren.

Op alle locaties en voor nagenoeg alle perioden is de Cu-daphnia ook in de natuurlijke watermonsters bepaald, dus in de expositiemedia zonder Cu-additie. In Figuur 6.15 is de trend in de tijd weergegeven. Voor de meeste wateren bestaat een vrij constant opnameniveau, maar tussen de wateren blijken verschillen: de laagste Cu-daphnia is voor de Beemster, dan de Beneden Regge, Vinkeveense Plassen, alle drie met een hoge concentratie DOC. De Rijn loopt vrijwel gelijk aan het Vinkeveen water, behalve in oktober waar de interne koperconcentratie voor de watervlooiën uit het Rijnwater veel hoger is (in oktober is overigens geen abnormaal hoge Cu-totaal(F) gevonden). Ook de Maas vertoont hoge interne concentraties, met tevens een grote variatie in de tijd. Beide grote rivieren hebben de hoogste Cu-totaal(F) concentraties, doch er is geen fraaie relatie met de Cu-daphnia. De Springendalse Beek en ook DSW laten een relatief hoge Cu-daphnia zien.

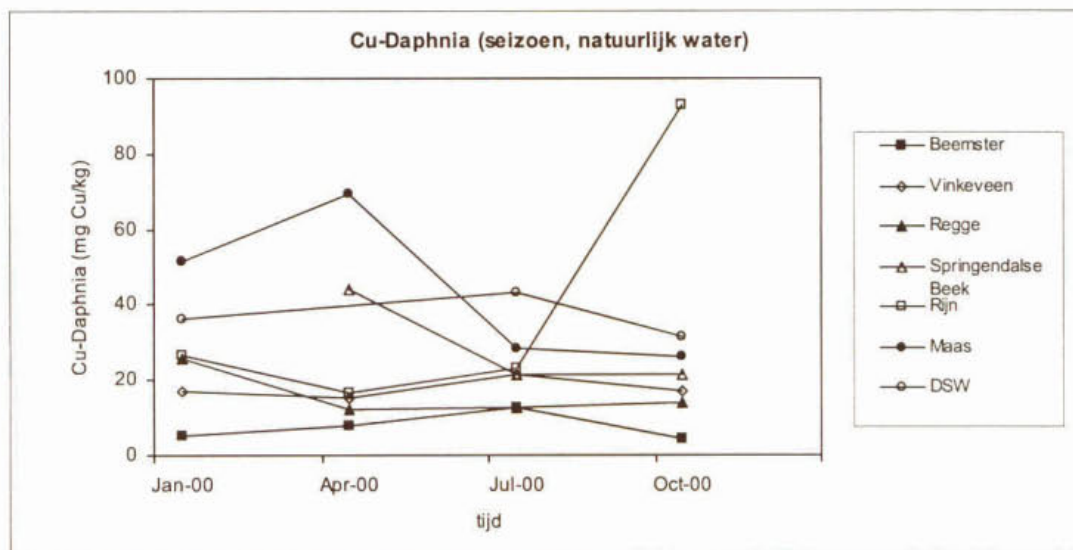
Figuur 6.14. Relatie BCF-Daphnia vs. de Cu-concentratie (nominaal) in water van alle locaties van Fase II in januari 2000 (Springendalse beek in juli).



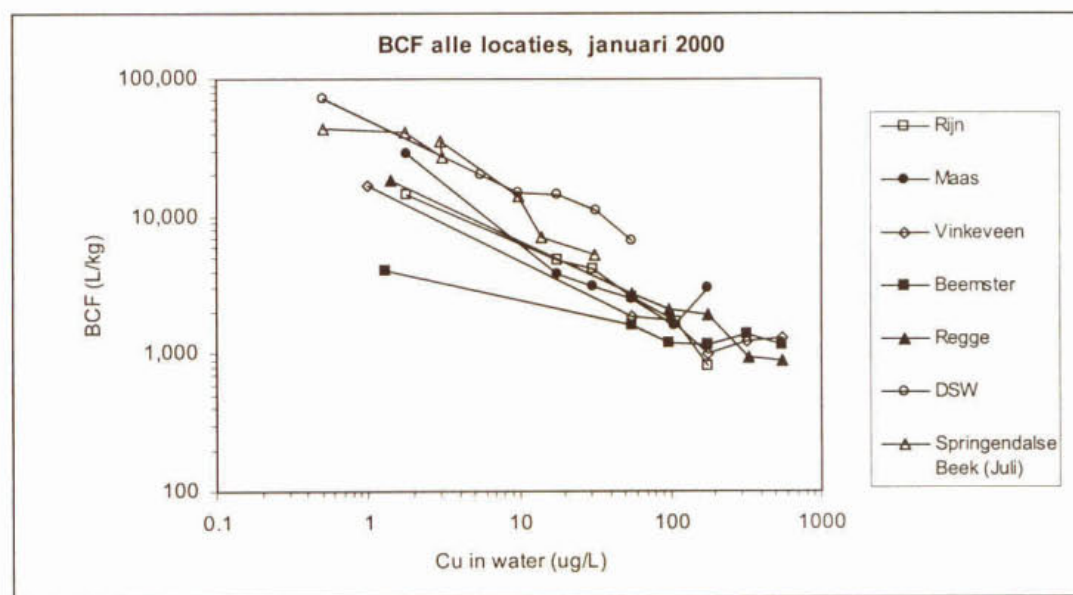
Analoog aan Fase I, is voor het vergelijken van de 48h-BCF waarden tussen de verschillende wateren en locaties gekozen voor de doseringsniveaus nabij de NOEC. De aldus bepaalde 48h-(schijnbare) BCFs zijn samengevat in Tabel 6.11. De BCFs zijn individuele waarden of gemiddelden \pm standaard afwijking over aangegeven nominale concentraties.

De berekende (schijnbare) 48h BCF waarden, gebaseerd op gemeten (eventueel geïnterpoleerde) waterconcentraties zijn weergegeven in Figuur 6.16. De BCFs vertonen een afnemende trend, met een grote variatie tussen de locaties bij de lage doseringsniveaus en een convergerende trend bij de hogere blootstellingconcentraties (vergelijkbaar als tijdens de Fase I experimenten). Voor de wateren met laag DOC niveau (DSW en Springendalse Beek) blijkt een hogere BCF dan de overige media. De laagste BCF waarden worden gevonden voor de Beemster Middensloot, Regge en Vinkeveen water. Op deze locatie lijkt de invloed van het seizoen beperkt, zoals te zien is in Figuur 6.17b.

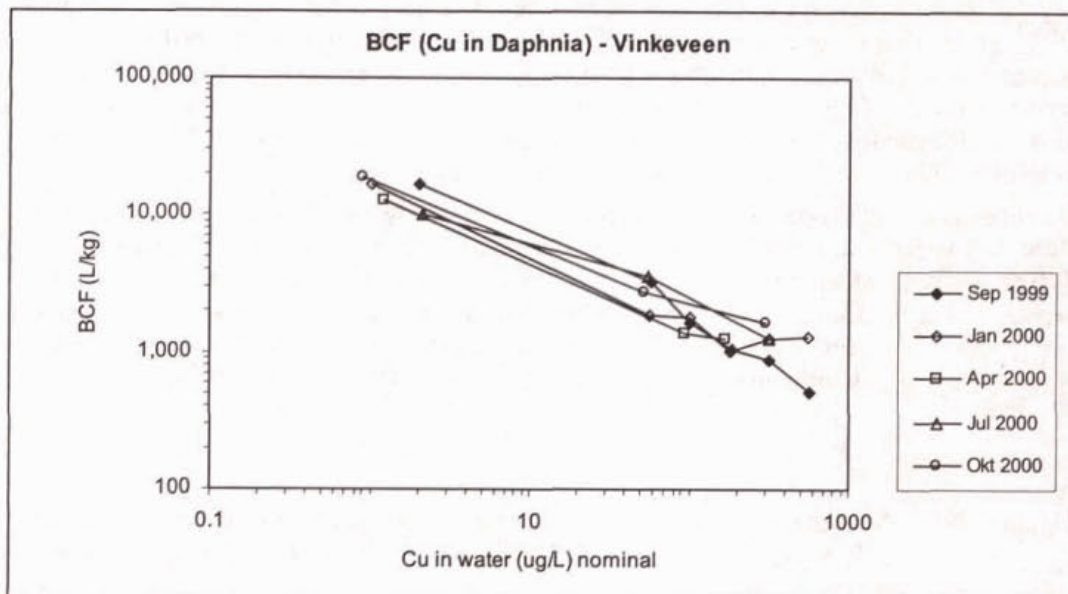
Figuur 6.15. Interne Cu-daphnia als functie van de seizoenen van Fase II. Alleen de interne concentraties voor organismen uit niet Cu-verrijkte (natuurlijke) monsters zijn uitgezet.



Figuur 6.16. Relatie BCF-Daphnia vs. de Cu-concentratie (nominaal) in water van alle locaties van Fase II in januari 2000 (Springendalse beek in juli).



Figuur 6.17. Relatie BCF-Daphnia vs. de Cu-concentratie (nominaal) in Vinkeveen water voor alle perioden van Fase I en II.



6.4 Speciatie-berekeningen

Het resultaat voor de speciatie-berekeningen voor vrij koper (Cu^{2+}), uitgevoerd voor alle zes locaties (en DSW) en de vier perioden is weergegeven in Tabel 6.12. In de tabel zijn zowel de resultaten gepresenteerd voor de natuurlijke wateren (dus water zonder Cu-toevoeging) als voor de dezelfde wateren waaraan (alleen) koper is toegevoegd (in een hoeveelheid gelijk aan de EC50 waarde). De resultaten van de berekende koper-species zijn voor de januari periode weergegeven in Annex 11 en 12.

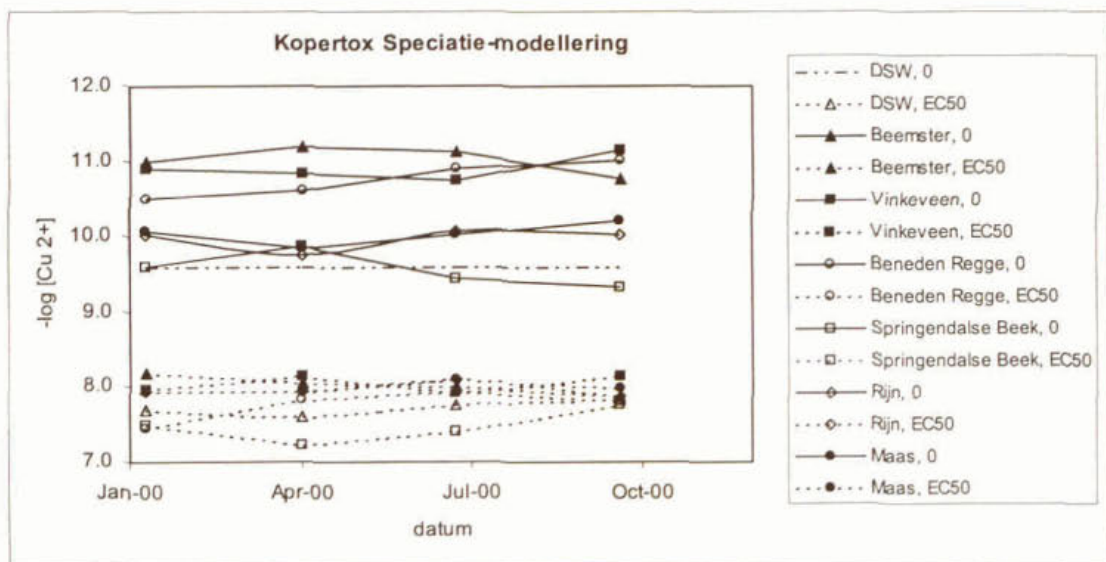
Tabel 6.12. Berekende concentratie vrij koper (Cu^{2+} in M) in DSW en de onderzochte wateren (zie Annex 11 en 12 voor de totale species-verdeling voor koper).

	DSW	Beemster	Vinkeveen	Beneden Regge	Springendalse Beek	Rijn	Maas
	[M]	[M]	[M]	[M]	[M]	[M]	[M]
0-additie							
Jan-2000	24.7E-11	1.02E-11	1.23E-11	3.16E-11	25.5E-11	9.36E-11	8.34E-11
Apr-2000	24.7E-11	0.63E-11	1.43E-11	2.41E-11	13.7E-11	17.2E-11	14.5E-11
Jul-2000	24.7E-11	0.74E-11	1.83E-11	1.26E-11	35.8E-11	8.29E-11	9.62E-11
Okt-2000	24.7E-11	1.73E-11	0.73E-11	0.99E-11	45.9E-11	9.33E-11	6.18E-11
Cu-additie (bij EC50)							
Jan-2000	1.98E-08	0.66E-08	1.08E-08	3.58E-08	3.21E-08	1.17E-08	1.15E-08
Apr-2000	2.43E-08	0.88E-08	0.71E-08	1.45E-08	5.99E-08	1.12E-08	1.12E-08
Jul-2000	1.77E-08	1.00E-08	1.22E-08	1.12E-08	3.96E-08	0.81E-08	0.81E-08
Okt-2000	1.51E-08	1.36E-08	0.72E-08	1.55E-08	1.69E-08	1.34E-08	1.02E-08

De verdeling van de verschillende koperspecies is voor de natuurlijke wateren behalve de Springendalse Beek, redelijk gelijk (zie Annex 11). De grootste koper fractie is het Cu(2L)-complex, gevolgd door Cu(5L) en CuCO₃. Voor de Springendalse Beek is het Cu(2L)-complex met meer dan 80 % veruit de belangrijkste species. Doordat vrijwel alle componenten in het water een lage concentratie hebben, is er bijvoorbeeld geen complexering aan carbonaten. Wel is er een additioneel species aanwezig, CuSO₄, die in de andere wateren van geen belang is. Doordat ook de DOC laag is (dus ook de liganden 1L - 5L) blijkt er na maximale complexering nog ca. 4.5 % van het totaal koper over als vrij koper, veel meer dan voor de andere wateren.

De concentratie vrij-koper [Cu²⁺] is berekend voor de verschillende natuurlijke wateren en DSW. Deze 'vrij-koper' concentratie is als functie van het seizoen weergegeven in Figuur 6.18 (getrokken lijnen). De verschillen tussen de wateren zijn evident. Laagste vrij-koperconcentraties worden berekend voor de Beemster, Vinkeveen en beneden Regge ($1-2 \times 10^{-11}$ M), iets minder dan een orde van grootte hoger zijn de concentraties in de Rijn en Maas (ca. 10^{-10} M), en veruit de hoogste vrij-koperconcentraties komen voor in de Springendalse Beek en DSW (ca. 3×10^{-10} M).

Figuur 6.18. Resultaten van de speciatie-modellering uitgevoerd bij de natuurlijke Cu-concentraties (getrokken lijnen) en de Cu-concentraties bij 48h-EC50 Daphnia (gestippelde lijnen).



De concentratie vrij-koper [Cu²⁺] is tevens berekend voor de verschillende toetsmedia en DSW, waar voor de totaal koperconcentratie de respectievelijke EC50 waarden zijn genomen. De 'vrij-koper' concentratie is als functie van het seizoen weergegeven in Figuur 6.18 (gestippelde lijnen). Zowel de seizoensvariaties als de variaties tussen de media zijn beperkt. In tegenstelling tot de natuurlijke wateren liggen de vrij-koperconcentraties voor de media op basis van water uit de Beemster, Regge (niet voor januari), Vinkeveen, Rijn en Maas op hetzelfde niveau (ca. 10^{-8} M). Alleen DSW en de Springendalse Beek hebben een duidelijk hogere concentratie vrij koper.

De resultaten van de speciatieberekeningen naar de invloed van de pH op de pCu in de Springendalse Beek worden gegeven in Tabel 6.13. De berekeningen zijn uitgevoerd voor natuurlijk water en bij een koper-concentratie nabij de EC50. Voor iedere periode en koperbelasting is als invoer voor de berekeningen de pH genomen a) zoals gemeten tijdens de toxiciteitstoetsen, b) zoals gemeten tijdens de monsternamen (*in situ*), c) gesimuleerd bij pH 6, 7 en 8. In de tabel is tevens opgenomen de fractie van vrij koper (Cu²⁺) ten opzichte van het Cu-totaal. Er blijkt dat de seizoensvariaties gering zijn, maar dat er aanzienlijke verschillen kunnen bestaan tussen de wateren. Met name de Springendalse Beek heeft steeds een hoge concentratie Cu²⁺.

Voor de periode januari zijn de speciatie-berekeningen bij verschillende pH waarden voor alle 6 locaties gegeven in Tabel 6.14. De berekeningen zijn uitgevoerd voor water zonder Cu-additie. De invoer van de pH is steeds als hierboven gedefinieerd. In de tabel is tevens opgenomen de fractie van vrij koper (Cu^{2+}) ten opzichte van het Cu-totaal. Het is duidelijk dat er bij lage pH - dus een hogere $[\text{H}^+]$ - door competitie met het proton meer vrij-koper beschikbaar is.

Tabel 6.13. Berekende concentratie vrij koper (Cu^{2+} in M) voor de Springendalse Beek (4 perioden, natuurlijk water en Cu-concentratie nabij de EC50) als functie van de pH (invoer pH als gemeten in de toxiciteitstoets, de in situ waarneming tijdens de monstername, en een set gesimuleerde waarden (pH 6, 7, 8)

	toets		<i>in situ</i>		pH=6	pH=7	pH=8
	pH	[M]	pH	[M]	[M]	[M]	[M]
0-additie							
Jan-2000	7.3	2.55E-10	6.2	20.7E-10	2.67E-09	4.90E-10	0.49E-10
Apr-2000	7.1	1.37E-10	6.5	3.50E-10	5.63E-10	1.65E-10	0.19E-10
Jul-2000	7.6	3.58E-10	6.8	18.5E-10	49.1E-10	1.27E-10	1.37E-10
Okt-2000	7.8	4.59E-10	6.5	51.3E-10	59.4E-10	22.3E-10	2.84E-10
Cu-additie (bij EC50)							
Jan-2000	7.3	3.21E-08	6.2	10.4E-08	11.3E-08	5.20E-08	0.66E-08
Apr-2000	7.1	5.99E-08	6.5	10.2E-08	12.3E-08	6.79E-08	1.09E-08
Jul-2000	7.6	3.96E-08	6.8	12.9E-08	19.0E-08	10.4E-08	1.64E-08
Okt-2000	7.8	1.69E-08	6.5	9.59E-08	11.0E-08	6.37E-08	1.08E-08
Fractie vrij koper		%			%	%	%
0-additie							
Jan-2000		4.50		36.6	47.1	8.65	0.86
Apr-2000		17.4		44.5	71.5	21.0	2.38
Jul-2000		4.55		23.5	62.4	16.2	1.74
Okt-2000		5.84		65.1	75.4	28.4	3.61
Cu-additie (bij EC50)							
Jan-2000		19.7		63.6	69.1	31.9	4.04
Apr-2000		41.0		70.1	84.1	46.5	7.45
Jul-2000		17.0		55.4	81.5	44.6	7.03
Okt-2000		13.1		74.4	84.9	49.4	8.40

Tabel 6.14. Berekende concentratie vrij koper (Cu^{2+} in M) voor de 6 locaties (januari, natuurlijk water) als functie van de pH.

0-additie	toets pH		<i>in situ</i> pH		pH=6	pH=7	pH=8
	pH	[M Cu^{2+}]	pH	[M Cu^{2+}]	[M]	[M]	[M]
Beemster	8.5	1.02E-11	8.0	3.92E-11	400E-11	45.3E-11	4.02E-11
Vinkeveen	8.5	1.23E-11	8.4	1.23E-11	360E-11	44.1E-11	4.08E-11
Beneden Regge	8.2	3.16E-11	7.2	40.6E-11	474E-11	57.3E-11	5.29E-11
Springendalse Beek	6.7	25.5E-11	6.2	207.E-11	267E-11	49.0E-11	4.87E-11
Rijn	8.3	9.36E-11	7.7	37.9E-11	1220E-11	194E-11	18.0E-11
Maas	8.3	8.34E-11	7.7	33.5E-11	1130E-11	171E-11	16.0E-11
Fractie vrij koper		%		%	%	%	%
Beemster		0.05		0.20	20.3	2.30	0.20
Vinkeveen		0.08		0.08	23.5	2.89	0.27
Beneden Regge		0.14		1.80	21.1	2.55	0.23
Springendalse Beek		4.50		36.6	47.1	8.65	0.86
Rijn		0.33		1.34	43.2	6.84	0.64
Maas		0.29		1.17	39.5	5.96	0.56

7 DISCUSSIE

7.1 Koperanalyses

7.1.1 *Cu-nominaal, Cu-totaal(F), Cu-totaal(NF)*

De resultaten voor Cu-totaal (F, NF) in Fase II (in de Tabel 7.1) sluiten aan bij die van de monitoring-programma's van de waterbeheerders.

Tabel 7.1. Vergelijking van de Cu-concentraties met gegevens uit de monitoring-programma's van de waterbeheerders, in $\mu\text{g Cu/L}$.

	deze studie (2000)			beheerder			
	gem.	SD	n	gem.	SD	n	jaar
<i>Cu-totaal(NF)</i>							
Beemster Middensloot	2.4	1.0	4	2.1	0.9	9	2000
Vinkeveense Plassen	1.1	0.1	4	< 2.1	0.1	23	1995
Beneden Regge	2.2	0.9	4	2.7	0.7	5	1999 ¹⁾
Springendalse Beek	1.6	1.4	4	1.3	0.6	11	1998
Rijn	3.2	0.8	4	4.3	2.3	20	2000
Maas	2.9	0.7	4	4.9	2.2	40	2000 ²⁾
<i>Cu-totaal(F)</i>							
Rijn	1.9	0.2	4	2.2	0.4	20	2000
Maas	2.3	0.8	4	2.0	0.9	40	2000 ²⁾

¹⁾ meetwaarde van 83 $\mu\text{g Cu/L}$ (extreme afvoer) niet verwerkt

²⁾ RIZA meetstation Eijsden

Het is in de meeste monitoringprogramma's gebruikelijk dat voor de spoormetalen slechts het niet-gefiltreerde monster wordt gemeten; Rijkswaterstaat (RIZA) meet evenwel zowel opgelost als totaal gehalten. Voor de biologische beschikbaarheid is met name de opgeloste (dus gefiltreerde) fractie van belang. De Cu-totaal(F) blijkt redelijk constant in de tijd, met de hoogste concentraties in Rijn en Maas, en de laagste in de Springendalse Beek (Figuur 6.9a).

In vrijwel alle gevallen is de gefiltreerde concentratie kleiner dan de niet-gefiltreerde (Tabellen 6.9a-d). De discrepantie komt met name voor bij de wateren met de laagste concentraties (Springendalse Beek, Vinkeveense Plassen), waar de concentraties nabij of lager zijn dan de bepalingsgrens (LOQ) van de gebruikte methoden (zie ook sectie 5.3). Ook uit de herhaalbaarheidsstudies (analyse van replica's) blijkt dat de variatiecoëfficiënten (CV) van de gefiltreerde monsters (Cu-totaal(F)) veel minder reproduceerbaar zijn dan voor de analyses uit Fase I waar hoge (toegevoegde) koperconcentraties aanwezig waren (Tabellen 6.5 en 6.9a-d). De grens van de gebruikte analyse-methode is hier nagenoeg bereikt.

Er zijn analysemethoden beschikbaar die een (beduidend) lagere detectiegrens hebben (na voorconcentreren), maar die hebben een beduidend hogere kostprijs (ook door de noodzakelijke 'clean room' faciliteiten) en worden derhalve niet vaak toegepast, ook niet bij de waterbeheerders.

Contaminatie met Cu van de watermonsters als gevolg van de gebruikte methode van bemonsteren/-filtreren van de 15 liter bulk-monsters is niet aangetoond. De analyseresultaten van de controle monsters (in 100 mL potjes) zijn - gezien de bepalingsgrens van de methode - niet wezenlijk verschillend van de standaard bulk-monsters (Tabellen 6.9b,c).

7.1.2 Cu-DGT

De Cu-DGT gemeten in Fase I (Tabel 6.3) is beduidend lager dan de Cu-totaal(F): ca 40 %. De CV van drievoudige analyses is echter hoger, en is verre van constant. Extra handelingen (ten opzichte van Cu-totaal(F) analyses) brengen uiteraard een stijging van de variatie met zich mee. De range is over het algemeen 10-15 %, maar uitschieters naar beneden (1.9 %) en naar boven (35 %) komen voor. Denney *et al.* (1999) rapporteren een herhaalbaarheid van ongeveer 11 %. Men moet evenwel bedenken dat dit de eerste ervaring is met de DGT-methode, en dat die nog niet routinematig wordt aangewend.

Er bestaat voor iedere verdunning een lineair verband tussen Cu-DGT en Cu-totaal(F). Interessant is dat de helling afneemt met toenemend gehalte aan Vinkeveenwater (Figuur 6.3a). Dit komt overeen met de hypothese dat er bij afname van organisch materiaal meer 'vrij' of DGT-beschikbaar koper aanwezig is. Echter, ook het humus-loze water (0 % Vinkeveenwater, DSW) ligt niet op precies op de 1:1 lijn. Wordt de fractie Cu-DGT/Cu-totaal(F) uit gezet tegen Cu-totaal(F) (Figuur 6.3b), dan blijkt dat bij 0 % Vinkeveenwater er een snelle toename is bij het toevoegen van Cu: het DGT beschikbare Cu neemt toe met de Cu-addities (maar de ratio is in geen van de gevallen 1). Hoe meer 'humus' beschikbaar is, des te lager blijft de ratio, totdat bij 100 % Vinkeveenwater er nauwelijks van enig toename sprake is. De ratio blijft de hele range van Cu-totaal(F) (56-560 µg Cu/L) nagenoeg constant (40-45 %). Dit lijkt er op te duiden dat er (in 100 %, maar ook reeds bij 50 % en 75 % Vinkeveenwater) een continue DGT-beschikbare fractie is, maar ook dat er een grote pool liganden beschikbaar is om Cu te binden in een vorm die door de DGT-gel wordt tegengehouden.

De DGT-respons is in de meeste verdunningen redelijk constant, behalve voor de 0 % Vinkeveenwater. Voor dit DSW is er een grotere variatie (24-79 % van Cu-totaal). De hoge percentages komen in de richting van de verwachting, immers er zijn geen organische complexen aanwezig. Mogelijk is de discrepantie het gevolg van een analytisch artefact (mede gezien de hoge variatiecoëfficiënten voor met name de lagere Cu-concentraties (Tabel 6.3)).

Voor Fase II is alleen de Cu-DGT in het oorspronkelijke, dus niet met koper verrijkte, watermonster gemeten (Tabel 6.9a-d). Zowel de verschillen tussen de wateren als de seizoensvariatie is niet groot, met een lichte toename in oktober (Figuur 6.9c). Cu-DGT is voor deze wateren 5-50% van Cu-totaal(F), oplopend tot 40-100% in oktober. Deze oktober waarden zijn vergelijkbaar met Denney *et al.* (1999) die voor twee Australische rivieren ca. 90 % rapporteren. De conclusie was dat dit een indicatie was voor het niet aanwezig zijn van sterke (grote) complexen en colloïden. Voor twee andere rivieren werd een ratio van 25-50 % gevonden.

Eén van de problemen van de Fase II metingen is, dat 11 van de 24 Cu-DGT waarnemingen beneden de detectiegrens van 0.2 µg/L liggen, de rest ligt hier niet ver vanaf. Hoewel in de techniek een concentratiestap zit (door de expositie in het water van 22 uur), blijkt er dermate weinig door de DGT-gel te diffunderen, dat er dus ook relatief weinig wordt geaccumuleerd in de achterliggende Chelex. De herhaalbaarheid is dan ook niet hoog, en de betrouwbaarheid in de resultaten navenant lager dan voor de Cu-totaal waarnemingen. Een oplossing voor het probleem is om een analyse-methode te gebruiken die een lagere detectiegrens heeft voor Cu. Denney *et al.* (1999) benadrukken dat dit noodzakelijk is om een goede (11 % CV) herhaalbaarheid te verkrijgen. Ook kan de expositietijd worden verlengd (in de laboratoriumopstelling moet daarvoor eventueel het volume van het bulk-water worden vergroot). Een ander probleem is daarmee nog niet verholpen. De koper blanco van de DGT-cellen is in deze studie niet altijd voldoende laag gebleken, wat extra bijdraagt aan de onzekerheid van het resultaat.

Door de zeer lage concentraties (vaak < LOD) van de DGT-fractie in de natuurlijke monsters is een interpretatie van de 'biologisch beschikbare Cu-fractie', zoals uitgevoerd voor Fase I, in Fase II helaas niet mogelijk. Mede hierdoor is de evaluatie van Cu-DGT vs DOC weinig zinvol.

Hoewel de techniek zeker mogelijkheden heeft, ook door directe toepassing in het veld, is duidelijk dat de DGT-methode nader moet worden onderzocht, waarbij bij de analyse rekening moet worden gehouden met lage opbrengsten. De techniek zal moeten worden geoptimaliseerd voordat ze in een routinematig onderzoek kan worden toegepast.

7.1.3 *Cu-Chelex*

De Cu-Chelex is in de verdunningsreeks van Fase I slechts marginaal lager dan de Cu-totaal(F), ca 80-90 % (Tabel 6.3). Dit is belangrijk hoger dan verwacht; in de literatuur wordt gesproken van 30-40 %. Blijkbaar bevat het Vinkeveen water weinig liganden met een hogere bindingscapaciteit voor Cu dan Chelex-100. De CVs liggen licht hoger dan die voor Cu-totaal(F), maar behoudens een uitschieter zijn ze allemaal ca 7 %. Blijkbaar draagt de handeling van de scheiding weinig bij aan de variatie.

Er blijkt geen duidelijk verschil te zijn voor de verschillende verdunningen voor het verband Cu-Chelex vs Cu-totaal(F) (Figuur 6.2a); echter, in de grafische presentatie voor de ratio Cu-Chelex/Cu-totaal(F) vs Cu-totaal(F) (Figuur 6.2b) blijkt dat bij 0 % Vinkeveen alle punten nabij de waarde 1 liggen, terwijl deze als bij de Cu-DGT (maar veel minder duidelijk) afnemen gaande naar hogere percentages humusrijk Vinkeveen water. Ook hier is er zeker vanaf de 75 % Vinkeveen een min of meer constante waarde van de ratio (ca 0.85).

Voor Fase II is de Cu-Chelex alleen in de natuurlijke monsters gemeten (Tabel 6.9a-d). Voor de Maas is een lichte toename zichtbaar in de tijd, de andere wateren geven een meer constant beeld (Figuur 6.9b). In Figuur 6.11 is de fractie Cu-Chelex/Cu-totaal(F) uitgezet tegen het DOC. De ratio varieert per soort water. Er is slechts een lichte trend zichtbaar: hoe hoger het DOC, des te lager de fractie Cu-Chelex. Dit is in lijn met de verwachting: hoe meer organisch materiaal beschikbaar is voor complexering van koper, des te meer Cu-complex zal de Chelex kolom passeren wat dus resulteert in een lagere Cu-Chelex concentratie. De seizoensvariatie is grafisch uitgezet in Figuur 6.9b. Interessant is dat de verschillende wateren in de tijd niet veel verschillen. De Springendalse Beek, Regge en Maas en Rijn geven een wat hogere fractie (50-100 %) en de Beemster Middensloot een lagere (30-50 %) (Figuur 7.5). De 45-50 % ratio voor het water uit de Vinkeveense Plassen is nagenoeg constant maar belangrijk lager dan de ca 80 % voor de resultaten uit Fase I (bij 100 % Vinkeveen).

Voor het voorspellen van de biologisch beschikbare fractie lijkt de Chelex-methode minder geschikt. De gevonden relatie met DOC is te zwak om in de praktijk te kunnen gebruiken.

7.1.4 *Cu-ISE*

Voor de Cu-ISE is de verwachting dat er lage concentraties worden bepaald: alleen de activiteit van het vrij koper [Cu^{2+}] wordt immers gemeten. In eerste instantie wordt dit in Fase I ook gevonden. De fracties ten opzichte van Cu-totaal(F) variëren van ca 1-2 % voor het 100 % DSW tot < 0.1 % voor de 100 % Vinkeveen watermonsters (Tabel 6.3; Figuur 6.4a,b). Dit lijkt een goed teken, immers, met meer 'humus' zal er minder vrij Cu aanwezig zijn. Echter, beziet men de trend binnen één verdunning, bijvoorbeeld 100 % Vinkeveen, dan blijkt er bij toenemende Cu-totaal(F) (van 56 tot 560 $\mu\text{g Cu/L}$) een afname van Cu-ISE ten opzichte van Cu-totaal(F). Dit valt moeilijk te rijmen.

Bij 0 % Vinkeveen neemt de Cu-ISE lineair toe met de Cu-totaal(F) (Figuur 6.4a). Bij 25 % Vinkeveen wordt snel eenzelfde maximum bereikt (0,7 $\mu\text{g Cu/L}$), waarna de concentratie afneemt. Dit beeld vindt in toenemende mate plaats bij oplopende percentages 'humus'-rijk water, totdat bij 100 % Vinkeveen louter een afname zichtbaar is.

De ion-selectieve elektrode is tijdens de metingen regelmatig gecontroleerd in een standaard oplossing (zonder DOC), en steeds was de respons als verwacht: lineair en constant. Calibratiecurves in de Vinkeveenwater / DSW verdunningsreeks laten echter zien dat de respons in het lagere additiegebied veel en veel lager is dan verwacht op basis van de Cu calibratie in een oplossing van 10 mM NaNO_3 . Blijkbaar heeft het organisch materiaal een grote - vooralsnog onbegrepen - invloed op de werking van de elektrode.

Voor het voorspellen van de biologisch beschikbare fractie lijkt de ion selectieve elektrode minder geschikt. De gevonden storende effecten, waarschijnlijk als gevolg van het aanwezig natuurlijk organisch materiaal (DOC), zijn te sterk aanwezig om in de ISE in de praktijk te kunnen gebruiken. Om deze reden is voor Fase II afgezien van een verdere toepassing van de ion selectieve elektrode voor dit onderzoek.

Het blijkt dus dat geen van de getoetste analyse- (fractionerings-)methoden direct een concentratie biologisch beschikbaar koper geeft, en dat er op dit moment (nog) geen analytisch-chemisch alternatief is voor de meting van totaal koper.

7.2 DOC, 'humus' en andere macro-variabelen

7.2.1 DOC en 'humus'

De analyses voor de organische componenten in de monsters van Fase I, DOC en 'humus' (gemeten als absorptie bij 380 en 440 nm), vertonen een overeenkomstig beeld (Tabel 6.4, Figuur 6.5b-d). Er is een lineair verband tussen de concentraties en de mate van verdunning met DSW.

De DOC resultaten voor de zes locaties van Fase II (Tabellen 6.9a-d) zijn als functie van de vier seizoenen weergegeven in Figuur 6.12a. In het algemeen is er weinig temporele variatie in de DOC concentraties, behalve voor het water uit de Beemster. Filtratie van het water uit de Beemster Middensloot was steeds bijzonder moeizaam (steeds was een kaarsfilter vol na het bemonsteren/-filtreren van ca. 15 liter). In het water van deze kleipolder bevindt zich vermoedelijk veel colloïdaal materiaal, wat deels kleiner is dan de poriëgrootte van het gebruikte filter (0.45 µm). Ondanks het snel dichtslaan van het filter is het mogelijk dat een (klein en variabel) aandeel van het DOC bestaat uit dit colloïdaal materiaal, wat de oorzaak kan zijn voor de waargenomen variatie. Er zijn hierover geen aanvullende gegevens beschikbaar vanuit het monitoringprogramma, de beheerder meet niet standaard het gehalte DOC.

De absorptie-metingen bij 380 en 440 nm laten een vergelijkbaar beeld zien voor de verschillende wateren (Tabel 6.9a-d, Figuur 6.12c,d), hoewel de relatieve afstand tussen de uitersten minder groot is als bij DOC. Opmerkelijk zijn de verhoogde waarden voor de monsters genomen in januari; met name de resultaten voor de Beemster en Vinkeveen water springen er uit. (Figuur 6.13a,b). De reden voor het schijnbaar afwijkende gedrag in januari is onbekend. Weliswaar zijn details in de analysemethoden gedurende het jaar gewijzigd, maar er zijn geen aanwijzingen dat dit de oorzaak is.

Er blijkt dat twee totaal onafhankelijke metingen, één gebaseerd op destructie van het (totaal) organisch materiaal de ander gebaseerd op de lichtabsorptie bij specifieke golflengte (kleur), kunnen dienen voor het karakteriseren van de organische fractie van de wateren. Er is een lineair verband tussen deze variabelen. Blijkbaar is de relatieve bijdrage die de absorberende organische verbindingen (bij 380 en 440 nm) aan de totale pool van organisch koolstof (DOC) redelijk constant, tenminste voor de onderzochte wateren.

Dit biedt de mogelijkheid om in de toekomst voor verder onderzoek een keuze te maken tussen deze typen metingen. Enerzijds is dan de kwaliteit van de meting aan de orde, anderzijds de mate van specialisatie en de benodigde apparatuur die vereist is voor de uitvoerbaarheid in routinematige monitoringsituaties. Ook in dit project is aangetoond dat een betrouwbare analyse van DOC niet altijd eenvoudig is, en sterk methodeafhankelijk (zie ook Kramer *et al.*, 1994), maar dat bij toepassen van een directe methode een hoge mate van reproduceerbaarheid kan worden bereikt (ca 5%, Tabellen 6.9c,d). Dit gegeven dient te worden afgezet tegen de methode van lichtabsorptie, een analysemethode die in principe eenvoudiger is uit te voeren, en waarvoor vaak de apparatuur al in het laboratorium aanwezig is. In dit project zijn steeds de gehele spectra doorgemeten, waaruit twee golflengten zijn geselecteerd volgens Rijkeboer *et al.* (1998). Mogelijk zijn er uit de dataset nog beter geschikte golflengten (of een combinatie daarvan) te vinden. Hautala *et al.* (2000) pleiten overigens voor het gebruik van een combinatie van absorptie-metingen (specifiek voor humuszuren) en fluorescentiemetingen (meer specifiek voor fulvinezuren). Uiteindelijk zal een routinematige analyse

waarschijnlijk geen spectra meer vereisen, en kan direct bij een geselecteerde golflengte worden gemeten.

7.2.2 Macro-variabelen

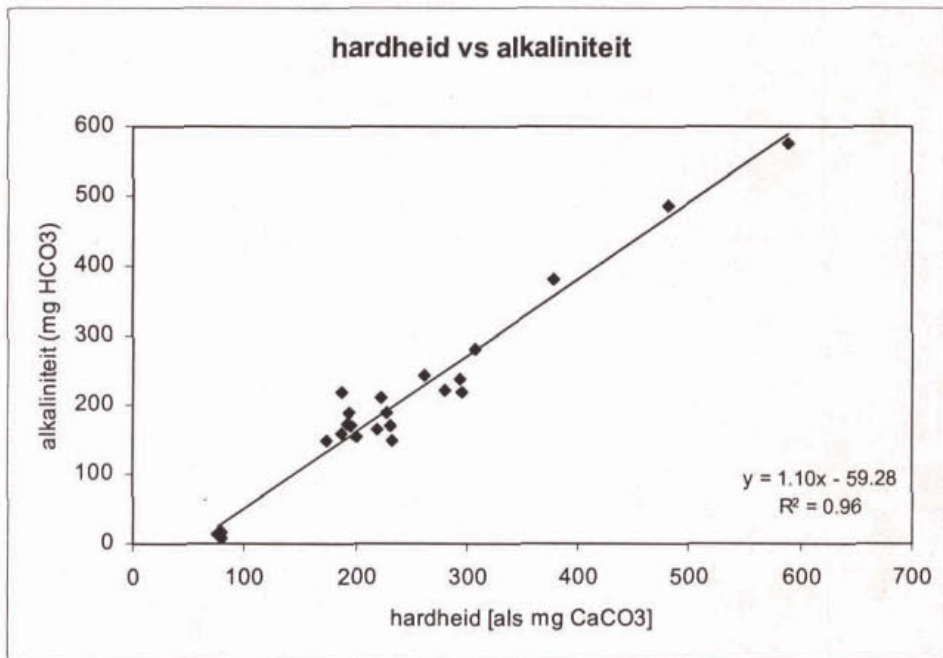
De analyseresultaten voor Fasen I en II (Tabellen 6.4 en 6.9a-d) laten karakteristieken zien voor de zes bemonsterde oppervlaktewateren (en DSW). Van de gemeten parameters zijn met name de pH, Ca (en Mg), en HCO_3^- van invloed zijn op de species-verdeling van koper (dus ook van vrij koper, Cu^{2+}); de andere ionen bepalen mede de ionsterkte van de wateren.

Uit de meetresultaten van Fase II blijkt voor de bemonsterde oppervlaktewateren een duidelijk lineair verband tussen de (berekende, zie sectie 5.3) hardheid en de alkaliniteit (Figuur 7.1), volgens:

$$[\text{alkaliniteit}] = 1.1 \times [\text{hardheid}] - 59.3 \quad (n=24, R^2 = 0.96)$$

waarbij alkaliniteit en (berekende) hardheid worden uitgedrukt in mg/L. Dit betekent dus dat deze variabelen niet onafhankelijk zijn.

Figuur 7.1. Relatie (berekende) hardheid vs alkaliniteit voor de 6 wateren over 4 seizoenen (Fase II)



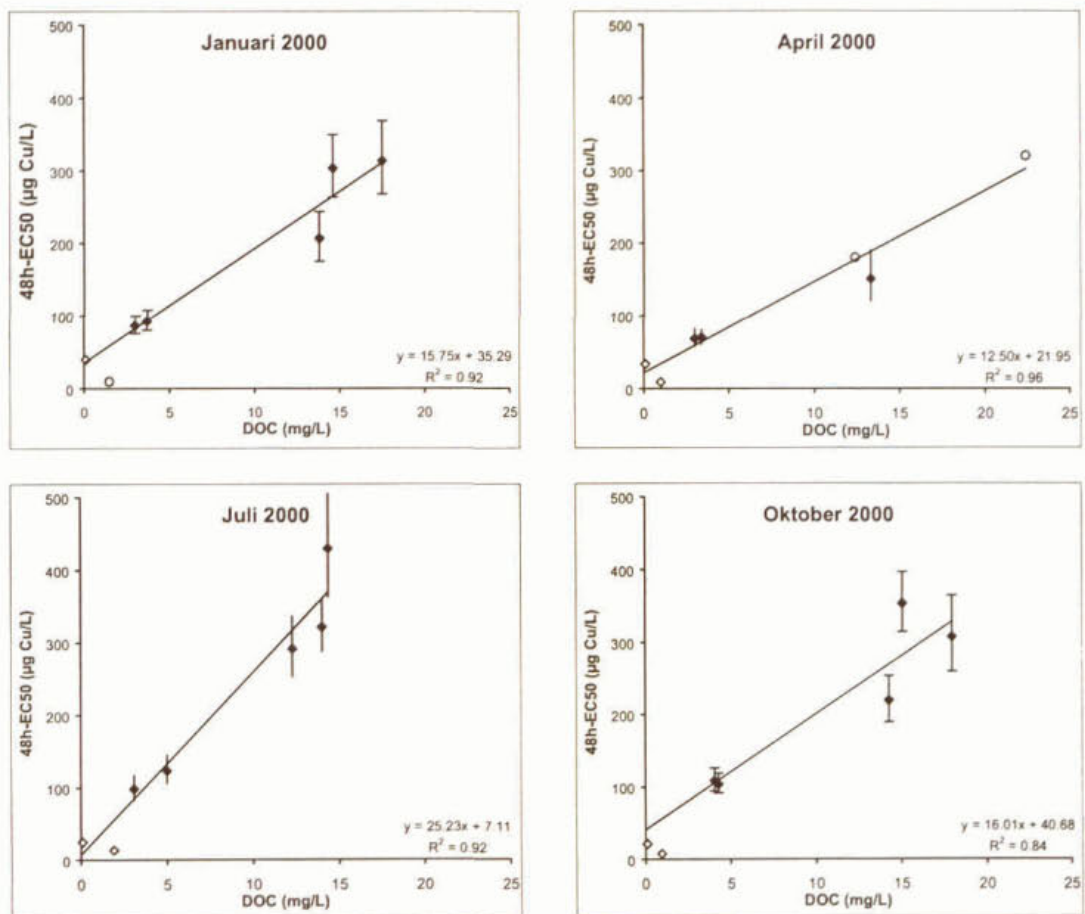
7.3 De toxicologische resultaten

7.3.1 Koper-toxiciteit vs verdunningsreeks

De toxicologische resultaten (48h EC50, *Daphnia* (beweeglijkheid)) van de verdunningsreeks uit Fase I laten voor nominaal koper duidelijk zien dat er een lineair verband is met de hoeveelheid Vinkeveen water (Tabel 6.5, Figuur 6.5a) en de afname van de toxiciteit (toename EC50). Er is bij de aanmaak van de kopertoevoegingen in de toxiciteitstoetsen een constante factor van 1.8 tussen de Cu addities toegepast, reden voor de licht toenemende onzekerheid in de waarnemingen (de absolute afstand tussen opvolgende Cu-concentraties is groter bij hogere concentraties; zie Tabel 5.3). De

EC50 voor 75 % Vinkeveen water ligt echter duidelijk onder de lineaire menglijn. Het is niet duidelijk wat hier de oorzaak van is. Ook de andere toets-variabelen dan de 48h EC50 beweeglijkheid (24h-EC50, EC100, NOEC, zie Tabel 6.5) geven geen signalen die op een mis-interpretatie wijzen. Ook de chemische analyses leiden niet tot een verklaring. Er zijn geen fouten bij de aanmaak van de verdunningen geconstateerd: Tabel 6.4 geeft bijvoorbeeld voor alle monsters een lineair verband met de geleidbaarheid. Ook de Cu addities geven het juiste beeld: in Tabel 6.3 is de Cu-gemeten steeds nagenoeg gelijk aan de Cu-toegevoegd (nominaal). De afwijking in de EC50 waarneming bij 75 % oppervlaktewater lijkt gezien het lineaire verband voor de andere verdunningen, een artefact. Men mag ervan uitgaan dat er een waar lineair verband bestaat in de verdunningsreeks.

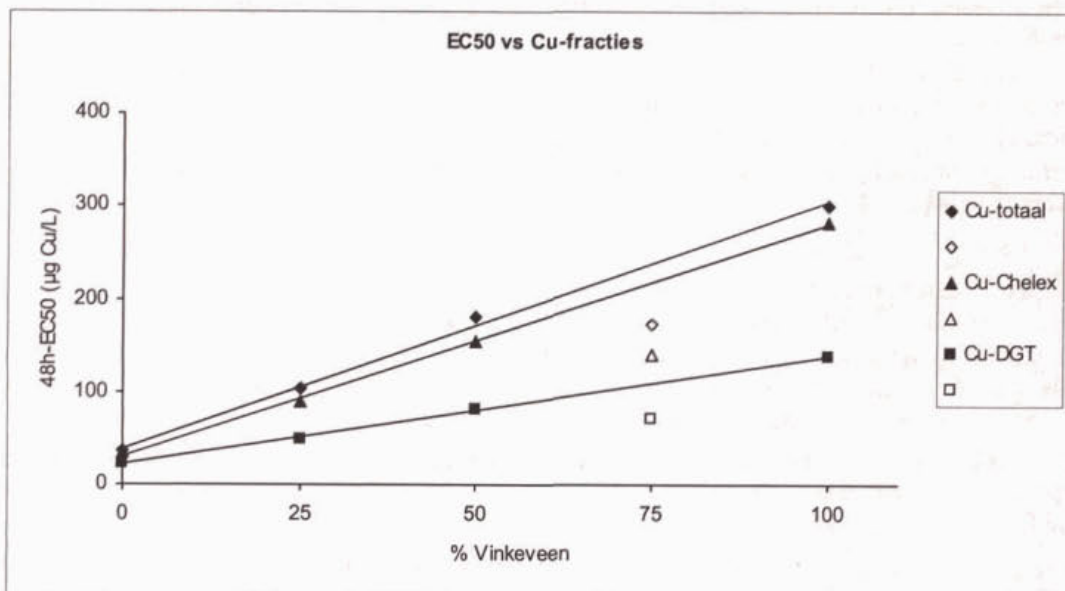
Figuur 7.2. 48h-EC50 (met 95 % betrouwbaarheidsinterval) vs DOC voor de verschillende perioden van Fase II; de open cirkels zijn EC50 waarnemingen die buiten de meetrange vielen (groter dan, zie tekst), de open ruiten betreffen de waarnemingen voor DSW (op de y-as), en die voor de Springendalse Beek (deze zijn niet in de berekening van de lineaire trendlijn meegenomen).



7.3.2 Koper-toxiciteit en Nederlandse oppervlaktewateren

De 48h EC50, *Daphnia* (beweeglijkheid) resultaten voor Fase II (Tabel 6.10) zijn voor de 4 seizoenen en voor de 6 bemonsterde locaties en voor DSW grafisch weergegeven in Figuur 6.12b. De trend is dat hoe hoger het gehalte DOC, des te hoger de EC50 (minder toxisch). Grootste variaties in de tijd treden op bij de wateren met de hoogst gevonden EC50-waarden. Door het toevoegingregiem, waarbij de absolute afstand tussen de Cu-concentraties groter wordt naarmate de koperconcentratie in het medium stijgt (volgens de toetsrichtlijn een factor 1.8), zijn de onzekerheden (95 % betrouwbaarheidsinterval, CI) ook groter (Annex 3-6, zie ook Figuur 7.2).

Figuur 7.3. Overzicht van de berekende 48h-EC50 waarden voor de verschillende gemeten Cu-fracties. (Cu-totaal, Cu-Chelex, Cu-DGT); de open symbolen zijn niet meegenomen in de berekening van de lineaire trend lijn.



Mogelijk is er een toename in de EC50 in de zomer als gevolg van de toegenomen biologische activiteit (toename van complexerende excretieproducten van algen), maar dit komt niet overtuigend uit de resultaten naar voren.

De zeer lage EC50 die voor alle vier seizoenen is gevonden voor de Springendalse Beek is opmerkelijk, aangezien die nog lager ligt dan het DSW wat vrij is van organische stof. Het betekent dat slechts enkele µg Cu/L voldoende zijn om (voor *Daphnia*) tot biologische effecten te leiden (of dat er sprake is van een synergistisch effect door andere stoffen).

7.3.3 Chemische meting van biologisch beschikbaar koper

De vraag is of we met de geteste analysetechnieken een chemische meet- of fractioneringstechniek in handen hebben die de 'biologisch beschikbare fractie' kan aangeven, via een lineaire of eventueel andere relatie. Het voordeel van een verdunningsreeks is dat er - mits men aanneemt dat er concentratieafhankelijke verbanden zijn - een evaluatie kan plaatsvinden op basis van ideale mengcurven van de twee eindleden, 0 % en 100 %. Wordt de EC50, die normaal wordt berekend op basis van Cu-nominaal, herberekend op basis van de in Fase I gemeten Cu-fracties (Cu-Chelex, Cu-DGT) dan verkrijgt men een resultaat dat mogelijk gelijk is aan de werkelijk biologisch beschikbare Cu-fractie. Aannemende dat de *Daphnia* een effect laat zien als functie van deze 'biologisch beschikbare fractie', dan kan men bij een 'ideale' Cu-fractioneringstechniek verwachten dat er in Figuur 7.3 een constante EC50 wordt waargenomen als functie van de verdunning oppervlaktewater / DSW, een horizontale lijn dus.

- *Cu-totaal*

Het lineaire verband voor de verdunningsreeks van Cu-totaal(F) is de meest steile van de methoden. Dit zal dus de minst geschikte methode zijn om de biologisch beschikbare fractie weer te geven.

- *Cu-Chelex*

Voor de verdunningsreeks van Fase I is de berekende EC50 op basis van Cu-Chelex (Figuur 7.3) slechts weinig lager dan de EC50 voor Cu-totaal (85-97 %). Er is een nagenoeg perfect lineair verband voor alle de verdunningen behalve die voor 75 % Vinkeveenwater.

De Cu-Chelex concentraties voor de natuurlijke watermonsters (Fase II) zijn in Figuur 7.4 uitgezet tegen de EC50 (*Daphnia*). Er is een lichte trend zichtbaar die aangeeft dat bij wateren met een hoge EC50 er een lage Cu-Chelex concentratie aanwezig is. De Springendalse Beek is duidelijk weer een uitzondering op deze regel. Het gevonden verband is consistent met de hypothese dat bij wateren met een hoge EC50 er veel organische complexvormers aanwezig zijn die koper kunnen binden in niet-beschikbare organische complexen; deze complexen worden niet gebonden aan de Chelex kolom. Hoewel een trend aanwezig is, is de helling onvoldoende. Immers, bij bijvoorbeeld een factor 5 verschil in EC50 zou ook de Cu-Chelex een factor 5 moeten verschillen als deze de biologisch beschikbare koperfractie zou aangeven. Het gevonden verband tussen de Cu-Chelex en de EC50 is echter te onduidelijk om in voorspellende zin voor de biologische beschikbaarheid gebruikt te kunnen worden (Figuur 7.4).

- *Cu-DGT*

De EC50 berekend op basis van de Cu-DGT in Fase I (Figuur 7.3) is belangrijk lager, en opnieuw is er een lineair verband voor alle behalve de 75 % verdunning. Echter, een horizontale lijn is ook bij deze fractie niet aanwezig. De gel laat blijkbaar nog te veel kleine (anorganische?) complexen door die wel chemisch maar niet biologisch worden gedetecteerd. Mogelijk zijn hier op termijn door verandering van de gel door de producent verbeteringen te verwachten.

Zoals aangegeven, is de Cu-DGT fractie voor de waarnemingen van Fase II in de natuurlijke wateren (te) dicht bij de detectielimiet (ondanks de concentratiestap in de procedure) om een zinvolle toxiciteit-gerelateerde evaluatie uit te voeren.

Uit de Fase I resultaten lijkt de DGT techniek de beste mogelijkheden te bieden voor het voorspellen van de biologisch beschikbare fractie, maar dit wordt door de resultaten van Fase II - mede door analytisch-chemische problemen met de detectielimiet - niet bevestigd. De fractie die door de DGT-cellen wordt verzameld is meestal in de orde van 10-20 % van Cu-totaal(F). Speciatie-modellering laat zien dat dit ook in de buurt komt van de range 'vrij-koper' die wordt berekend (sectie 7.4). Reden om de techniek niet meteen te verwerpen. Er zijn bovendien mogelijkheden aanwezig om de methode en de analysetechniek aan te passen.

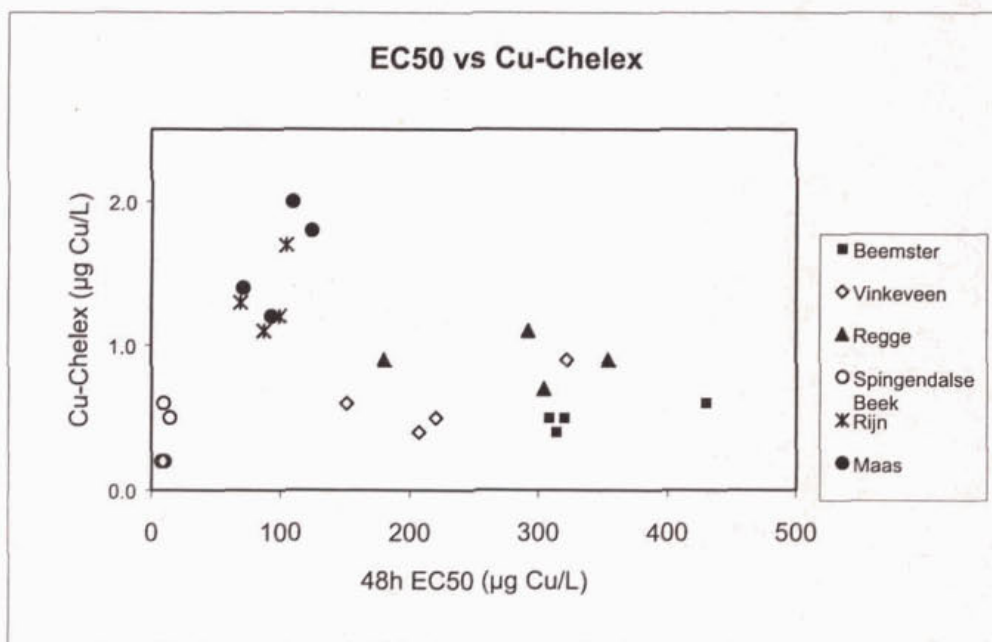
- *Cu-ISE*

De EC50 op basis van de Cu-ISE is niet te bepalen. De gegevens hebben te veel spreiding voor een betrouwbare berekening en deze fractie is dan ook niet in Figuur 7.3 opgenomen. Dit betekent dat de in het project gebruikte ISE-methode niet geschikt is om de biologisch beschikbare fractie te beschrijven.

7.3.4 *Relaties 48h EC50 Daphnia en DOC of UV-absorptie*

Uit de resultaten van zowel de verdunningsreeks van Fase I (Figuur 6.5) als de Nederlandse oppervlaktewateren van Fase II (Figuur 6.12) kan men constateren dat er een vergelijkbare trend aanwezig is tussen de 48h EC50 *Daphnia* (beweeglijkheid) en de concentratie DOC of UV-absorptie (330 en 440 nm). Dit duidt erop dat het gebruikte oppervlaktewater een belangrijke component (humus) bevat die vrij of tenminste biologisch beschikbaar koper in hoge mate complexeert tot niet biologisch beschikbare complexen.

Figuur 7.4. Relatie tussen de gemeten Cu-Chelex en de 48h EC50 Daphnia (beweeglijkheid) voor de 6 locaties en 4 seizoenen (Fase II).



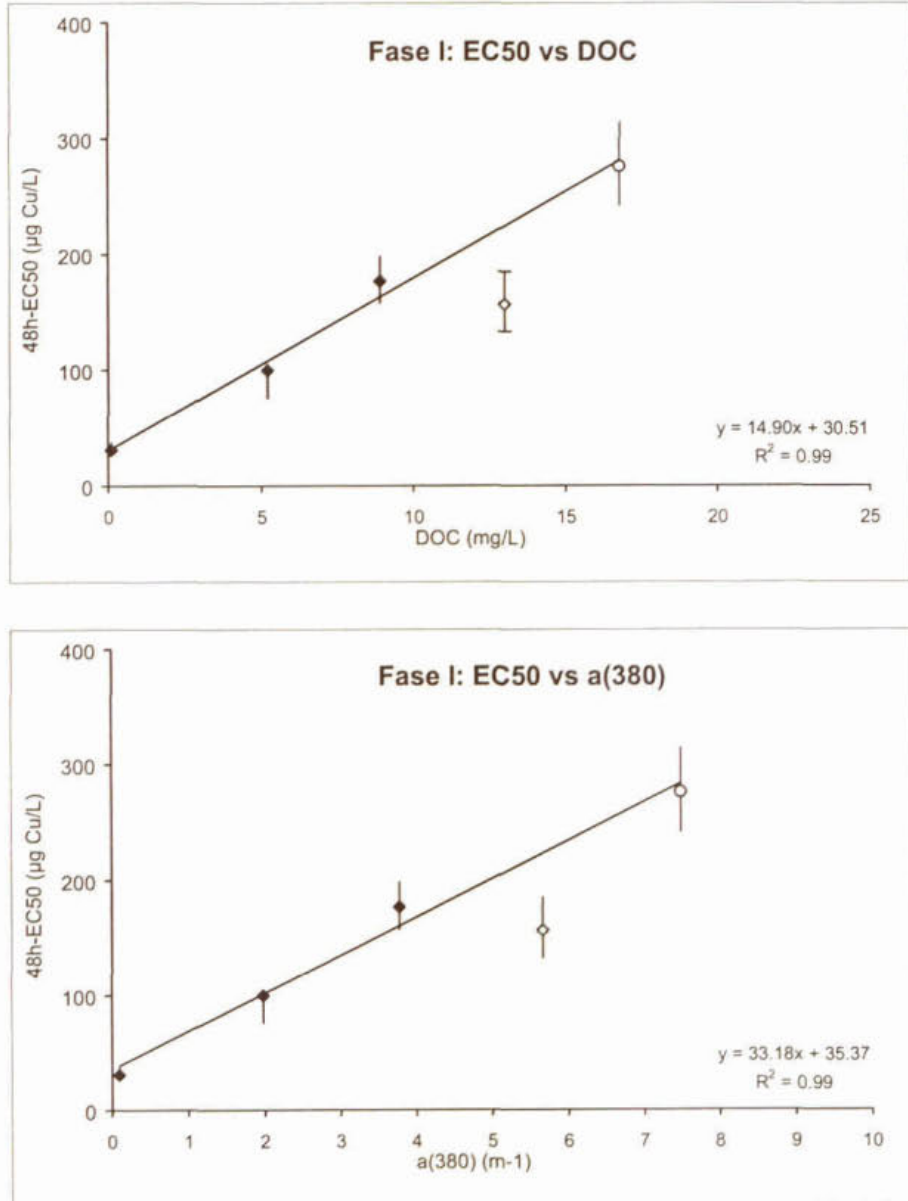
Voor de verdunningsreeks blijkt een duidelijk en zeer sterk lineair verband aanwezig tussen 48h EC50 en DOC of absorptie bij 380 nm (Figuur 7.5a,b). In de figuur zijn de onzekerheden van de EC50 (95 % betrouwbaarheidsinterval) als verticale balkjes aangegeven. De lineaire lijn werd berekend met uitzondering van de punten bij 75 % Vinkeveen water.

Met de opmerking dat de waarden voor zowel DOC als absorptie bij 100 % Vinkeveen water berekende waarden zijn (sectie 7.2.1), is de fit voor beide relaties (Fase I) nagenoeg gelijk. Ook is de fit voor de absorptie bij 440 nm zeer goed, maar het onderscheidend vermogen is minder door het geringere verschil tussen de uiterste waarden.

De verdunningsreeks geeft niet per definitie een karakteristiek beeld voor alle (Nederlandse) oppervlaktewateren. Door een verschil in oorsprong, verschillen in het stroomgebied, en verschillen in biologische productie en afbraak kunnen (relatieve) verschillen bestaan in zowel de hoeveelheid DOC als de bijdrage van complexvormende organische verbindingen.

In Figuur 7.2 is voor ieder van de 4 perioden de EC50 (met de 95 % betrouwbaarheidsinterval, CI) tegen de concentratie DOC uitgezet. Er blijkt steeds een lineaire trend aanwezig, wanneer de waarnemingen voor de afwijkende Springendalse Beek niet worden meegenomen. Aangezien DSW een artificiële oplossing van zouten is, is dit medium ook niet voor de berekening van de lijn meegenomen. De formule en fit zijn steeds vermeld. De lijn voor april heeft een helling die mogelijk incorrect is. Doordat twee punten een minimum EC50 waarde vertegenwoordigen kan de lijn mogelijk steiler lopen. Dat er steeds rechte verbanden worden gevonden duidt er op dat er in ieder seizoen een min of meer constante fractie organisch materiaal aanwezig is in alle wateren (!), behalve voor de Springendalse Beek. Een organische fractie die in staat blijkt te zijn om koper tot niet-beschikbare complexen te binden. Als alle waarnemingen van Fase I en Fase II tezamen worden genomen (Figuur 7.6a,b) dan blijken er verschillen te bestaan tussen de seizoenen, maar behalve de lijn voor juli die iets afwijkt (en dus mogelijk de iets steilere lijn voor april) is het verband opmerkelijk gelijk. De afwijking voor juli en mogelijk april kan mogelijk het gevolg zijn van een toegenomen primaire productie en de daaraan gekoppelde toename van excretieproducten.

Figuur 7.5. 48h-EC50 (met 95 % betrouwbaarheidsinterval) vs DOC en absorptie (380 nm) voor de resultaten van Fase I; de open cirkels zijn gebaseerd op geëxtrapoleerde DOC/a(380) waarden (bij 100 % Vinkeveen water), de open ruiten zijn EC50 waarnemingen die niet in de berekening van de trendlijn zijn meegenomen.



Een trendlijn door alle betrouwbare waarnemingen (met uitzondering van het niet-natuurlijke DSW, en de afwijkende Springendalse Beek) geeft een verband volgens:

$$48\text{h-EC50 } Daphnia \text{ (beweeglijkheid)} = 17.2 \times [\text{DOC}] + 30.2 \quad (n=22, R^2=0.80)$$

waarbij de EC50 is uitgedrukt in µg Cu/L, de DOC in mg/L. Deze relatie geldt tenminste voor de karakteristieken van de wateren die zijn getoetst: $3 > \text{DOC} > 22$, $7.3 > \text{pH} > 8.4$, $120 > \text{HCO}_3^- > 280$. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de relaties ook buiten deze ranges gelden.

Vergelijkt men de waarnemingen van dit project met gegevens uit de literatuur (Figuur 7.7, Tabel 2.1) dan is er een grote mate van vergelijkbaarheid, ondanks het feit dat de andere studies slechts een beperkte DOC range hebben getoetst (Winner 1984, 1985; Meador, 1991; Kim *et al.*, 1999). Dit is des te opmerkelijker omdat niet alleen de locaties totaal verschillen (laboratorium studies in de USA),

ook gebruikte methoden zijn niet geheel gelijk. Winner gebruikte *D. pulex* als toetsorganisme en het gebruikte DOC bestond uit louter humuszuren, Kim *et al.* gebruikten *Ceriodaphnia dubia* terwijl onze studie is uitgevoerd met *Daphnia magna* en DOC.

Eenzelfde figuur als voor DOC is te construeren voor de UV-absorptie bij 380 nm (Figuur 7.8a,b) en bij 440 nm: Reeds eerder is opgemerkt dat de waarnemingen voor januari afwijken (maar dat ze wel op een lijn liggen). Voor deze UV-absorptie liggen de lijnen minder parallel, zelfs met uitzondering van de januari monsters. Het lijkt er dus op dat, ondanks het feit dat de absorptiemeting meer specifiek is dan de DOC meting, de analyse van DOC een duidelijker relatie vertoont. Gezien de gevonden relaties kan men verder volstaan met het meten van DOC of van de absorptie. Wat de meest geschikte methode is in geval van routinematige monitoring (inzet apparatuur, nauwkeurigheid en precisie) dient verder te worden onderzocht.

7.3.5 Interne Cu-daphnia concentraties, en BCFs

De opname van Cu in de watervlooiën bij de reeks van Fase I uit de Vinkeveense Plassen in een oplopende verdunning met DSW water is weergegeven in Figuur 6.8a (en Annex 8). De Cu-daphnia neemt voor alle verdunningen vanaf een beginniveau van 18-35 mg/kg (als er geen koper is toegevoegd) toe met oplopende concentratie van Cu-nominaal. Ook boven de EC50 niveaus (tot zelfs ca. 400 mg Cu/L), waarbij > 50 % van de dieren is aangetast, is sprake van een toename in de interne koperconcentratie. In het algemeen blijkt dat accumulatie van koper wordt geremd door DOC. Het is waarschijnlijk dat in dit concentratiegebied eventuele regulatie-mechanismen ontregeld raken en dat er bovendien een toenemende invloed is van extern aan het oppervlak adsorberend koper.

De schijnbare BCF waarden (nabij de NOEC) zijn in Figuur 6.8b uitgezet tegen de nominale koperconcentratie. (zie ook Annex 8).

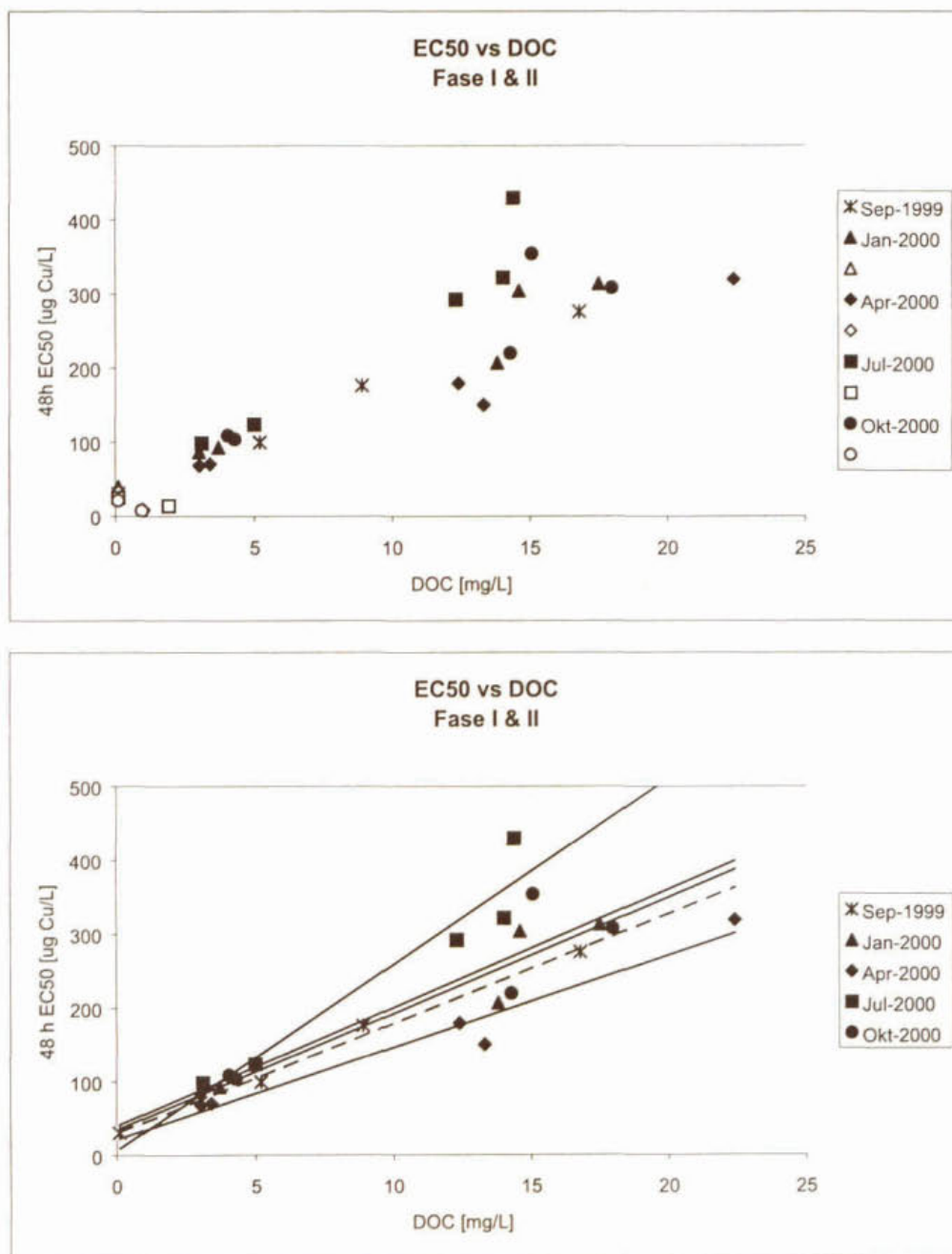
De theorie zegt dat - onder evenwichtscondities - een BCF, de ratio tussen *in vivo* concentratie en expositie concentratie (voor een gegeven organisme en gegeven toxische stof) redelijk constant is, en men zou dus verwachten dat de BCF vs Cu-nominaal constant zijn. De BCFs in de figuur vertonen echter een afnemende trend. Dit hangt mogelijk samen met de aanwezigheid van regulatiemechanismen, het ontbreken van 'steady-state' condities na (slechts) 48 uur blootstelling, snelle groei van de (jonge) *Daphnia*'s, en/of de toenemende invloed van externe adsorptie bij de hogere concentratieniveaus rondom of boven het effectniveau. In overeenstemming met de veronderstellingen zijn de verschillen in BCF tussen de behandelingsgroepen het hoogst bij de lagere doseringsniveaus. Bij de hogere niveaus (boven de EC50 waarden) lijken de BCF waarden van de verschillende behandelingsgroepen samen te vallen.

Bij het uitsluitend meenemen van de (schijnbare) BCF waarden onder of nabij het NOEC niveau (dus voor gezonde organismen) blijkt dat er aanzienlijke verschillen bestaan tussen de exposities in de verschillende verdunningen, die samen lijken te vallen met de verschillen in waargenomen toxiciteit. In Vinkeveenwater (100 %) is de BCF (ca. 1,100-3,400 L/kg) bijna een factor 10 lager dan in het DSW water (18,000-27,000 L/kg) (Tabel 6.8).

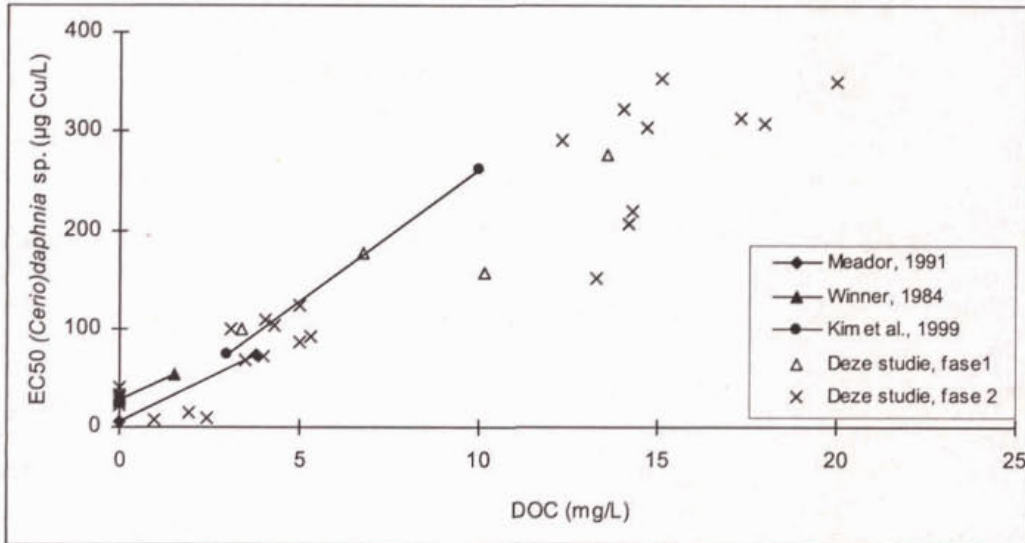
Zowel het bereik van gemeten interne gehalten als de BCFs bij de lage waterconcentraties van koper, komen overeen met eerdere mesocosm experimenten waarin verschillende soorten *Daphnia*'s aan koper in natuurlijk water (Markermeer) zijn blootgesteld. De externe concentratie varieerde 1,2 - 1,8 µg Cu/L, de interne concentratie 18 - 49 mg Cu/kg, wat resulteerde in een BCF range 13,000-36,000 (Jak *et al.*, 1996).

Tijdens Fase II is de ruimtelijke en temporele variatie onderzocht (Figuur 6.14) Vergelijkbaar met Fase I nemen de interne concentraties in de meeste gevallen toe met oplopende dosering vanaf een startniveau van ca. 5-50 mg/kg. Opnieuw vindt de sterkste accumulatie plaats in wateren met aan laag gehalte DOC (DSW, Springendalse Beek). Opname wordt verlaagd door hoge DOC gehalten (zoals in de Beemster Middensloot

Figuur 7.6. 48h-EC50 vs DOC voor alle perioden van de Fasen I en II. Boven: alle resultaten waarbij de open symbolen de waarnemingen betreffen voor DSW (op de y-as) en die voor de Springendalse Beek; deze zijn niet in de berekening van de lineaire trendlijnen (onder) meegenomen.



Figuur 7.7. 48h-EC50 vs DOC voor Fasen I, alle perioden van Fase II (*D. magna*), en in de literatuur gerapporteerde waarnemingen.



Op alle locaties en voor nagenoeg alle perioden is de Cu-daphnia in de natuurlijke watermonsters bepaald (Figuur 6.15). Er blijkt in de tijd voor de meeste locaties een vrij constant opnameniveau, maar tussen de wateren blijken verschillen die gekoppeld lijken aan het DOC niveau. De Springendalse Beek laat een relatief hoge Cu-daphnia zien, wat niet zo verwonderlijk is als men bedenkt dat de EC50 zeer laag is, lager dan die van DSW.

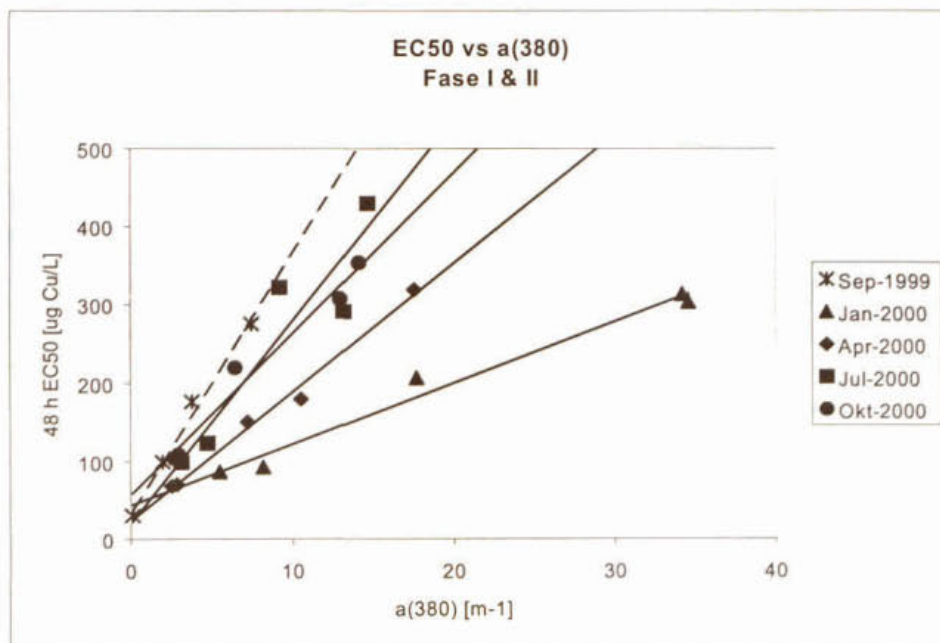
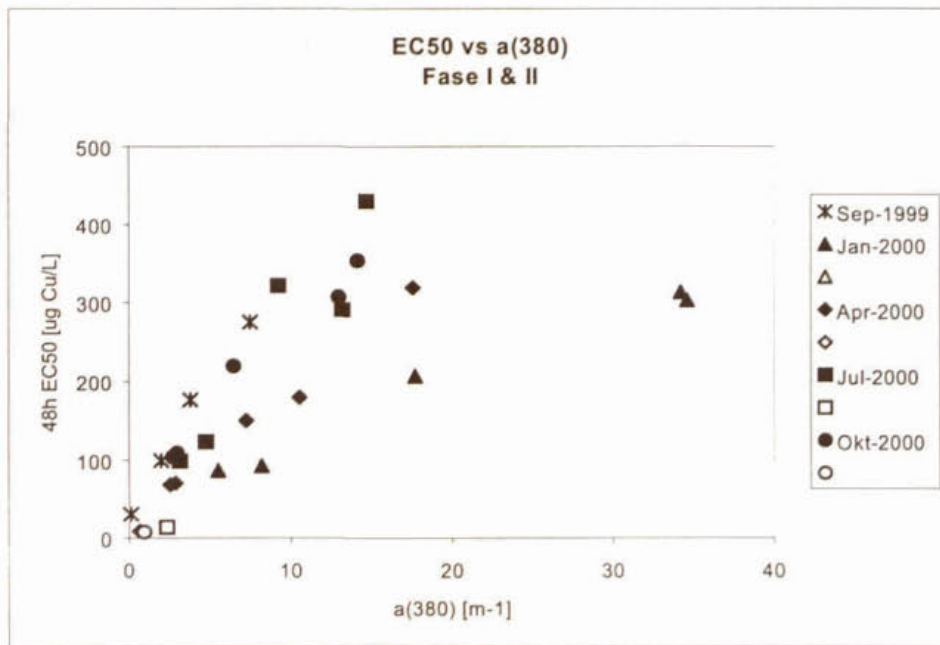
De schijnbare 48h BCF waarden vs de Cu-nominaal vertonen een afnemende trend, met een grote variatie tussen de locaties bij de lage doseringsniveaus en een convergerende trend bij de hogere blootstellingconcentraties (Figuur 6.16). Net als in Fase I (Figuur 7.9) is er in Fase II een verband tussen BCF en de concentratie DOC (Figuur 7.10). De schijnbare 48h BCF voor Cu varieert sterk tussen de verschillende locaties en neem met meer dan een factor 10 af met oplopend DOC gehalte in het bereik van 0.1-20 mg/L.

De seizoensvariatie is van minder belang en varieert binnen de locaties met een factor 2-3. (Figuur 7.10). De temporele variatie in de BCF voor Vinkeveenwater versterkt dit beeld (Figuur 6.17).

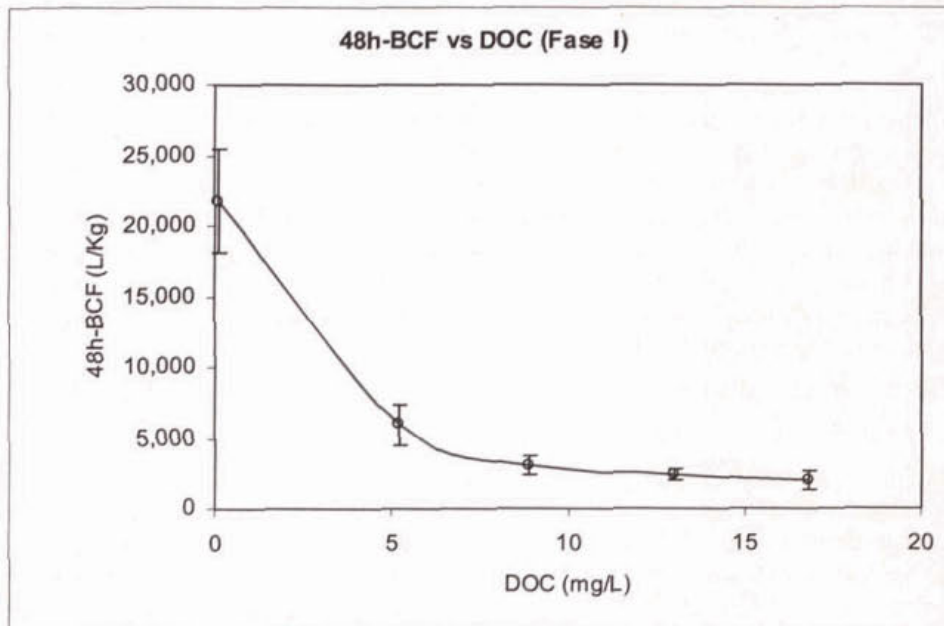
De interne dosis niveaus (CBR) waarbij effecten optreden (48h EC-50) zijn voor Fase II weergegeven in Tabel 6.11. De range van de 'critical body residues' genomen over alle seizoenen en locaties bedraagt ruwweg 100-400 mg/kg, en ligt in dezelfde orde als waargenomen tijdens Fase I bij de verdunningsexperimenten met Vinkeveen water (150-300 mg/kg) (Tabel 6.7).

Er blijkt een duidelijk verband tussen de EC50 en de BCF. Uit bijvoorbeeld de Figuren 6.8b en 6.16 blijkt dat bij de wateren waarvoor de hoogste BCFs zijn gevonden (Springendalse Beek, DSW) ook de hoogste toxiciteit wordt gevonden (laagste EC50 waarden). Voor de locaties met relatief lage toxiciteit (Beemster, Regge, Vinkeveen) worden ook de laagste bioconcentratiefactoren gevonden. BCFs gevonden voor Rijn en Maas water nemen een intermediaire positie in. Dit is in overeenstemming met wat men zou verwachten. Immers, koper is in principe een gereguleerd element, en de biologische effecten worden gestuurd door de interne concentraties, de Cu-daphnia of CBR.

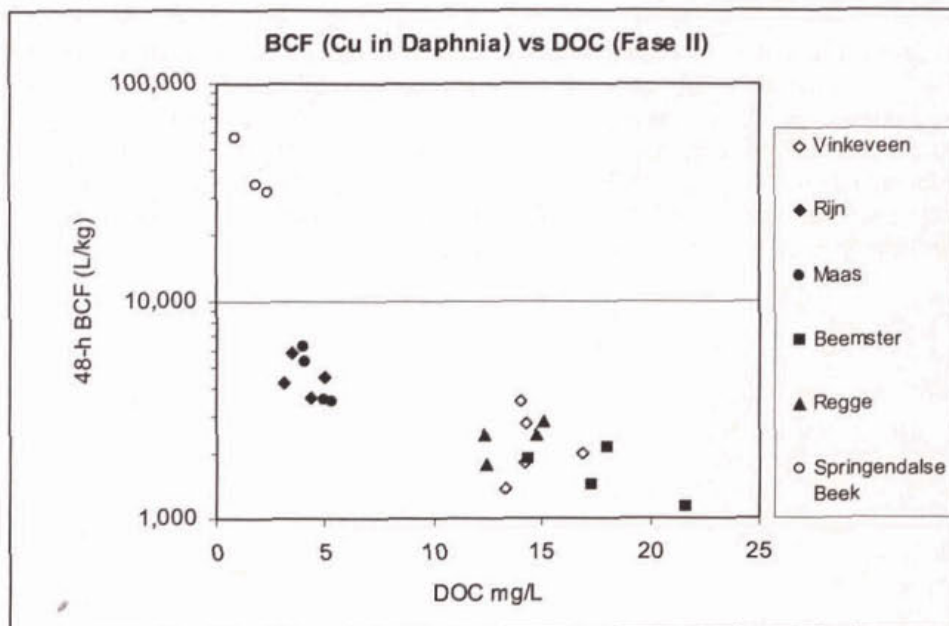
Figuur 7.8. 48h-EC50 vs a(380) voor alle perioden van de Fasen I en II. Boven: alle goed gedefinieerde resultaten waarbij de open symbolen de waarnemingen betreffen voor de Springendalse Beek; deze zijn niet in de berekening van de lineaire trendlijnen (onder) meegenomen.



Figuur 7.9. Schijnbare BCF voor Cu in Daphnia bij doseringsniveaus kleiner of gelijk aan de NOEC, als functie van het gehalte aan DOC (verduunningsreeks, Fase I).



Figuur 7.10. Schijnbare BCF voor Cu in Daphnia bij doseringsniveaus kleiner of gelijk aan de NOEC, als functie van het gehalte aan DOC, voor de verschillende locaties en seizoenen van Fase II.



7.3.6 *Relaties 48h EC50 Daphnia en andere parameters*

Zoals in sectie 7.2.2 is aangegeven is er een groot verschil in de chemische karakteristieken tussen de wateren van de verschillende locaties. Met name de Beemster heeft meestal hoge concentraties macro-variabelen, het water van de Springendalse Beek bevat juist lage concentraties (Tabel 6.9a-d).

•• *pH*

De lage pH kan de reden zijn van de lage EC50s in de Springendalse Beek. De pH bij monsternamen was steeds relatief laag (6.2-6.8), in tegenstelling tot de andere wateren die werden bemonsterd (allen *in situ* pH > 7.7) (Annex 7). Bij de meeste toetsen loopt tijdens de toets de pH op (zie Annex 1; Hooftman, 1999, 2000a,b,c,d), in het water van de Springendalse Beek is dat zeker ook het geval, maar het blijft tijdens de toxiciteitstoets toch beneden de pH-waarden van de andere wateren. Het gegeven dat bij een lage pH organische complexen makkelijker dissociëren (competitie met H⁺), en er dus meer 'vrij'- koper beschikbaar is, is een mogelijke verklaring voor het afwijkende gedrag in het water van de Springendalse Beek.

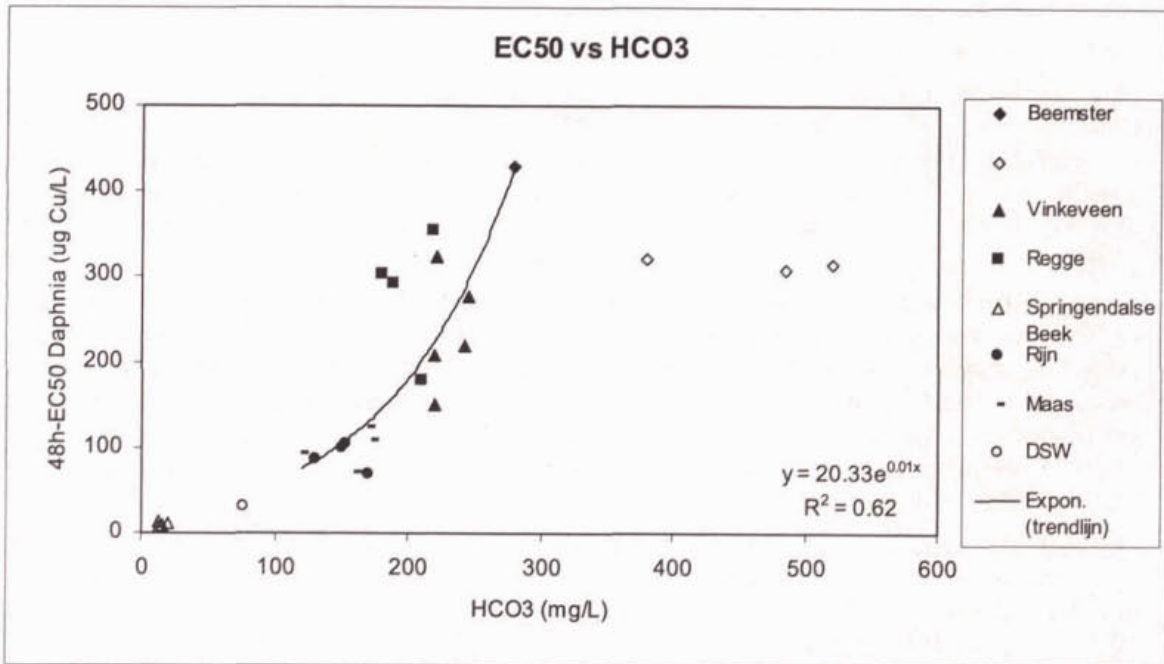
In sectie 7.4 wordt dit aan de hand van de speciatie-berekeningen verder toegelicht.

•• *Alkaliniteit en hardheid*

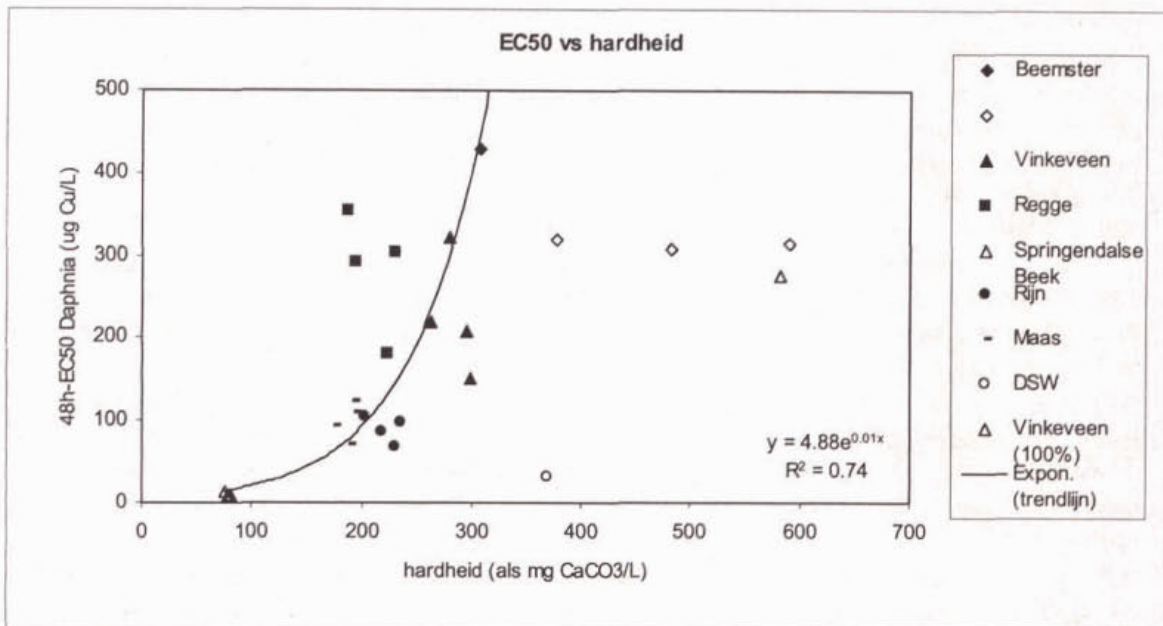
Het Springendalse Beek water bevat een extreem laag bicarbonaatgehalte, ofwel een lage bicarbonaat alkaliniteit (10-30 keer lager dan de andere wateren). Wanneer de relatie EC50 tegen alkaliniteit wordt uitgezet (Figuur 7.11), dan lijkt er een duidelijk verband aanwezig. De drie waarnemingen die zijn gerapporteerd voor zeer hoge alkaliniteit, zijn mogelijk buiten het (lineaire) bereik van de meettechniek geweest. Met uitsluiting van deze drie punten blijkt er een goede exponentiële fit die ook DSW en de Springendalse Beek omvatten. Het lijkt er dus op dat de toxiciteit wordt verlaagd bij toename van de alkaliniteit. Ook Andrew *et al.* (1977) vonden een afname van de toxiciteit bij verhoogde carbonaatgehalten (bij constante pH en Ca-concentratie). In sectie 7.4 wordt middels speciatiemodellering nader ingegaan op het effect van de carbonaatconcentratie op de concentratie [Cu²⁺], met name voor de verschillen tussen de Springendalse Beek en de andere wateren.

Uit de relatie van de EC50 met de hardheid, waarbij de hardheid is berekend uit de concentraties Ca and Mg (sectie 5.3) blijkt een vergelijkbaar exponentieel verband als voor de alkaliniteit aanwezig (Figuur 7.12). Dit is niet verwonderlijk, gezien de lineaire relatie tussen hardheid en alkaliniteit (Figuur 7.1). Opnieuw zijn er enkele uitbijters. Opmerkelijk is dat de hardheid voor DSW niet op de exponentiële curve ligt. Zonder de waarnemingen voor de Springendalse Beek blijkt het verband veel minder duidelijk en is er, binnen de spreiding van de data, amper een verandering van de toxiciteit te bespeuren. Ook Winner (1985) en Belanger *et al.* (1989) hebben de mogelijke relatie van de toxiciteit (voor *Daphnia*, respectievelijk *Ceriodaphnia*) met de hardheid van het water getest, maar vonden dat hardheid nauwelijks effect had op de toxiciteit.

Figuur 7.11. Relatie 48h-EC50 Daphnia tegen de gemeten concentratie HCO₃ voor alle perioden en locaties. De open symbolen voor de Beemster zijn niet in de berekening van de exponentiele trendlijn meegenomen.



Figuur 7.12. Relatie 48h-EC50 Daphnia tegen de berekende hardheid voor alle perioden en locaties. De open symbolen voor de Beemster en Vinkeveen zijn niet in de berekening van de exponentiele trendlijn meegenomen.



7.4 Speciatie-modellering

7.4.1 *pCu in de natuurlijke wateren*

De concentratie vrij-koper [Cu^{2+}], als berekend met behulp van het speciatiemodelleringsprogramma CHEAQS, is voor de verschillende (natuurlijke) wateren en DSW als functie van het seizoen weergegeven in Figuur 6.18 (getrokken lijnen). De gebruikte eenheid is pCu, die net als voor pH is gedefinieerd als $^{-10}\log[\text{Cu}^{2+}]$. De seizoensvariaties zijn niet groot. Dit is ook niet verwonderlijk als men bedenkt dat de verschillende (macro)bestanddelen van de onderscheiden wateren ook nauwelijks variëren in de tijd.

De verschillen tussen de wateren zijn evident. Laagste vrij-koperconcentraties worden berekend voor de Beemster, Vinkeveen en beneden Regge ($1-2 \times 10^{-11}$ M, pCu = 11), iets minder dan een orde van grootte hoger zijn de concentraties in de Rijn en Maas (ca. 10^{-10} M, pCu = 10), en veruit de hoogste vrij-koperconcentraties komen voor in de Springendalse Beek en DSW (ca. 3×10^{-10} M, pCu = 9.5). Dit resultaat is in overeenstemming met de hypothese dat de biologische effecten (bijvoorbeeld als EC50, *Daphnia*, beweeglijkheid) gerelateerd zijn aan 'vrij-koper', en volgt goed de resultaten voor de EC50 voor deze wateren (Figuur 6.12).

De verdeling van de verschillende koperspecies is voor de natuurlijke wateren behalve de Springendalse Beek, redelijk gelijk (zie Annex 11). De grootste koperfractie is het Cu(2L)-complex, gevolgd door Cu(5L) en CuCO_3 . Voor de Springendalse Beek is het Cu(2L)-complex met meer dan 80 % veruit de belangrijkste species. Doordat vrijwel alle componenten in het water een lage concentratie hebben, is er bijvoorbeeld geen complexering aan carbonaten. Wel is er een additioneel species aanwezig, CuSO_4 , die in de andere wateren van geen belang is. Doordat ook de DOC (humus) laag is (dus ook de liganden 1L - 5L) blijkt er na maximale complexering nog ca. 4.5 % van het totaal koper over als vrij koper, veel meer dan voor de andere wateren.

7.4.2 *pCu in de toetsmedia (bij EC50)*

De concentratie vrij-koper [Cu^{2+}] is berekend voor de verschillende toetsmedia en DSW, waarbij voor de totaal koperconcentratie de respectievelijke EC50 waarden zijn genomen. Deze 'vrij-koper' concentratie is als functie van het seizoen weergegeven in Figuur 6.18 (gestippelde lijnen). Zowel de seizoensvariaties als de variaties tussen de media zijn beperkt. In tegenstelling tot de natuurlijke wateren liggen de vrij-koperconcentraties voor de media op basis van water uit de Beemster, Regge (niet voor januari), Vinkeveen, Rijn en Maas op hetzelfde niveau (ca. 10^{-8} M). Alleen DSW en de Springendalse Beek hebben een duidelijk hogere concentratie vrij koper.

Men zou overigens ook verwachten dat de vrij-koperconcentraties hier gelijk zijn. Immers, met de aanname dat vrij koper inderdaad gerelateerd is aan de biologische beschikbaarheid en -effecten, is de (vrij-koper) concentratie waarbij bij 50 % van eenzelfde populatie organismen een effect optreedt (EC50) voor alle wateren gelijk.

De hogere vrij-koperconcentraties die berekend zijn voor DSW en met name de Springendalse Beek (beide met een zeer laag gehalte organisch materiaal) geven aan dat de koppeling EC50 (Cu-totaal) en de modellering nog niet helemaal perfect op elkaar zijn afgestemd. Dit zal onder andere komen door de aannamen die er zijn gemaakt bij de definities van de complexvorming met organische liganden, op basis van DOC.

De relatieve verdeling van de verschillende koperspecies is voor de koper-geaddeerde media (nabij de EC50) vergelijkbaar, behalve voor de Springendalse Beek (zie Annex 12). De beek uitgezonderd, zijn grootste koper fracties de kopercarbonaat complexen. Deze verschuiving, ten opzichte van de wateren zonder kopertoevoeging, is te danken aan het verschil in de totaal concentraties: er is veel meer carbonaat aanwezig dan organische liganden. Hoewel koper de organische liganden prefereert, zijn deze spoedig verzadigd en daarna worden de carbonaten aangesproken. Voor de Springendalse Beek is dit door de zeer lage concentratie carbonaat (alkaliniteit) geheel anders. Hoewel ook DOC

(organische liganden) laag is blijkt toch ca 50 % van het koper te zijn gebonden in organische complexen. Ruim 10 % is vervolgens als anorganisch CuCO_3 en $\text{Cu}(\text{OH})^+$ gecomplexeerd. Over blijft een relatief grote fractie van bijna 20 % Cu^{2+} .

Overigens is het onduidelijk welke anorganische complexen eventueel ook biologisch beschikbaar zijn. De dataset die binnen dit project werd verzameld biedt goede mogelijkheden voor een verdere evaluatie, eventueel in relatie tot de Cu-DGT fractionering.

7.4.3 Speciatie-modellering en de invloed van pH

Hoewel de meeste bemonsterde wateren een vergelijkbare pH hebben, zowel *in situ* gemeten als tijdens de toxiciteitstoetsen (pH ca. 7,5-8,5), is de opvallend lage zuurgraad van de Springendalse Beek (pH 6,2-6,8) een reden om te onderzoeken of de pH wellicht de (belangrijkste) oorzaak is van de gevonden lage EC50 (dus hoge toxiciteit).

De resultaten van de modellering laten zien dat er inderdaad een duidelijk effect is op de pCu (Tabel 6.14). In alle situaties was de pH tijdens de toetsen hoger dan de *in situ* gemeten pH (Annex 7). Bij het invoeren van de *in situ* gemeten pH stijgt de concentratie vrij koper voor het natuurlijke water met een factor 2,5-11, afhankelijk van het verschil tussen de pH-lab en de pH-veld. Ook bij een koperconcentratie nabij de EC50 treedt dit effect op, zij het in mindere mate (een factor ca 2-6).

De berekeningen, bijvoorbeeld als functie van de serie pH = 6, 7, 8 geven duidelijk aan dat de pH van grote invloed is op de concentratie van Cu^{2+} . Hoe hoger de pH (dus hoe minder H^+) des te lager de concentratie vrij-koper (Tabel 6.14).

Voor de natuurlijke wateren is de fractie vrij koper / totaal koper illustratief. Berekend voor de pH als gemeten tijdens de toxiciteitstoetsen, blijkt dat ca 5 % van het totaal koper als Cu^{2+} aanwezig is (met een uitschieter naar 17 %). Dit stijgt bij berekening bij de *in situ* pH tot ca. 35 % (uitschieter 65 %). De berekeningen laten zien dat nabij pH = 8 de Cu^{2+} concentratie veel lager wordt.

De fractie vrij koper / totaal koper daalt sterk bij toename van de pH. Dit leidt tot fracties in de range 0,2-0,6 % bij een pH van 8. Alle wateren, behalve de Springendalse Beek, hebben een natuurlijke pH die hier in de buurt ligt. Bij de toetsen is dus sprake van een duidelijk verlaagde concentratie [Cu^{2+}].

8 CONCLUSIES

Samenvattend kan worden gesteld dat een consistent beeld ontstaat waarbij de toxiciteit van koper in sterke mate wordt bepaald door de aanwezigheid van natuurlijk organisch materiaal. (Een deel van) het organisch materiaal bindt koper tot biologisch niet-beschikbare complexen. 'Vrij koper' is in grote mate verantwoordelijk voor opname door organismen.

De resultaten van de chemische analyses van water en biota, de biologische effect-parameters (48h EC50) en de speciatie modellering versterken elkaar:

- de onderzochte wateren, te weten een kleipolder (Beemster), een veenplas (Vinkeveense Plassen), de jonge Springendalse Beek, een middelgrote rivier (Beneden Regge), en de grote rivieren Rijn en Maas, bevatten een grote range aan organisch materiaal, variërend van ca 1 mg DOC/L voor de beek tot ca. 22 mg DOC/L voor water uit de Beemster;
- de alkaliniteit varieert in de onderzochte wateren van ca 120-280 mg HCO₃/L; echter, de alkaliniteit van de Springendalse Beek is zeer laag met ca. 13 mg HCO₃/L;
- er bestaat voor verschillende karakteristieke Nederlandse oppervlaktewateren een duidelijke lineaire relatie tussen de hoeveelheid organisch materiaal (gemeten als DOC of lichtabsorptie, als maat voor 'humus') en de toxiciteit (gemeten als 48h EC50, *Daphnia* (groeiremming));
- een trendlijn door alle betrouwbare waarnemingen (met uitzondering van het niet-natuurlijke DSW, en de afwijkende Springendalse Beek) geeft een lineair verband volgens:

$$48h-EC50 \text{ *Daphnia* (beweeglijkheid)} = 17.2 \times DOC + 30.2$$

(n = 22, R² = 0.80) waarbij de EC50 is uitgedrukt in µg Cu/L, de DOC in mg/L; deze relatie is tenminste geldig binnen de gevonden ranges van DOC, alkaliniteit en pH;

- dit betekent dat een verhoogde concentratie organisch materiaal detoxificerend werkt, voor deze studie met 17.2 µg Cu / mg DOC;
- het water van de Springendalse Beek toont een afwijkend gedrag met een hogere toxiciteit dan de relatie voorspelt; de oorzaak ligt in een aantal factoren die elkaar versterken: met name een lage pH en lage concentraties DOC en alkaliniteit, wat leidt tot een verhoogde concentratie [Cu²⁺];
- er blijkt, ondanks de variatie in deze bemonsterde wateren en de seizoenen, dat er weinig verschil is in de relatie DOC/EC50; dit duidt er op dat er weinig verschillen bestaan in de relatieve bijdrage van liganden in het organisch materiaal ten aanzien van complexering van koper;
- de resultaten van de bioaccumulatie-studie ondersteunen de hypothese dat de grote variatie in de remming van de toxiciteit tussen de locaties wordt veroorzaakt door grote verschillen in biologische beschikbaarheid en de op grond daarvan verwachte verschillen in interne dosis; de (tot een factor 10) oplopende verschillen in de 48h-BCF tussen de verschillende locaties covariëren met het gehalte DOC;
- de speciatiemodellering laat zien:
 - dat er in de *natuurlijke wateren* aanzienlijke verschillen bestaan in de concentratie vrij koper, met de laagste Cu²⁺-concentraties in de wateren met de hoogste concentraties DOC (10⁻¹¹ M Cu²⁺); voor wateren met 10× lagere DOC gehalten wordt een vrij-koperconcentratie van ca. 10⁻¹⁰ M Cu berekend, een factor tien hoger;
 - dat behoudens atypische wateren (Springendalse Beek en DSW), de berekende concentraties vrij koper [Cu²⁺] voor alle media met een totaal koperconcentratie gelijk aan de respectievelijke 48h-EC50s voor *Daphnia*, nagenoeg gelijk zijn, ca. 10⁻⁸ M;
 - dat er een sterk effect is van de pH op de [Cu²⁺]: hoe lager de pH, des te hoger de vrij-koper concentratie;

- dat er met betrekking tot de huidige waterkwaliteitsnormstelling van koper (en andere metalen) kan worden gesteld dat het MTR en de streefwaarde worden berekend op basis van de resultaten van laboratorium ecotoxiciteitsexperimenten bij (vrijwel) afwezigheid van opgelost organisch materiaal. Hoewel in het vastgestelde MTR (en de streefwaarde) het detoxificerende effect van DOC niet is verwerkt, zou hiermee in de normstelling rekening kunnen worden gehouden;
- er is vooralsnog geen analytisch-chemische (fractionerings-)methode, die correleert met de gevonden koper-complex / toxiciteit relatie, zodanig dat die de zogeheten 'biologisch beschikbare fractie' kan kwantificeren. Voor de Chelex-methode werd weliswaar een correlatie gevonden maar die bleek niet sterk genoeg voor toepassing in de praktijk. Hoewel de DGT-techniek zeker mogelijkheden heeft, ook door directe toepassing in het veld, is duidelijk dat deze methode nader moet worden onderzocht, waarbij bij de analyse rekening moet worden gehouden met lage opbrengsten. Eventueel moet de techniek worden aangepast voordat ze in een routinematig onderzoek kan worden toegepast.

9 AANBEVELINGEN

Op basis van de resultaten van de studie kunnen een aantal aanbevelingen worden geformuleerd:

- de ecotoxicologische toetsen zijn met slechts één type organisme (*Daphnia*) uitgevoerd; teneinde te onderzoeken of vergelijkbare detoxificerende effecten van natuurlijk organisch materiaal ook optreden bij andere organismen, verdient het aanbeveling om andere trofische niveaus ecotoxicologisch te toetsen, bijvoorbeeld met algen, raderdiertjes, mosselen of vissen;
- de ecotoxicologische resultaten zijn gebaseerd op de acute (48 h) toxiciteit; het verdient aanbeveling om parallel ook de chronische toxiciteit te onderzoeken;
- de chemische analysemethode op basis van de DGT-techniek lijkt het meest veelbelovend en dient verder te worden onderzocht op geschiktheid voor het voorspellen van de biologisch beschikbare fractie, met name ook in natuurlijke wateren; dit moet inhouden een optimalisering van de methode (bijvoorbeeld expositieduur, toename van de precisie) gepaard gaand met een verlaging van de detectielimiet van de Cu-analyse, waarna een ecotoxicologische herevaluatie dient te geschieden;
- het is vooralsnog onduidelijk welke koperspecies biologisch beschikbaar zijn (naast Cu^{2+} wellicht ook koperhydroxiden en/of -carbonaten); een nadere evaluatie van de via koperspecies-modellering verkregen dataset, eventueel gekoppeld aan de resultaten van de chemische fractioneringsmethode (Cu-DGT), wordt aanbevolen;
- aangezien zowel de concentratie van DOC als de lichtabsorptie (bijvoorbeeld bij 380 nm) een lineair verband met de EC50 vertonen, dient te worden onderzocht welke analyse de minste problemen geeft (in termen van hoogste nauwkeurigheid en interlaboratoriumspreiding, minste personele, instrumentele en financiële inspanning), met name ook gericht op toepassing in routine laboratoria;
- er zijn in deze studie slechts zes representatieve wateren getest, waarvan één een afwijkend gedrag vertoonde; gezien de invloed van de concentraties DOC/absorptie, bicarbonaat en de pH op de EC50, verdient het aanbeveling om voor tenminste deze parameters een inventarisatie te maken voor een beduidend groter aantal Nederlandse oppervlaktewateren, en de resultaten te evalueren in het kader van de in dit rapport gestelde.
- een vervolgonderzoek naar de hier genoemde vragen wordt aanbevolen (en is inmiddels opgestart door VROM/DGM).

10 LITERATUUR

- Allen, H.E. & Hansen, D.J., 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Wat. Environ. Res.* 68: 42-54.
- Andrew, R.W., K.E. Biesinger & G.E. Glass, 1977. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Wat. Res.* 11: 309-315
- APHA/AWWA/WPCF, 1985. Standard methods for the examination of water and waste water. 16th edition, Am. Publ. Health Ass., Washington, pp. 1268.
- Avdeef, A., J. Zabronsky & H.H. Stuting, 1983. Calibration of copper ion selective electrode response to pCu 19. *Anal. Chem.* 55: 298-304
- Batley, G.E. & T.M. Florence, 1976. Determination of the chemical forms of dissolved Cd, Pb and Cu in seawater. *Mar. Chem.* 4: 347-363
- Belanger, S.E., J.L.Harris & D.S. Cherry, 1989. Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 601-611.
- Borgmann, U. & K.M. Ralph (1983): Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Res.* 17:1697-1703.
- Buykx, S.E.J., R.F.M.J. Cleven, A.A. Hoegee-Wehmann & M.A.G.T. van den Hoop, 1999. Trace metal speciation in European river waters. *Fres. J. Anal. Chem.* 363: 599-602.
- Cabaniss, S.E., 1987. TITRATOR: an interactive program for aquatic equilibrium calculations. *Environ. Sci. Technol.* 21: 209-210.
- Cabaniss, S.E. & M.S. Shuman (1988a). Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52: 181-193.
- Cabaniss, S.E. & M.S. Shuman (1988b). Copper binding by dissolved organic matter: II. Variation in type and source of organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52: 195-200.
- Camosso, M. and G. Tartari (1991). Measurement and prediction of Copper ion activity in Lake Orta, Italy. *Environ. Sci & Technol.* 25, 678-683.
- Campbell, P.G.C., A.G. Lesis & P.M. Chapman, W.K. Fletcher, B.E. Imber, S.N. Luoma, P.M. Stokes and M. Winfrey, 1988. Biologically available metals in sediments. Publ. No. 27694. National Research Council of Canada, Ottawa.
- Campos, M.L.A.M. & C.M.G. van den Berg, 1994. Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicyl-aldoxime. *Anal. Chim. Acta*, 284: 481-496.
- Chakrabarti, C.L., Y.J. Lu, D.C. Gregoire, M.H. Back, & W.H. Schroeder, 1994. Kinetic studies of metal speciation using Chelex cation exchange resin: application to cadmium, copper, and lead speciation in river water and snow. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1957-1967.
- Chapman, P.M., H.E. Allen, K. Godtfredsen & M.N. Zraggen (1996a): Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environ. Sci. Technol.* 30:448A-452A.
- Creselius, E.A., J.T. Hardy, R.L. Schmidt, C.W. Apts, J.M. Gurtzjin & S.P. Joyce, 1982. Copper bioavailability to marine bivalves and shrimp; relationship to cupric ion activity.. *Mar. Environ. Res.* 6: 13-26.
- Crommentuijn, G.H., 1994. Sensitivity of soil arthropods to toxicants. Thesis. Vrije Universiteit.
- Crommentuijn, T., M.D. Polder & E.J. van de Plassche (1997): Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for metals, taking background concentrations into account. RIVM report No. 601501001.
- Davies, C.M., S.C. Apte & A.L. Johnstone, 1998. A bacterial bioassay for the assessment of copper bioavailability in freshwaters. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 263-271.
- Davison, W. & H. Zhang, 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*, 367: 546-548

- de Boer *et al.* Hydrologisch, fysisch en chemisch onderzoek in het Tjeukemeer; Verslag van de resultaten over ... (verschillende delen, 1968-72, 1986, 1987, 1988, 1989)
- del Castillo, P., R.G. Gerritse, J.M. Marquenie & W. Salomons, 1984. Speciation of heavy metals and the in-situ accumulation by *Dreissena polymorpha*: a new method. C.J.M. Kramer & J.C. Duinker (eds.). Complexation of trace metals in natural waters. Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, pp. 445-448.
- Denney, S., J. Sherwood & J. Leyden, 1999. In situ measurements of labile Cu, Cd and Mn in river waters using DGT. *Sci. Total Environ.* 239: 71-80
- Depledge, M.H., 1994. Heavy metals. In: Calow, P. (Ed.), Handbook of ecotoxicology. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 416 pp.
- Donat, J.R., P.J. Statham & K.W. Bruland, 1986. An evaluation of a C-18 solid phase extraction technique for isolating metal-organic complexes from central North Pacific Ocean waters. *Mar. Chem.* 18: 85-99
- Donat, J.R. & C.M.G. van den Berg, 1992. A new cathodic stripping voltammetric method for determining organic copper complexation in seawater. *Mar. Chem.* 38: 69-90
- Donat, J. R., K.A. Lao & K.W. Bruland, 1994. Speciation of dissolved copper and nickel in south San Francisco bay: a multi-method approach. *Anal. Chim. Acta*, 284: 547-571.
- Dwane, G.C. & E. Tipping, 1998. Testing a humic speciation model by titration of copper-amended natural waters. *Environ. Int.* 24: 609-616.
- EU, 1992. Part C: Methods for determination of ecotoxicity. C.2, Acute toxicity to *Daphnia*. Off. J. Eur. Comm. L 383 A, 172-178.
- Evers, E., 1991. TNO-rapport R91/200.
- Fish, W.G. & F.M.M. Morel (1983): Character reaction of organic copper-complexing agents released by *Daphnia magna*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40:1270-1277.
- Florence, T.M., G.M. Morrison & J.L. Stauber, 1992. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Sci. Total Environ.* 125: 1-13.
- Fuhrman, J.A. & F. Azam, 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- Gavis, J. & R.R.L. Guillard & B.L. Woodward, 1981. Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. *J. Mar. Res.* 39: 315-333.
- Gerringa, L.J.A., T.C.W. Poortvliet & H. Hummel, 1996. Comparison of chemical speciation of copper in the Oosterschelde and Westerschelde estuaries, The Netherlands. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42: 629-643.
- Graneli, E., H. Persson & L. Edler, 1986. Connection between trace metals, chelators and red tide blooms in the Laholm Bay, SE Kattegat - An experimental approach. *Mar. Environm. Res.* 18: 61-78.
- Hautala, K., J. Peuravuori & K. Pihlaja, 2000. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. *Wat. Res.* 34: 246-258.
- Hering, J.G. & F.M.M. Morel, 1988. Humic acid complexation of calcium and copper. *Environ. Sci. Technol.* 22: 1234-1237.
- Hooftman, R.N., D. van Drongelen-Sevenhuijsen & A. Akdemir, 2000d. De acute toxiciteit van koper voor de watervlo *Daphnia magna* wanneer getoetst in zes Nederlandse oppervlaktewaters en in een standaard water. IV. Oktober 2000. TNO Rapport V2303/04, TNO Voeding, Delft, pp. 34
- Hooftman, R.N., D. van Drongelen-Sevenhuijsen & A. Akdemir, 2000c. De acute toxiciteit van koper voor de watervlo *Daphnia magna* wanneer getoetst in zes Nederlandse oppervlaktewaters en in een standaard water. III. Juli 2000. TNO Rapport V2303/03, TNO Voeding, Delft, pp. 34
- Hooftman, R.N., D. van Drongelen-Sevenhuijsen & B. Borst, 2000a. De acute toxiciteit van koper voor de watervlo *Daphnia magna* wanneer getoetst in zes Nederlandse oppervlaktewaters en in een standaard water. I. Januari 2000. TNO Rapport V2303/01, TNO Voeding, Delft, pp. 35

- Hooftman, R.N., D. van Drongelen-Sevenhuijsen & B. Borst, 2000b. De acute toxiciteit van koper voor de watervlo *Daphnia magna* wanneer getoetst in zes Nederlandse oppervlaktewaters en in een standaard water. II. April 2000. TNO Rapport V2303/02, TNO Voeding, Delft, pp. 35.
- Hooftman, R.N., B. Borst & D. van Drongelen-Sevenhuijsen, 1999. De acute toxiciteit van koper voor de watervlo *Daphnia magna* wanneer getoetst in water met verschillend DOC gehalte. TNO Rapport V99.163, TNO Voeding, Delft, pp. 30.
- Jak R.G., J.L. Maas & M.C.Th. Scholten, 1996. Evaluation of laboratory derived toxic effects of a mixture of metals by testing fresh water plankton communities in enclosures. *Water Res.* 30: 1215-1227.
- Jenne, E.A. (Ed.), 1979. Chemical modelling in aqueous systems: speciation, sorption, solubility and kinetics. ACS Symp. Ser. 93. pp.194
- Karman, C. & R.G. Jak, 1997. Evaluation of the applicability of risk assessment methodologies for essential elements. TNO-report. TNO-MEP- R 97/306. Apeldoorn, 1997
- Karman, C.C., R.G. Jak & K.J.M. Kramer, 1998. Risk assessment of copper as a marine antifoulant. In: SETAC 1998, 15-19 November 1998, Charlotte NC, USA, Abstracts
- Karman, C.C., K.J.M. Kramer & R.G. Jak, 1999. Bioavailability of copper in the marine environment - an ecological risk assessment for releases from copper based anti-fouling paints. TNO-MEP/Mermayde report CR97-032, TNO, Apeldoorn
- Karman C.C. & R.G. Jak, 1998. Evaluation of the applicability of risk assessment methodologies for essential elements. TNO-MEP report R97/306.
- Karman, C.C.; Jak, R.G., Kramer, K.J.M., 1998. Risk assessment of copper as a marine antifoulant.. In: SETAC 1998, 15-19 November 1998, Charlotte NC, USA, Abstracts
- Karman, C.C., K.J.M. Kramer, & R.G. Jak, 1999. Deterministic model for the prediction of the bioavailable copper concentration in a marine environment TNO-MEP/Mermayde report CR98-382, TNO, Den Helder, pp. 60.
- Kim, S.D., H.Z. Ma, H.E. Allen & D.K. Cha, 1999. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2433-2437.
- Koivisto, S., M. Ketola & M. Walls, 1992. Comparison of five cladoceran species in short- and long term copper exposure. *Hydrobiol.* 248: 125-136.
- Khangarot, B.S., P.K. Ray & H. Chandra, 1987. Preventive effects of amino acids on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Water Air Soil Pollut.* 32:379-387.
- Kooijman, S.A.L.M., 1981. Parametric analyses of mortality rates in bioassays. *Water Res.* 15: 107-119.
- Kraak, M.H.S., M. Toussaint, D. Lavy & C. Davids, 1994. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Poll.* 84: 139-143
- Kramer, C.J.M., 1985. On the copper complexation capacity in the marine environment. Thesis. Univ. of Groningen, The Netherlands., pp. 133.
- Kramer, C.J.M. & D. van de Meent, 1988. Application of chemical speciation models. In: Manual on aquatic ecotoxicology, H.A.M. De Kruijf, D. De Zwart, P.N. Visvanathan & P.K. Ray (Eds.), Allied Publ. PVT Ltd., New Delhi, pp. 95-99
- Kramer, K.J.M., H.A. Jenner & D. de Zwart, 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiol.* 188/189: 433-443
- Kramer, K.J.M., U.H. Brockmann & R.M. Warwick, 1994. Tidal estuaries: Manual on sampling and analytical procedures. Balkema Publ., Rotterdam, pp. 314
- Kramer, K.J.M. & E.M. Foekema, 2000. The "Musselmonitor®" as biological early warning system: The first decade. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: A handbook; Vol. II; F.M. Butterworth, M.E. Gensebatt Bonaparte & A. Gunatilaka (Eds). Plenum, New York, pp. 59-87.
- Langston, W.J. & G.W. Bryan, 1984. The relationships between metal speciation in the environment and bioaccumulation in aquatic organisms. In: Complexation of trace metals in natural waters, C.J.M. Kramer & J.C. Duinker (Eds.). Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, pp. 375-392.

- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Sci. Total Environ.* 28: 1-22.
- Ma, H.Z., S.D. Kim, D.K. Cha & H.E. Allen, 1999a. Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 828-837.
- Ma, M, Z. Tong, Z. Wang & W. Zhu, 1999b. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio-qinghaiensis* sp. Nov.-Q67. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62: 247-253.
- Martell, & Smith (Eds), 1995. Critical stability constants. NIST Standard Reference Database 46, Version 2.0, NIST, Gaithersburg
- McCarty, L.S. & D. Mackay, 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1719-1728.
- McCarty, L.S., D. Mackay, A.D. Smith, G.W. Ozburn, & D.G. Dixon, 1993. Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARS from aquatic bioassays polar narcotic organics. *Ecotox. Environ. Safety*, 25: 253-270.
- Markager, S. & W.F. Vincent, 2000. Spectral light attenuation and the absorption of UV and blue light in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 45: 642-650.
- Meador, J.P., 1991. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquat. Toxicol.* 19:13-32.
- Miller, L.A. & K.W. Bruland, 1994. Determination of copper speciation in marine waters by competitive ligand equilibration/Liquid-liquid extraction: an evaluation of the technique. *Anal. Chim. Acta*, 284: 573-586
- Min. V&W, 1998. Waterkader. Vierde nota waterhuishouding. Regeringsbeslissing. Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Den Haag.
- Moffet, J.W. & L.E. Brand, 1996. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnol. Oceanogr.* 41: 388-395.
- Morel, F.M.M., 1983. Principles of aquatic chemistry. John Wiley & Sons, New York, pp. 446
- Morris, O.P. & G. Russell, 1973. Effect of chelation on toxicity of copper. *Mar. Pollut. Bull.* 4: 159-160.
- Mouvet, C. & A.C.M. Bourg, 1983. Speciation (including adsorbed species) of copper, lead, nikkel and zinc in the Meuse river. Observed results compared to values calculated with a chemical equilibrium program. *Wat. Res.* 17: 641-649.
- OECD, 1984. Guideline for Testing of Chemicals. No. 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 1997. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM/(98)17.
- Paulauskis, J.D. & R.W. Winner, 1988. Effects of water hardness and humic acid on zinc toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol.* 12, 273-290.
- Peereboom, I., 1992. De invloed van de koperconcentratie en de blootstellingstijd op de accumulatie in de mossel (*Mytilus edulis*). Stageverslag, IMW-TNO, Den Helder, pp. 51.
- Perdue, E.M., 1989. Effect of humic substances on metal speciation. In: E.H. Suffet, P. MacCarthy (Eds.), *Aquatic humic substances - influence on fate and treatment of pollutants*. ACS, Washington D.C., pp. 281-295.
- Prichard, E., 1995. Quality in the analytical chemistry laboratory. Wiley, Chichester, pp. 307 (of de Nederlandse bewerking: Prichard, E., 2000. Kwaliteit in het analytisch chemisch laboratorium. Rapport: EU 19088 NL, Europese Commissie, Luxembourg, pp.116).
- Renner, R., 1997. Rethinking water quality standards for metals toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 31: 466-468.
- Rijkeboer, M., A.G. Dekker & H.J. Gons, 1998. Subsurface irradiance reflectance spectra of inland waters differing in morphometry and hydrology. *Aquat. Ecol.* 31: 313-323.
- Sijm, D., T. Crommentuijn, H. Eijsackers & W. Peijnenburg (Eds), 1999. Verslag Workshop Onderzoek naar essentiële metalen (zoals zink en koper) ten behoeve van de afleiding van milieukwaliteitsnormen in Nederland, 11 maart 1999, Ede. RIVM, Bilthoven.

- Simkiss, K. & M.G. Taylor, 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Rev. Aquat. Sci.* 1:173-188.
- Slijkerman, D.M.E., C.A.M. van Gestel & N.M. van Straalen, 2000. Conceptueel kader voor de afleiding van ecotoxicologische risicogrenzen voor essentiële metalen. Rapport D00020, Instituut voor Ecologische Wetenschappen, Vrije Universiteit, Amsterdam, pp. 59.
- Smies M., 1983. Biological aspects of trace element speciation in the aquatic environment. In: Trace element speciation in surface waters and its ecological implications, G.G. Leppard (Ed.). Plenum, New York, pp. 177-193.
- Sprague, J.B., 1985. Factors that modify toxicity. In: Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (Eds.): *Fundamentals of Aquatic Toxicology - Methods and Applications*. Hemisphere Publ., Washington DC, pp. 123-163.
- Stackhouse, R.A. & W.H. Benson, 1989. Interaction of humic acids with selected trace metals: influence on bioaccumulation in daphnids. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 639-644.
- Stauber, J.L., R.J. Benning, L.T. Hales, R. Eriksen & B. Nowak, 2000. Copper bioavailability and amelioration of toxicity in Macquarie Harbour, Tasmania, Australia. *Marine Freshw. Res.* 51: 1-10
- Stedmon, C.A., S. Markager & H. Kaas, 2000. Optical properties and signatures of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in Danish coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51: 267-278.
- Sunda, W. & R.R.L. Guillard, 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34: 511-529
- Sunda, W.G. & J.A.M. Lewis, 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.* 23: 870-876
- Sunda, W.G. & A.K. Hanson, 1987. Measurement of free cupric ion concentration in seawater by a ligand competition technique involving copper sorption onto C18 SEP-PAK cartridges. *Limnol. Oceanogr.* 32: 537-551
- Sunda, W.G., P.A. Tester & S.A. Huntsman, 1987. Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Mar. Biol.* 94: 203-210
- Sunda, W.G. & S.A. Huntsman, 1991. The use of chemiluminescence and ligand competition with EDTA to measure copper concentration and speciation in seawater. *Mar. Chem.* 36:137-163
- Sunda, W.G., D. Klaveness & A.V. Palumbo, 1984. Bioassays of cupric ion activity and copper complexation. C.J.M. Kramer & J.C. Duinker (eds.). *Complexation of trace metals in natural waters*. Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, pp. 393-410
- Tamis, J., 1994. De invloed van chemische speciatie van koper op het klepbewegingsgedrag van de mossel *Mytilus edulis*. MSc thesis, Free University Amsterdam, pp. 48.
- Tao, S., & T. Liang, 1997. Long-term monitoring of bio-available copper in the aquatic environment using resin-filled dialysis membrane. *Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 712-719.
- Thomulka, K.W., D.J. McGee & J.H. Lange, 1993. Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 538-544
- Thurman, E.M., 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Nijhoff/Junk Publ., Dordrecht, pp. 497
- Tubbing, D.M.J., W. Admiraal, R.F.M.J. Cleven, M. Iqbal, D. van de Meent & W. Verweij, 1994. The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Wat. Res.* 28: 37-44
- van Beusekom, S.A.M., W. Admiraal, A. Sterkenburg, & D. de Zwart, 1999. Handleiding PAM-test. RIVM-ECO notitie 98/09, Bilthoven.
- van de Meent, D., R.F.M.J. Cleven, G.M.J. Tubbing, F.G. van Esseveld, P.M. Wolfs & W. Admiraal, 1993. Invloed van EDTA op speciatie en toxiciteit van koper in Dutch Standard Water: een voltammetrisch, ecotoxicologisch en modelmatig onderzoek. RIVM report 718910 001, Bilthoven, pp.58
- van der Hoeven, N., 1991. LC50 estimates and their confidence intervals derived for tests with only one concentration with partial effect. *Water Res.* 25: 401-408.

- van Hattum, B., K.R. Timmermans & H. Govers, 1990. Abiotic and biotic factors influencing bioavailability of trace metals to aquatic invertebrates in freshwater ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 275-292.
- van Hattum, B., G. Korthals, P. Leonards, M. Smit & A. de Jongh, 1992. Biological monitoring of PCBs in a former otter-habitat (Oude Venen, Friesland). Report no. R-92/04. Institute for Environmental Studies, Free University, Amsterdam.
- van Hattum, A.G.M., N. van Straalen & H. Govers, 1996. Trace metals in populations of freshwater isopods - influence of biotic and abiotic variables. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 303-318.
- van Hattum, B., M.J. Curto Pons & J.F. Cid Montañés, 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater isopods and field-partitioning between abiotic phases. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 257-267.
- van Wezel, A.P., D.T.H.M. Sijm, W. Seinen & A. Opperhuizen, 1995. Use of lethal body burdens to indicate species differences in susceptibility to narcotic toxicants. *Chemosphere*, 31: 3201-3209.
- Warnock, R.E., W.W.C. Gieskes & S. van Laar, 1999. Regional and seasonal differences in light absorption by yellow substance in the Southern Bight of the North Sea. *J. Sea Res.* 42: 169-178.
- Verbruggen, E.J.M., 1999. Predicting hydrophobicity, bioconcentration and baseline toxicity of complex organic mixtures. Thesis. University of Utrecht.
- Verweij, W., 1996. GECHEQ 6: the Manual. RIVM, Bilthoven, pp. 62.
- Verweij, W., 2000. Equilibria and constants in CHEAQS: selection criteria, sources and assumptions. Bilthoven, pp. 92
- Wang, W., 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms - overview. *Environ. Internat.* 13:437-457.
- Wetzel, R.G., 1983. *Limnology*. Saunders College Publishing, Orlando, USA.
- Wilson, D.E., 1978. An equilibrium model describing the influence of humic materials on the speciation of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in fresh water. *Limnol. Oceanogr.* 23: 499-507.
- Winner, R.W., 1984. The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquat. Toxicol.* 5, 267-274.
- Winner, R., 1985. Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.* 19: 449-455.
- Winner, R.W. & J.D. Gauss, 1986. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aquat. Toxicol.* 8:149-161.
- Winner, R.W., H.A. Owen & M.V. Moore, 1990. Seasonal variability in the sensitivity of freshwater lentic communities to a chronic copper stress. *Aquat. Toxicol.* 17:75-92.
- Wright, D.A., 1978. Heavy metal accumulation by aquatic invertebrates. *Appl. Biol.* 3, 331-394.
- Xue, H.B. & W.G. Sunda, 1997. Comparison of $[\text{Cu}^{2+}]$ measurements in lake water determined by ligand exchange and cathodic stripping voltammetry and by ion-selective electrode. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1902-1909
- Xue, H.B. & L. Sigg, 1993. Free cupric ion concentration and $\text{Cu}(\text{II})$ speciation in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1200-1213.
- Zhang, H. & W. Davison, 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solutions. *Anal. Chem.* 67: 3391-3400
- Zhang, H., W. Davison, B. Knight & S. McGrath, 1998. In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. *Environ. Sci. Technol.* 32: 704-710.
- Zhou, X., D.E. Slauenwhite, R.J. Pett & P.J. Wangersky, 1989. Production of copper-complexing organic ligands during a diatom bloom: tower tank and batch-culture experiments. *Mar. Chem.* 27: 19-30

- Zirino, A., D.A. VanderWeele, S.L. Belli, R. DeMarco & D.J. Mackey, 1998. Direct measurement of Cu(II)_{aq} in seawater at pH 8 with the Jalpaite ion selective electrode. *Mar. Chem.* 61: 173-184.
- Zuehlke, R.W. & R.H. Byrne, 1984. Thermodynamic and analytical uncertainties in trace metal speciation calculations. In: C.J.M. Kramer & J.C. Duinker (eds.). *Complexation of trace metals in natural waters*. Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, pp. 181-186

11 ANNEXES

- Annex 1. Randvoorwaarden *Daphnia*-toetsen
- ANNEX 2. Resultaten 48h EC50 toets *Daphnia* (Fase I)
- ANNEX 3. Resultaten 48h EC50 toets *Daphnia* (Fase II-1: januari 2000)
- ANNEX 4. Resultaten 48h EC50 toets *Daphnia* (Fase II-2: april 2000)
- ANNEX 5. Resultaten 48h EC50 toets *Daphnia* (Fase II-3: juli 2000)
- ANNEX 6. Resultaten 48h EC50 toets *Daphnia* (Fase II-4: oktober 2000)
- ANNEX 7. pH tijdens monsternamen en toxiciteitstoetsen
- ANNEX 8. Interne koper concentraties en BCFs (*Daphnia*), Fase I
- ANNEX 9. Interne koper concentraties en BCFs (*Daphnia*), Fase II
- ANNEX 10. Invoermatrix speciatieberekeningen (januari 2000)
- ANNEX 11. Uitvoermatrix koperspeciatie-berekeningen (januari, natuurlijke Cu-concentraties)
- ANNEX 11. Uitvoermatrix koperspeciatie-berekeningen (januari, Cu-concentraties bij EC50)

ANNEX 1. Samenvatting van randvoorwaarden, zoals gemeten in de Daphnia-toetsen met koper, alsmede de in situ gemeten pH.

	Locatie						
Randvoorwaarden	Middensloot	Vinkeveen	Beneden Regge	Springendalse Beek	Rijn	Maas	DSW
<i>II-1: januari 2000</i>							
pH (in situ)	8.01	8.40	7.15	6.20	7.70	7.70	--
pH (toets)	8.2-8.7	8.4-8.5	8.1-8.3	6.6-8.0	8.2-8.3	8.2-8.3	8.0-8.1
min. O2 (mg/L)	8.7	8.7	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
T (oC)	20.0-20.4	19.9-20.4	20.1-20.6	20.2-20.4	20.2-20.4	20.1	19.6-20.0
<i>II-2: april 2000</i>							
pH (in situ)	8.61	8.22	7.44	6.52	7.88	8.16	--
pH (toets)	8.4 – 8.6	8.2 – 8.5	7.8 – 8.4	7.0 – 7.5	8.0 – 8.3	7.9 – 8.3	7.9 – 8.0
min. O2 (mg/L)	8.6	8.8	8.7	8.7	8.4	8.4	8.7
T (oC)	19.2 – 19.4	19.2 – 19.4	19.3 – 19.8	19.1 – 19.7	19.2 – 19.3	19.4	19.1 – 19.8
<i>II-3: juli 2000</i>							
pH (in situ)	7.71	8.41	7.62	6.79	7.70	7.88	--
pH (toets)	8.2 – 8.7	8.4 – 8.7	8.1 – 8.6	7.1 – 8.0	8.3 – 8.5	8.2 – 8.6	7.9 – 8.3
min. O2 (mg/L)	8.5	8.6	8.5	8.3	8.7	8.7	8.4
T (oC)	19.2 – 19.4	19.2 – 19.4	19.3 – 19.9	20.0 – 20.9	19.0 – 19.2	19.1 – 19.3	19.8 – 20.4
<i>II-4: oktober 2000</i>							
pH (in situ)	7.59	8.39	7.28	6.45	7.90	7.75	--
pH (toets)	8.1 – 8.4	8.2 – 8.6	7.8 – 8.5	7.7 – 8.3	8.2 – 8.4	8.1 – 8.5	7.7 – 8.0
min. O2 (mg/L)	8.5	8.4	8.3	8.3	8.4	8.5	8.4
T (oC)	19.3 – 20.6	19.3 – 20.5	19.2 – 20.0	19.3 – 20.4	19.5 – 20.6	19.4 – 20.4	19.4 – 20.7

ANNEX 2.

Resultaten van de acute toxiciteitstoets met *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in Vinkeveense plassen water in verschillende verdunningen met DSW, Fase I (nominale concentraties in µg Cu/L, 95% betrouwbaarheidsinterval)

Parameter (h = uren)	Effect	Nominale concentraties (95% CI) (µg Cu/L)
	<i>100% Vinkeveense plassen water</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	387 (340 - 442)
48h EC50	beweeglijkheid	276 (242 - 314)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	180
48h NOEC	conditie	180
Helling		7.5 (5.5 - 12.0)
	<i>75% Vinkeveense plassen water + 25% DSW.</i>	
24h EC50	Beweeglijkheid	285 (238 - 341)
48h EC50	Beweeglijkheid	157 (133 - 185)
48h EC100	Beweeglijkheid	320
48h NOEC	Beweeglijkheid (= 48h EC0)	100
48h NOEC	Conditie	100
helling		4.4 (3.2 - 6.7)
	<i>50% Vinkeveense plassen water + 50% DSW.</i>	
24h EC50	Beweeglijkheid	251 (219 - 288)
48h EC50	Beweeglijkheid	177 (158 - 198)
48h EC100	Beweeglijkheid	320
48h NOEC	Beweeglijkheid (= 48h EC0)	100
48h NOEC	Conditie	100
helling		7.6 (5.4 - 12.8)
	<i>25% Vinkeveense plassen water + 75% DSW.</i>	
24h EC50	Beweeglijkheid	ca. 100
48h EC50	Beweeglijkheid	100 (76-100)
48h EC100	Beweeglijkheid	180
48h NOEC	Beweeglijkheid (= 48h EC0)	56
48h NOEC	Conditie	56
Helling		te steil om te berekenen
	<i>100% DSW</i>	
24h EC50	Beweeglijkheid	51 (42 - 62)
48h EC50	Beweeglijkheid	31 (26 - 37)
48h EC100	Beweeglijkheid	56
48h NOEC	Beweeglijkheid (= 48h EC0)	10
48h NOEC	Conditie	10
Helling		3.9 (2.8 - 6.1)

ANNEX 3.

Resultaten van de acute toxiciteitstoets met *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II-1: januari 2000 (nominale concentraties in µg Cu/L, 95% betrouwbaarheidsinterval)

Parameter (h = uren)	Effect	Nominale concentraties (95% CI) (µg Cu/L)
	<i>Middensloot (Beemster).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	464 (393 - 549)
48h EC50	beweeglijkheid	314 (268 - 369)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	180
48h NOEC	conditie	180
helling		4.6 (3.4 - 7.3)
	<i>Vinkeveense plassen</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	473 (396 - 566)
48h EC50	beweeglijkheid	207 (175 - 244)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	100
48h NOEC	conditie	56
helling		4.2 (3.2 - 6.2)
	<i>Beneden Regge.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	371 (321 - 428)
48h EC50	beweeglijkheid	304 (264 - 350)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	180
48h NOEC	conditie	180
helling		5.6 (4.0 - 9.3)
	<i>Springendalse Beek.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	<10
48h EC50	beweeglijkheid	<10
48h EC100	beweeglijkheid	32
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	<10
48h NOEC	conditie	<10
helling		--
	<i>Rijn (Lobith).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	112 (98 - 128)
48h EC50	beweeglijkheid	87 (76 - 100)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	56
48h NOEC	conditie	56
helling		6.5 (4.7 - 11)
	<i>Maas (Keizersveer).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	118 (101 - 138)
48h EC50	beweeglijkheid	93 (80 - 108)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	56
48h NOEC	conditie	56
helling		5.0 (3.6 - 8.0)

	<i>Dutch standaard water (DSW)</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	56 (43 - 73)
48h EC50	beweeglijkheid	40 (33 - 50)
48h EC100	beweeglijkheid	>56
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	18
48h NOEC	conditie	5.6
helling		3.3 (2.3 - 5.8)

ANNEX 4.

Resultaten van de acute toxiciteitstoets met *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II-2: april 2000 (nominale concentraties in µg Cu/L, 95% betrouwbaarheidsinterval)

Parameter (h = uren)	Effect	Nominale concentraties (95% CI) (µg Cu/L)
	<i>Middensloot (Beemster).</i>	
24h EC50	Beweeglijkheid	> 320
48h EC50	Beweeglijkheid	> 320
48h EC100	Beweeglijkheid	> 320
48h NOEC	Beweeglijkheid (= 48h EC0)	320 ¹⁾
48h NOEC	conditie	180
helling	niet te bepalen	
	<i>Vinkeveense plassen</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	427 (246 – 741)
48h EC50	beweeglijkheid	151 (120 – 190)
48h EC100	beweeglijkheid	> 320
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	56
48h NOEC	conditie	56
helling		2.9 (2.1 – 4.9)
	<i>Beneden Regge.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	> 180
48h EC50	beweeglijkheid	> 180
48h EC100	beweeglijkheid	> 180
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	180 ¹⁾
48h NOEC	conditie	180 ¹⁾
helling	niet te bepalen	
	<i>Springendalse Beek.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	15 (12 – 19)
48h EC50	beweeglijkheid	9.2 (7.1 – 12)
48h EC100	beweeglijkheid	32
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	3.2
48h NOEC	conditie	1.8
helling		2.4 (1.8 – 3.5)
	<i>Rijn (Lobith).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	102 (86 – 121)
48h EC50	beweeglijkheid	69 (58 – 82)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	32
48h NOEC	conditie	32
helling		3.9 (2.9 – 5.6)
	<i>Maas (Keizersveer).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	88 (77 – 100)
48h EC50	beweeglijkheid	71 (61 – 81)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	32
48h NOEC	conditie	32
helling		6.8 (4.9 – 11.1)

	<i>Dutch standaard water (DSW)</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	48 (37 – 62)
48h EC50	beweeglijkheid	34 (28 – 43)
48h EC100	beweeglijkheid	> 56
48h NOEC	beweeglijkheid (= 48h EC0)	10
48h NOEC	conditie	10
helling		2.8 (2.0 – 4.6)

¹⁾ 10% onbeweeglijkheid is acceptabel volgens de guideline

ANNEX 5. Resultaten van de acute toxiciteitstoets met *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II-3: juli 2000 (nominale concentraties in µg Cu/L, 95% betrouwbaarheidsinterval)

Parameter (h = uren)	Effect	Nominale concentraties (95% CI) (µg Cu/L)
	<i>Middensloot (Beemster).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	632 (485 – 824)
48h EC50	beweeglijkheid	430 (363 – 510)
48h EC100	beweeglijkheid	> 560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	180
48h NOEC	conditie	180
helling		4.3 (3.0 – 8.0)
	<i>Vinkeveense plassen.</i>	
Parameter (h = uren)	Effect	
24h EC50	beweeglijkheid	526 (468 – 590)
48h EC50	beweeglijkheid	322 (288 – 360)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	180
48h NOEC	conditie	100
helling		7.6 (5.1 – 14.9)
	<i>Beneden Regge.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	488 (421 – 565)
48h EC50	beweeglijkheid	292 (253 – 337)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	180
48h NOEC	conditie	180
helling		5.5 (4.1 – 8.7)
	<i>Springendalse Beek.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	27 (23 – 32)
48h EC50	beweeglijkheid	14 (12 – 17)
48h EC100	beweeglijkheid	32
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	10
48h NOEC	conditie	5.6
helling		4.4 (3.2 – 7.0)
	<i>Rijn (Lobith).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	158 (129 – 193)
48h EC50	beweeglijkheid	99 (83 – 118)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	56
48h NOEC	conditie	56
helling		3.8 (2.8 – 6.0)
	<i>Maas (Keizersveer).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	154 (131 – 182)
48h EC50	beweeglijkheid	124 (106 – 146)
48h EC100	beweeglijkheid	> 180
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	56
48h NOEC	conditie	56
helling		4.8 (3.4 – 8.3)

	<i>Dutch standaard water (DSW)</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	82 (43 – 154)
48h EC50	beweeglijkheid	25 (19 – 33)
48h EC100	beweeglijkheid	> 56
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	10
48h NOEC	conditie	10
helling		2.0 (1.4 – 3.2)

ANNEX 6.

Resultaten van de acute toxiciteitstoets met *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II-4: oktober 2000 (nominale concentraties in $\mu\text{g Cu/L}$, 95% betrouwbaarheidsinterval)

Parameter (h = uren)	Effect	Nominale concentraties (95% CI) ($\mu\text{g Cu/L}$)
	<i>Middensloot (Beemster).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	512 (419 – 624)
48h EC50	beweeglijkheid	308 (260 – 365)
48h EC100	beweeglijkheid	> 560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	100
48h NOEC	conditie	100
helling		4.0 (2.9 – 6.3)
	<i>Vinkeveense plassen</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	512 (442 – 593)
48h EC50	beweeglijkheid	220 (190 – 254)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	100
48h NOEC	conditie	100
helling		5.6 (4.2 – 8.6)
	<i>Beneden Regge.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	489 (433 – 553)
48h EC50	beweeglijkheid	354 (315 – 397)
48h EC100	beweeglijkheid	560
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	180
48h NOEC	conditie	180
helling		8.5 (5.8 – 16.1)
	<i>Springendalse Beek.</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	11.5 (9.7 – 13.7)
48h EC50	beweeglijkheid	7.7 (6.4 – 9.1)
48h EC100	beweeglijkheid	32
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	1.8
48h NOEC	conditie	1.8
helling		3.9 (3.0 – 5.5)
	<i>Rijn (Lobith).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	133 (115 – 153)
48h EC50	beweeglijkheid	104 (91.6 – 119)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	56
48h NOEC	conditie	56
helling		6.4 (4.5 – 10.6)
	<i>Maas (Keizersveer).</i>	
24h EC50	beweeglijkheid	135 (116 – 158)
48h EC50	beweeglijkheid	109 (94.7 – 126)
48h EC100	beweeglijkheid	180
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	56
48h NOEC	conditie	56
helling		5.6 (4.0 – 9.4)

<i>Dutch standaard water (DSW)</i>		
24h EC50	beweeglijkheid	45.9 (39.0 – 54.0)
48h EC50	beweeglijkheid	21.3 (18.2 – 24.9)
48h EC100	beweeglijkheid	56
48h NOEC (= 48h EC0)	beweeglijkheid	5.6
48h NOEC	conditie	5.6
helling		4.8 (3.6 – 7.0)

Locatie	Periode	pH <i>in situ</i>	pH toetsen (range bij 48h)
Beemster	1	8.01	8.2-8.7
Middensloot	2	8.61	8.5-8.6
	3	7.71	8.7
	4	7.59	8.3-8.4
Vinkeveense Plassen	1	8.40	8.4-8.5
	2	8.22	8.5
	3	8.41	8.6-8.7
	4	8.39	8.6
Beneden Regge	1	7.15	8.1-8.3
	2	7.44	8.3-8.4
	3	7.62	8.6
	4	7.28	8.5
Springendalse Beek	1	6.20	6.6-6.7
	2	6.52	7.1-7.3
	3	6.79	7.6-8.0
	4	6.45	7.8-8.2
Rijn	1	7.70	8.2-8.3
	2	7.88	8.2-8.3
	3	7.70	8.5
	4	7.90	8.3-8.4
Maas	1	7.70	8.2-8.3
	2	8.16	8.2-8.3
	3	7.88	8.5-8.6
	4	7.75	8.4-8.5
DSW	1	--	8.0
	2	--	7.9-8.0
	3	--	8.1-8.3
	4	--	7.9-8.0

ANNEX 8.

Berekening van de bioconcentratie factoren voor *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase I (nominale water concentraties; onderstreepte waarden zijn schattingen)

	Cu-totaal water µg/L	Cu-Daphnia organisme mg/kg	BCF L/kg
Verdunning			
Vinkeveen 100%	<u>1.8</u> 56 100 180 320 560	33.08509 190.5845 164.1998 196.1435 278.8326 296.8842	18,381 3,403 1,642 1,090 871 530
Vinkeveen 75%	<u>1.5</u> 32 56 100 180 320	18.1 106.8 130.6 172.8 178.5 244.2	12,062 3,338 2,331 1,728 992 763
Vinkeveen 50%	<u>1.2</u> 32 56 100 180 320	35.1 139.3 194.4 209.5 227.2 274.9	29,235 4,354 3,471 2,095 1,262 859
Vinkeveen 25%	<u>0.8</u> 18 32 56 100 180	35.1 146.8 196.2 209.5 317.0 240.8	43,831 8,153 6,132 3,740 3,170 1,338
DSW 100%	<u>0.5</u> 5.6 10 18 32 56	37.4 151.7 176.0 154.9 403.0 215.2	74,720 27,089 17,597 8,606 12,593 3,842

ANNEX 9. Berekening van de bioconcentratie factoren voor *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II (nominale water concentraties; onderstreepte waarden zijn schattingen, cursieve waarden zijn gemeten (Cu-totaal(F)))

Locatie	Cu-totaal Cu-daphnia			Cu-totaal Cu-daphnia			Cu-totaal Cu-daphnia			Cu-totaal Cu-daphnia		
	water µg/L	organisme mg/kg	BCF L/kg	water µg/L	organisme mg/kg	BCF L/kg	water µg/L	organisme mg/kg	BCF L/kg	water µg/L	organisme mg/kg	BCF L/kg
	periode 1			periode 2			periode 3			periode 4		
Beemster	1.3	5.3	4,059	0.9	8.0	8,885	1.3	12.6	9,659	1.2	4.4	3,700
	56	92.1	1,645				56	103.6	1,849	56	110.4	1,971
	100	118.4	1,184	180	167.6	931						
	180	213.0	1,184	320	279.8	874	320	422.2	1,319	320	301.4	942
	320	447.3	1,398									
	560	656.2	1,172									
Vinkeveen	1.0	16.8	16,840	1.2	15.4	12,810	2.1	21.5	10,232	0.9	17.0	18,902
	56	104.3	1,862				56	193.1	3,448	56	144.6	2,583
	100	179.4	1,794	100	129.3	1,293						
	180	184.3	1,024	180	211.6	1,176	320	403.9	1,262	320	494.2	1,544
	320	405.7	1,268									
	560	730.6	1,305									
Beneden Regge	1.4	26.0	18,558	1.4	12.1	8,666	1.5	12.6	8,373	1.1	14.1	12,796
	56	156.9	2,802				56	134.3	2,399	56	146.7	2,619
	100	205.7	2,057	100	170.6	1,706						
	180	350.6	1,948	180	307.7	1,710	320	299.5	936	320	386.0	1,206
	320	309.4	967									
	560	506.8	905									
Springendalse Beek	0.4		0	0.05	44.1	882,576	0.5	21.5	43,057	0.5	21.2	42,469
	1.8		0				1.8	72.7	40,404	1.8	94.9	52,716
	3.2		0	3.2	63.3	19,776	3.2	84.5	26,405	3.2	157.2	49,140
	5.6		0				5.6	107.2	19,148			
	10		0				10	137.9	13,791			
	18		0	18	203.2	11,291	18	98.6	5,477	18	119.0	6,611
	32		0			32	168.0	5,251				

ANNEX 9. (vervolg) Berekening van de bioconcentratie factoren voor *Daphnia magna* na blootstelling aan koper in water uit de verschillende wateren voor de Fase II (nominale water concentraties; onderstreepte waarden zijn schattingen, cursieve waarden zijn gemeten (Cu-totaal(F))

Locatie	Cu-totaal	Cu-daphnia	BCF	Cu-totaal	Cu-daphnia	BCF	Cu-totaal	Cu-daphnia	BCF	Cu-totaal	Cu-daphnia	BCF
	water	organisme		water	organisme		water	organisme		water	organisme	
	µg/L	mg/kg	L/kg	µg/L	mg/kg	L/kg	µg/L	mg/kg	L/kg	µg/L	mg/kg	L/kg
	<i>periode 1</i>			<i>periode 2</i>			<i>periode 3</i>			<i>periode 4</i>		
Rijn	1.8	26.4	14,683	2.0	16.7	8,373	2.1	23.0	10,968	1.8	93.0	51,667
	18	87.3	4,848									
	32	128.4	4,012									
	56	147.2	2,628	56	311.2	5,557	56	234.1	4,180	56	191.8	3,425
	100	187.5	1,875	100	248.7	2,487	100	260.1	2,601	100	219.9	2,199
	180	146.8	816									
Maas	1.8	51.4	28,540	1.9	69.6	36,644	3.5	28.4	8,101	1.9	26.2	13,810
	18	68.3	3,797									
	32	97.7	3,053									
	56	140.4	2,507	56	316.1	5,645	56	193.4	3,454	56	277.1	4,948
	100	169.9	1,699	100	260.1	2,601	100	282.5	2,825	100	233.4	2,334
	180	545.2	3,029									
DSW	<u>0.5</u>	36.1	72,225				<u>0.5</u>	43.1	86,121	<u>0.5</u>	31.2	62,451
	5.6	114.4	20,424									
	10	151.9	15,193									
	18	258.0	14,335				18	185.9	10,329	18	236.9	13,161
	32	359.6	11,239									
	56	371.4	6,632				56	412.5	7,365	56	135.5	2,420

ANNEX 10. Invoer matrix voor de speciatie-berekeningen voor Fase II: januari 2000 (concentraties in M)

	DSW		Beemster		Vinkeveen		Beneden Regge		Springendalse Beek		Rijn		Maas	
monster	201	201	211	211	221	221	231	231	241	241	251	251	261	261
variabele	0	EC50	0	EC50	0	EC50	0	EC50	0	EC50	0	EC50	0	EC50
pH	8.91E-09	8.91E-09	3.16E-09	3.16E-09	3.55E-09	3.55E-09	6.31E-09	6.31E-09	5.01E-08	5.01E-08	5.62E-09	5.62E-09	5.62E-09	5.62E-09
Na	1.19E-03	1.19E-03	6.48E-03	6.48E-03	6.39E-03	6.39E-03	1.56E-03	1.56E-03	7.57E-04	7.57E-04	1.63E-03	1.63E-03	6.13E-04	6.13E-04
Mg	7.32E-04	7.32E-04	1.55E-03	1.55E-03	1.05E-03	1.05E-03	3.70E-04	3.70E-04	2.83E-04	2.83E-04	4.28E-04	4.28E-04	2.30E-04	2.30E-04
K	2.00E-04	2.00E-04	4.04E-04	4.04E-04	2.99E-04	2.99E-04	2.92E-04	2.92E-04	1.31E-04	1.31E-04	1.10E-04	1.10E-04	1.00E-04	1.00E-04
Ca	1.36E-03	1.36E-03	4.34E-03	4.34E-03	1.88E-03	1.88E-03	1.91E-03	1.91E-03	5.04E-04	5.04E-04	1.77E-03	1.77E-03	1.50E-03	1.50E-03
Cu	7.87E-09	6.37E-07	1.97E-08	4.96E-06	1.53E-08	3.27E-06	2.25E-08	4.81E-06	5.66E-09	1.63E-07	2.83E-08	1.40E-06	2.87E-08	1.49E-06
HCO3	1.39E-03	1.39E-03	9.46E-03	9.46E-03	3.92E-03	3.92E-03	3.10E-03	3.10E-03	1.44E-04	1.44E-04	2.69E-03	2.69E-03	2.43E-03	2.43E-03
SO4	7.32E-04	7.32E-04	1.93E-03	1.93E-03	9.75E-04	9.75E-04	6.11E-04	6.11E-04	3.28E-04	3.28E-04	5.32E-04	5.32E-04	4.00E-04	4.00E-04
Cl	2.72E-03	2.72E-03	5.47E-03	5.47E-03	8.74E-03	8.74E-03	1.66E-03	1.66E-03	8.72E-04	8.72E-04	2.30E-03	2.30E-03	8.27E-04	8.27E-04
DOC	0.000E+00	0.000E+00	1.730E-04	1.730E-04	1.420E-04	1.420E-04	1.470E-04	1.470E-04	3.700E-05	3.700E-05	5.000E-05	5.000E-05	5.300E-05	5.300E-05
[1L]	0.000E+00	0.000E+00	5.396E-05	5.396E-05	4.429E-05	4.429E-05	4.585E-05	4.585E-05	1.154E-05	1.154E-05	1.559E-05	1.559E-05	1.653E-05	1.653E-05
[2L]	0.000E+00	0.000E+00	2.046E-06	2.046E-06	1.680E-06	1.680E-06	1.739E-06	1.739E-06	4.376E-07	4.376E-07	5.914E-07	5.914E-07	6.269E-07	6.269E-07
[3L]	0.000E+00	0.000E+00	1.187E-05	1.187E-05	9.742E-06	9.742E-06	1.008E-05	1.008E-05	2.538E-06	2.538E-06	3.430E-06	3.430E-06	3.636E-06	3.636E-06
[4L]	0.000E+00	0.000E+00	1.036E-04	1.036E-04	8.501E-05	8.501E-05	8.800E-05	8.800E-05	2.215E-05	2.215E-05	2.993E-05	2.993E-05	3.173E-05	3.173E-05
[5L]	0.000E+00	0.000E+00	1.564E-06	1.564E-06	1.284E-06	1.284E-06	1.329E-06	1.329E-06	3.345E-07	3.345E-07	4.520E-07	4.520E-07	4.791E-07	4.791E-07

ANNEX 11.

Uitvoer matrix voor koper species uit de speciatie-berekeningen (CHEAQS) voor Fase II: januari 2000, voor de bemonsterde wateren, uitgaande van de natuurlijke koperconcentraties (concentraties in M, percentages als fractie van totaal koper)

	Beemster		Vinkeveen		Beneden Regge		Springendalse Beek		Rijn		Maas	
	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%
Speciation of: Cu												
free Cu(II) 2+	1.02E-11	0.05%	1.23E-11	0.08%	3.16E-11	0.14%	2.55E-10	4.51%	9.36E-11	0.33%	8.34E-11	0.29%
Cu(II)(OH) +	6.62E-11	0.34%	7.56E-11	0.49%	1.20E-10	0.53%	1.35E-10	2.39%	3.99E-10	1.41%	3.71E-10	1.29%
Cu(II)(OH)2 (aq)	3.64E-11	0.18%	3.77E-11	0.25%	3.46E-11	0.15%	1.34E-10	2.37%	1.30E-10	0.46%	1.22E-10	0.43%
Cu(II)(CO3) (aq)	3.61E-09	18.32%	1.85E-09	12.09%	2.50E-09	11.11%			7.26E-09	25.65%	6.29E-09	21.92%
Cu(II)(CO3)(OH) -	4.53E-10	2.30%	2.02E-10	1.32%	1.49E-10	0.66%			4.86E-10	1.72%	4.15E-10	1.45%
Cu(II)(CO3)2 2-	1.89E-09	9.59%	3.50E-10	2.29%	1.95E-10	0.87%			5.48E-10	1.94%	4.15E-10	1.45%
Cu(II)(SO4) (aq)							1.07E-11	0.19%				
Cu(II)(2L) (aq)	9.44E-09	47.92%	9.12E-09	59.61%	1.54E-08	68.44%	4.60E-09	81.27%	1.45E-08	51.24%	1.48E-08	51.57%
Cu(II)(3L) (aq)	7.96E-10	4.04%	7.75E-10	5.07%	1.35E-09	6.00%	4.13E-10	7.30%	1.53E-09	5.41%	2.83E-09	9.86%
Cu(II)(4L) (aq)	5.24E-10	2.66%	4.46E-10	2.92%	4.25E-10	1.89%	1.57E-11	0.28%	5.41E-10	1.91%	5.40E-10	1.88%
Cu(II)(5L) (aq)	2.87E-09	14.57%	2.43E-09	15.88%	2.33E-09	10.36%	8.75E-11	1.55%	2.83E-09	10.00%	2.83E-09	9.86%
Cu (s)	8.97E-26	0.00%	1.17E-25	0.00%	3.41E-25	0.00%	3.17E-24	0.00%	1.01E-24	0.00%	9.53E-25	0.00%
Dissolved species	1.97E-08		1.53E-08		2.25E-08		5.66E-09		2.83E-08		2.87E-08	
Solid species	8.97E-26		1.17E-25		3.41E-25		3.17E-24		1.01E-24		9.53E-25	
Total concentration	1.97E-08		1.53E-08		2.25E-08		5.66E-09		2.83E-08		2.87E-08	

ANNEX 12.

Uitvoer matrix voor koper species uit de speciatie-berekeningen (CHEAQS) voor Fase II: januari 2000, voor de toets-media uitgaande van de koperconcentraties bij de berekende EC50 *Daphnia* (concentraties in M, percentages als fractie van totaal koper)

	Beemster		Vinkeveen		Beneden Regge		Springendalse Beek		Rijn		Maas	
	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%	[M]	%
Speciation of: Cu												
free Cu(II) 2+	6.60E-09	0.13%	1.08E-08	0.33%	3.58E-08	0.74%	3.21E-08	19.69%	1.17E-08	0.84%	1.15E-08	0.77%
Cu(II)(OH) +	4.29E-08	0.86%	6.61E-08	2.02%	1.36E-07	2.83%	1.70E-08	10.43%	4.98E-08	3.56%	5.13E-08	3.44%
Cu(II)(OH)2 (aq)	2.35E-08	0.47%	3.30E-08	1.01%	3.93E-08	0.82%	6.43E-10	0.39%	1.62E-08	1.16%	1.69E-08	1.13%
Cu(II)(CO3) (aq)	2.34E-06	47.18%	1.62E-06	49.54%	2.84E-06	59.04%	1.69E-08	10.37%	9.04E-07	64.57%	8.70E-07	58.39%
Cu(II)H(CO3) +							2.05E-10	0.13%				
Cu(II)(SO4) (aq)							1.35E-09	0.83%				
Cu(II)(CO3)(OH) -	2.93E-07	5.91%	1.77E-07	5.41%	1.69E-07	3.51%			6.05E-08	4.32%	5.74E-08	3.85%
Cu(II)(CO3)2 2-	1.22E-06	24.60%	3.06E-07	9.36%	2.20E-07	4.57%			6.83E-08	4.88%	5.73E-08	3.85%
Cu(II)(1L) (aq)							1.80E-10	0.11%				
Cu(II)(2L) (aq)	1.98E-07	3.99%	1.65E-07	5.05%	1.72E-07	3.58%	4.10E-08	25.15%	5.77E-08	4.12%	6.13E-08	4.11%
Cu(II)(3L) (aq)	3.59E-07	7.24%	4.00E-07	12.23%	6.09E-07	12.66%	4.32E-08	26.50%	1.23E-07	8.79%	2.47E-07	16.58%
Cu(II)(4L) (aq)	3.29E-07	6.63%	3.73E-07	11.41%	4.57E-07	9.50%	1.98E-09	1.21%	6.59E-08	4.71%	7.30E-08	4.90%
Cu(II)(5L) (aq)	1.44E-07	2.90%	1.21E-07	3.70%	1.27E-07	2.64%	8.30E-09	5.09%	4.03E-08	2.88%	4.30E-08	2.89%
Cu (s)	5.80E-23	0.00%	1.03E-22	0.00%	3.86E-22	0.00%	3.99E-22	0.00%	1.26E-22	0.00%	1.32E-22	0.00%
Dissolved species	4.96E-06	100.00%	3.27E-06	100.00%	4.81E-06	100.00%	1.63E-07	100.00%	1.40E-06	100.00%	1.49E-06	100.00%
Solid species	5.80E-23	0.00%	1.03E-22	0.00%	3.86E-22	0.00%	3.99E-22	0.00%	1.26E-22	0.00%	1.32E-22	0.00%
Total concentration	4.96E-06	100.00%	3.27E-06	100.00%	4.81E-06	100.00%	1.63E-07	100.00%	1.40E-06	100.00%	1.49E-06	100.00%

