

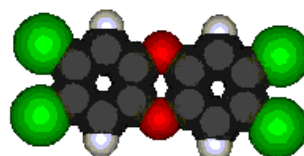
Dioxine-achtige toxiciteit in baggerslib van het Zeehavenkanaal, Delfzijl

**Toxiciteit Identificatie en Evaluatie
(TIE) met DR-CALUX**

H.J.C. Klamer, J. Jorritsma, L. van Vliet,
F. Smedes en J.F. Bakker

Dioxine-achtige toxiciteit in baggerslib van het Zeehavenkanaal, Delfzijl

Toxiciteit Identificatie en Evaluatie
(TIE) met DR-CALUX



Inhoudsopgave

Om kort te gaan ...	
Samenvatting	1
1. Inleiding	4
1.1 Dioxine-achtige toxiciteit	4
1.2 Organisatie en opzet van de RIKZ DR-CALUX TIE-studie	4
2. Opzet en Uitvoering	8
2.1 Bemonstering Zeehavenkanaal sediment	8
2.2 Literatuurstudie	10
2.3 Screening	10
2.4 Interactiestudie	11
2.5 DR-CALUX TEF waarden	11
2.6 Niet-destructieve zuivering	12
2.7 Bio-mimetische bemonstering	12
3. Resultaten en Discussie, onderdeel I Uitvoering volgens SPECIE-01 protocol	13
3.1 DR-CALUX activiteit	13
3.2 Interactiestudie	15
3.3 Literatuurstudie	16
3.4 Screening	17
3.5 Biologische beschikbaarheid van de chemisch geëxtraheerde stoffen	17
4. Resultaten en Discussie, onderdeel II: uitvoering met niet-destructieve zuivering	18
4.1 DR-CALUX activiteit	18
4.2 Interactiestudie	19
4.3 Screening	19
4.4 Biologische beschikbaarheid van de chemisch geëxtraheerde stoffen	20
5. Conclusies en Aanbevelingen	21
6. Literatuur	23
7. Bijlage	25

Om kort te gaan ...

Uit onderzoek naar de consequenties van een herziening van de normering voor zoute baggerspecie, het invoeren van de Chemie-Toxiciteit-Toets (CCT), is naar voren gekomen dat extracten van baggerspecie uit het Zeehavenkanaal van Delfzijl activiteit laten zien in een biologische test voor dioxine-achtige toxiciteit (DR-CALUX). Onderzocht is welke stoffen verantwoordelijk kunnen zijn voor die activiteit.

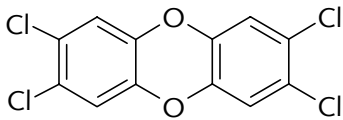
De belangrijkste bevindingen zijn:

1. In oktober 2002 is het sediment van het Zeehavenkanaal bemonsterd en op dioxine-achtige activiteit onderzocht m.b.v. de SPECIE-01 procedure. De DR-CALUX activiteit bedroeg 43 ± 12 pgTEQ.g⁻¹. Hiermee voldoet het baggerslib aan de voorlopige CTT-norm van 50 pgTEQ.g⁻¹. Deze activiteit kon voor ca. 46% worden verklaard door de aanwezigheid van bekende dioxine-achtige stoffen (dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs). Van de overige activiteit is de oorzaak onbekend. Het vermoeden bestaat dat deze wordt veroorzaakt door niet-geanalyseerde dioxine-achtige stoffen.
2. Een nieuwe analyseprocedure heeft meer dioxine-achtige activiteit in het sediment aangetoond dan volgens de SPECIE-01 procedure is gemeten: ruim 100 x zo veel. Een klein deel van deze (extra) activiteit kon worden verklaard door de aanwezigheid van PAK's. Het overgrote deel van de (extra) activiteit kon niet worden verklaard.
3. Uit onderzoek met een bio-mimetische extractieprocedure bleken de in het sediment aanwezige dioxine-achtige stoffen maar weinig beschikbaar te zijn voor opname door organismen; dit geldt voor beide analyseprocedures.
4. Aanbevolen wordt onderzoek uit te voeren naar de chemische aard van de extra gemeten activiteit en de chemische aard van de stoffen die beschikbaar zijn voor opname door organismen én die een activiteit hebben in de DR-CALUX test.
Uitvoering van dit onderzoek kan de aandacht verschuiven naar 'nieuwe' stoffen waarop (nieuw of gewijzigd) brongericht beleid gemaakt en brongericht beheer gevoerd kan worden.

Samenvatting

De Chemie-Toxiciteit-Toets (CTT) introduceert effectgerichte beoordeling van baggerspecie en havensediment in het Nederlandse beleid ten aanzien van het verlenen van vergunningen, c.q. ontheffingen binnen WVO en WVZ.

De DR-CALUX test is onderdeel van de CTT. Met deze test wordt de aanwezigheid van stoffen met een dioxine-achtige toxiciteit bepaald.



2,3,7,8-tetrachloordibenzodioxine, "TCDD", "dioxine"

De DR-CALUX geeft een respons bij blootstelling aan dioxineachtige stoffen zoals dioxines zelf, maar ook dibenzofuranen en platte PCBs. De gemeten activiteit van een sedimentextract wordt gerelateerd aan de respons van dioxine en uitgedrukt in dioxine-equivalenten, "toxic equivalents", TEQ.

Ter voorbereiding op de invoering van de CTT heeft Rijkswaterstaat, Directie Noord-Nederland, aan het RIKZ gevraagd de in het verleden gemeten DR-CALUX activiteit in het sediment van het Zeehavenkanaal chemisch te verklaren.

Vanuit het Directoraat-Generaal Water (DGW) is gevraagd te rapporteren over nieuwe inzichten in de milieuchemische aspecten van de huidige wijze van uitvoering van de DR-CALUX test.

Doel van deze studie was daarom tweeledig:

- I Het identificeren en kwantificeren (= chemisch verklaren) van de stoffen die ten grondslag liggen aan de gemeten dioxine-achtige activiteit, zodat het eventueel mogelijk wordt de bron van de veroorzakende stoffen op te sporen;
- II Vaststellen van de invloed van wijzigingen in het chemische voortraject van de DR-CALUX test (extractie, zuivering) op de respons en de chemische verklaarbaarheid hiervan.

Het type onderzoek dat hiervoor nodig is heet Toxiciteit Identificatie en Evaluatie, TIE. Om een TIE uit te kunnen voeren heeft RIKZ eerder het QPID¹ systeem ontwikkeld, dat bestaat uit een database waarin de chemisch-analytische en toxicologische eigenschappen van stoffen zijn opgeslagen. De onderliggende software van QPID identificeert de stoffen en de mate waarin deze kunnen bijdragen aan de waargenomen activiteit.

De Zeehavenkanaalstudie, en daarmee dit rapport, is in twee delen opgesplitst:

- I. Uitvoering van de DR-CALUX test strikt volgens het vigerende protocol (RIKZ-SPECIE 01). Hierbij worden stoffen uit een sediment- of baggerslibmonster na chemische extractie en een chemisch destructieve zuiveringsprocedure aan de biologische test toegevoegd. Dit onderdeel is door DNN gefinancierd.
- II. Uitvoering van de DR-CALUX test volgens een protocol waarbij een niet-destructieve zuiveringsprocedure wordt toegepast. De samenstelling van het te toetsen monster komt daardoor beter overeen met wat organismen bij blootstelling in het veld ondervinden. Tevens is een procedure onderzocht om de biologische

¹ QPID: Quality Peak Identification and Database

beschikbaarheid van de actieve stoffen in het sediment te toetsen. Doel hiervan is een resultaat te krijgen dat nog meer de werkelijke veldsituatie benadert. Dit deel van de studie is door DGW (voorheen WONS) gefinancierd.

Baggerslib van het Zeehavenkanaal voldoet aan de voorlopige CTT-norm voor dioxine-achtige toxiciteit.

Deel I: Uitvoering van de test volgens het vigerende SPECIE-01 protocol.

In oktober 2002 is het sediment van het Zeehavenkanaal bemonsterd. De DR-CALUX activiteit bedroeg 43 ± 12 pgTEQ.g⁻¹ (picogram dioxine-equivalent per gram baggerslib, op basis van de droge stof^{*}). Hiermee voldoet het baggerslib aan de voorlopige CTT-norm van 50 pgTEQ.g⁻¹.

De gemeten activiteit is vergelijkbaar met die uit 1999 (32 pg TEQ.g⁻¹; Stronkhorst *et al.*, 2002).

In de wetenschappelijke literatuur worden ruim 430 stoffen van antropogene en natuurlijke oorsprong en aard beschreven, die een bewezen of verwachte respons in de DR-CALUX test hebben. De eigenschappen van deze stoffen zijn, voor zover ze bekend zijn, opgenomen in de QPID database.

De gemeten activiteit kan voor 46% worden verklaard door de aanwezigheid van bekende dioxine-achtige stoffen.

De concentraties van de bekende dioxine-achtige stoffen (dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs) konden samen ca. 46% van de gemeten activiteit verklaren. Dit resultaat is gunstiger dan dat van een eerder, verkennend onderzoek: het percentage verklaarde toxiciteit is hoger (46% in plaats van 29%).

De procentuele bijdrage van bekende dioxine-achtige stoffen aan de gemeten activiteit is de laatste vier jaar niet significant gewijzigd. Er zijn aanwijzingen dat er sprake is van een oude, stabiele bron, wellicht nalevering vanuit onderliggende sedimentlagen.

In het sedimentextract werden na screening met QPID-TIE niet méér stoffen met een potentiële activiteit in de DR-CALUX test gä dentificeerd. Dit komt doordat:

(a) de voorgeschreven, chemisch destructieve zuiveringsprocedure: alleen zeer stabiele stoffen 'overleven' de zuivering. Potentieel actieve stoffen als PAKs en gebromeerde vlamvertragers hebben daardoor een lage opbrengst. Hierdoor blijven slechts zeer lage gehalten van deze stoffen in het extract over, die niet met een standaard screening vastgesteld kunnen worden. Screening met een gevoeliger systeem kan uitkomst bieden;

(b) niet alle 430 stoffen uit de literatuurdatabase (zie I-2) kunnen vanwege hun fysisch-chemische eigenschappen met de analytisch-chemische methode van het screenings-systeem geanalyseerd worden.

In baggerslib komen stoffen voor die de activiteit van dioxine in de DR-CALUX test verhogen.

Er zijn aanwijzingen dat zich in het extract onbekende stoffen bevinden die de activiteit van dioxine in de DR-CALUX test verhogen. Door dit effect wordt de door dioxine-achtige stoffen veroorzaakte activiteit versterkt. Met nadruk moet echter worden vermeld dat het hier om voorlopige resultaten gaat.

Deel II: Uitvoering van de test met gebruik van nieuwe technieken

Door RIKZ is een zuiveringsprocedure gebruikt (Gel Permeatie Chromatografie, GPC) die het aanwezige stoffenmengsel nagenoeg intact laat. Hierdoor kunnen vrijwel alle stoffen die in het slibextract aanwezig zijn aan de biologische test aangeboden worden.

De uitslag in de DR-CALUX test is ruim 100 keer hoger dan de uitslag die met het vigerende voorschrift (SPECIE-01) is gemeten. Onderzoek van RIKZ naar baggerspecie uit de Rotterdamse haven en in sediment van de Noordzee gaf

Wanneer een niet-destructieve zuivering wordt toegepast, is de DR-CALUX activiteit ca. 100 maal hoger dan na uitvoering volgens het vigerende voorschrift.

* 1 picogram is een miljoenste van een miljoenste gram

een vergelijkbaar verschil (factor gemiddeld 75 x; Klamer *et al.*, 2002). De chemische oorzaak van de extra gemeten activiteit is niet exact bekend.

Mogelijke oorzaken zijn:

- (a) de aanwezigheid in het extract (en dus in het sediment) van meer stoffen met een uitslag in de DR-CALUX test dan alleen de dioxines, dibenzofuranen en PCB's (bijvoorbeeld: PAK's en stikstofhoudende PAK's);
- (b) de aanwezigheid van andere natuurlijke en/of biogene componenten met een dergelijke werking en
- (c) interacties tussen componenten die de respons netto doen verhogen.

Uit het bio-mimetische onderzoek met siliconen-sheets blijkt dat dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs in sediment slecht beschikbaar zijn voor partitie naar de waterfase. Dat betekent dat ze niet of nauwelijks via de waterfase door organismen kunnen worden opgenomen.

De stoffen die, gemeten volgens het huidige voorschrift, de activiteit in de DR-CALUX test veroorzaken, zijn niet, of in ieder geval weinig, biologisch beschikbaar.

Hoewel deze stoffen in het extract van de siliconen-sheets nagenoeg afwezig zijn, heeft het extract een hoge respons in de DR-CALUX test. Dit geldt zowel na de chemisch destructieve zuiveringsprocedure van het huidige protocol (SPECIE 01), als na de chemisch niet-destructieve GPC procedure. Het baggerslib geeft dus dioxine-achtige toxiciteit af aan de waterfase, maar niet of nauwelijks dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs. De gevolgen van deze bevindingen voor de effectgerichte beoordeling van baggerslib moeten worden uitgewerkt.

Aanbevelingen voor vervolgonderzoek.

De huidige implementatie van de DR-CALUX test in de CTT om de dioxine-achtige toxiciteit te beoordelen heeft enkele beperkingen. Voordat eventuele consequenties voor het beleid hiervan duidelijk zijn moet eerst opgehelderd worden wat de aard en grootte van de synergistische werking van stoffen in baggerslib bekend wordt. Hiervoor is vervolgonderzoek nodig.

Tijdens de voorgeschreven zuivering volgens SPECIE-01 wordt een groot deel van de potentieel aanwezige activiteit verwijderd. Aanbevolen wordt onderzoek uit te voeren naar de consequenties van het vervangen van de standaard zuivering door de GPC-zuivering.

De biologische beschikbaarheid van dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs in het baggerslib is zeer gering. Aanbevolen wordt onderzoek uit te voeren naar risicobeoordeling van sediment en baggerslib, met een extractieprocedure die de wijze waarop organismen contaminanten opnemen, nabootst ("bio-mimetisch").

Het onderzoek verdient voortzetting in de richting van zowel het identificeren van nieuwe stoffen als het aanwijzen van (potentiële) bronnen. Hierdoor kan de aandacht verschuiven naar nieuwe stoffen waarop nieuw of gewijzigd brongericht beleid gemaakt en brongericht beheer gevoerd kan worden.

Het beleid ten aanzien van effectgerichte beoordeling staat wat betreft de uitvoering ervan voor de keuze om de werkelijk aanwezige dioxine-achtige toxiciteit te willen meten. In dit geval is GPC-zuivering nodig en is een 75 tot ruim 100 maal hogere testuitslag het resultaat. Door combinatie van GPC-zuivering met bio-mimetische extractie wordt duidelijk in hoeverre de aanwezige dioxine-achtige toxiciteit werkelijk biologisch beschikbaar is.

Als alternatief kan men genoeg nemen met een sterk gereduceerd beeld, dat bepaald wordt door de traditionele stoffen met dioxine-achtige toxiciteit.

1 Inleiding

De Chemie-Toxiciteit-Toets (CTT) introduceert effectgerichte beoordeling van baggerspecie en havensediment in het Nederlandse beleid ten aanzien van het verlenen van vergunningen, c.q. ontheffingen binnen WVO en WVZ.

Effectgerichte beoordeling wordt toegepast om inzicht te geven in:

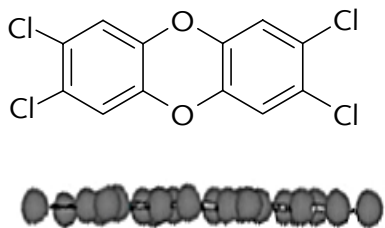
1. de aanwezigheid van onbekende stoffen;
2. de gezamenlijke effecten van de cocktail aan bekende en onbekende verontreinigingen;
3. de mate waarin de stoffen biologisch beschikbaar zijn.

De DR-CALUX test is onderdeel van de CTT. Met deze test wordt de aanwezigheid van stoffen met een dioxine-achtige toxiciteit bepaald. Deze test geeft een respons bij blootstelling aan platte, dioxine-achtige stoffen zoals dioxines zelf, maar ook dibenzofuranen en platte PCB's.

Ter voorbereiding op de invoering van de CTT heeft Rijkswaterstaat, Directie Noord-Nederland, aan het RIKZ gevraagd de in het verleden waargenomen activiteit in de DR-CALUX test in sediment-extracten van het Zeehavenkanaal chemisch te verklaren. Het is voor DNN als vergunningverlener belangrijk is om inzicht te hebben in de oorzaken van waargenomen verontreiniging. Daarom heeft DNN verzocht het onderzoek te richten op het verklaren van de genoemde activiteit op basis van de aanwezigheid van bekende én onbekende stoffen.

De huidige uitvoering van de DR-CALUX test voor sediment en baggerslib is het resultaat van onderzoek door en in opdracht van RIKZ. Deze wijze van uitvoering is vastgelegd in RIKZ protocol SPECIE-01. Vanuit het Directoraat-Generaal Water (DGW) is gevraagd te rapporteren over nieuwe wetenschappelijk inzichten in de milieuchemische aspecten van het huidige protocol DR-CALUX test.

Figuur 1: Structuur van TCDD (boven) en zijaanzicht (onder). Twee gechloreerde benzeenringen zijn met een zuurstof (O) brug (dioxine) met elkaar verbonden. Vanwege deze dubbele binding is het TCDD molecuul vrijwel vlak.



1.1 Dioxine-achtige toxiciteit

Dit type toxiciteit is vernoemd naar de stofgroep dibenzo-dioxines. De stof 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine ("dioxine" of "TCDD", Figuur 1) is de meest potente vertegenwoordiger. Andere stoffen die een dioxine-achtige toxiciteit (kunnen) hebben, zijn naast dibenzofuranen en PCB's, ook PAK's, stikstofhoudende PAK's en gebromeerde vlamvertragers, maar ook biogene componenten.

TCDD en vergelijkbare verbindingen zijn vrijwel vlakke moleculen, die affiniteit hebben voor binding aan een fysiologische receptor in de cel: de Ah-Receptor (Aryl hydrocarbon receptor of AhR). TCDD heeft van alle bekende stoffen de grootste affiniteit voor deze receptor (Safe, 1990) en heeft daarom een Toxiciteit Equivalentie Factor (TEF) van 1.0 gekregen (Besselink and Brouwer, 2003). Andere stoffen met een dioxine-achtige werkingsmechanisme hebben een lagere TEF-waarde.

De respons in testen voor dioxine-achtige toxiciteit wordt gestandaardiseerd door de TEF van TCDD (1.0) te vermenigvuldigen met de concentratie C (in picogram TCDD per gram monster). Deze waarde heet de TEQ, Toxiciteits Equivalent. De gezamenlijke respons van alle stoffen met een dioxine-achtige werking wordt verkregen door de individuele reponsen, de TEQs, bij elkaar op

te tellen: formule (1). De eenheid is pgTEQ.g^{-1} (picogram TEQ per gram monster*).

$$\text{Totale respons} = \sum_{n=1}^k \text{TEQ} = \sum_{n=1}^k C_n \times \text{TEF}_n \quad (1)$$

Hierbij is C_n de concentratie is van stof n en TEF_n de TEF-waarde van die stof.

In de DR-CALUX test wordt gebruik gemaakt van rattenlever cellen waarvan het DNA is aangepast. Bij blootstelling aan dioxine-achtige stoffen vindt niet alleen het normale reactiepatroon plaats, maar wordt tevens een keten van biologische reacties in gang gezet waardoor de cellen licht gaan uitzenden. Dit licht kan zeer gevoelig gemeten worden; de hoeveelheid licht is gerelateerd aan de hoeveelheid dioxine-achtige stoffen in het extract waaraan de cellen zijn blootgesteld.

1.2 Organisatie en opzet van de RIKZ DR-CALUX TIE-studie.

De DR-CALUX activiteit in baggerslib van het Zeehavenkanaal wordt veroorzaakt door bepaalde stoffen. Het door DNN gevraagde resultaat is het achterhalen van de identiteit en de aanwezige hoeveelheid van deze stoffen. Het type onderzoek dat hiervoor nodig is heet Toxiciteit Identificatie en Evaluatie, TIE (Mount & Anderson-Carnahan, 1988). Om TIE-studies uit te kunnen voeren heeft RIKZ eerder het QPID-systeem ontwikkeld. QPID bestaat uit een database waarin de chemisch-analytische en toxicologische eigenschappen van stoffen zijn opgeslagen. De onderliggende software van QPID identificeert de stoffen en de mate waarin deze kunnen bijdragen aan de waargenomen respons

Het uitgangspunt van deze TIE-studie is eenvoudig (zie ook Formule 1):

1. Meet de activiteit van een baggerslibextract in een bioassay (resultaat: ΣTEQ);
2. Identificeer de stoffen en meet de concentratie ervan in het extract (resultaat: C_n);
3. Bepaal van deze stoffen de biologische activiteit (resultaat: TEF_n);
4. Bereken hoeveel (%) van de respons uit (1) wordt veroorzaakt door de geïdentificeerde stoffen.

De uitvoering van de DR-CALUX test voor sediment en baggerslib binnen de CTT is in een protocol vastgelegd: het RIKZ SPECIE-01 protocol. Dit protocol bestaat uit een analytisch-chemisch voortraject (extractie en zuivering) en een biologische analyse van het gezuiverde extract. Recent onderzoek door en in opdracht van RIKZ laat zien dat een ander voortraject meer inzicht kan geven in de aard en grootte van de aanwezige dioxine-achtige toxiciteit (Klamer *et al*, 2002).

Deze studie, en daarmee dit rapport, is in twee delen opgesplitst:

- I. Uitvoering van de DR-CALUX test strikt volgens het SPECIE-01 protocol. Hierbij worden stoffen uit het baggerslib na chemische extractie en een chemisch destructieve zuiveringsprocedure aan de biologische toets toegevoegd;
- II. Uitvoering van de DR-CALUX volgens een protocol waarbij een niet-destructieve zuiveringsprocedure wordt toegepast. De samenstelling van het te toetsen monster lijkt daardoor meer op wat organismen bij blootstelling in het veld ondervinden. Tevens is een procedure

* 1 picogram is 10^{-12} gram, ofwel een miljoenste van een miljoenste gram.

uitgewerkt en toegepast om de biologische beschikbaarheid van de actieve stoffen in het slib te toetsen.

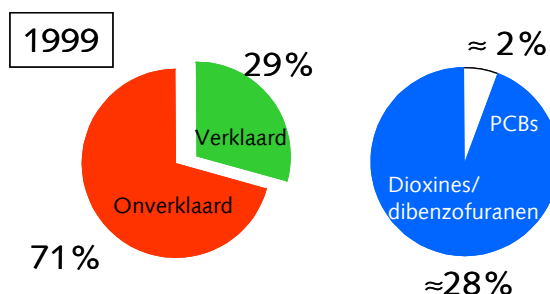
Deel I is gefinancierd door DNN en bestaat uit de volgende onderdelen:

I-1 *Bevestigen van de DR-CALUX activiteit in een extract van vers bemonsterde baggerspecie.*

In 1999 is een TIE-studie van beperkte omvang uitgevoerd op sediment uit het Zeehavenkanaal (Stronkhorst *et al.*, 2002). Ongeveer 29% van de activiteit in de DR-CALUX test verklaard kon worden door de aanwezigheid van dioxines, en dibenzofuranen en PCB's (Figuur 2).

In het Zeehavenkanaal wordt het jaar rond gebaggerd: per jaar wordt ca. 2,2 megaton afgevoerd (Riesenkamp, DNN, persoonlijke mededeling.). Hoewel niet in elk baggervak even intensief wordt gebaggerd, is het waarschijnlijk dat recent bemonsterd slib een andere samenstelling heeft dan in 1999. Vóórdat zinvol met een nieuwe TIE-studie begonnen wordt, moet aangetoond zijn dat een extract van recent baggerslib uit het Zeehavenkanaal actief is in de DR-CALUX test.

.....
Figuur 2: In 1999 kon totaal ca. 29% van de DR-CALUX activiteit in sediment-extract van het Zeehavenkanaal verklaard worden door de aanwezigheid van dioxines en dibenzofuranen (verklaard bijna 28%) en PCB's (verklaard bijna 2 %).



I-2 *Literatuurstudie: welke stoffen hebben een aangetoonde of potentiële affiniteit met de Ah-Receptor?*

Dat dioxines, dibenzofuranen en platte PCB's een DR-CALUX activiteit laten zien is genoegzaam bekend. Dat andere stoffen eveneens activiteit kunnen veroorzaken is doorgaans minder bekend. Een overzicht van welke stoffen dat zijn ontbreekt. Mét zo'n overzicht kan de chemische analyse veel gericht worden uitgevoerd.

I-3 *Analyse van 'klassieke' dioxine-achtige stoffen.*

Van de gechloroerde dioxines, dibenzofuranen en platte PCB's die in de DR-CALUX test activiteit laten zien, is de TEF bekend (Tabel 1). Na bepaling van de concentraties kan met formule (1) de chemische Σ TEQ berekend worden en vergeleken met de biologische Σ TEQ (de DR-CALUX activiteit). Dan is bekend hoeveel activiteit nog onverklaard is en toegewezen moet worden aan onbekende stoffen en/of onbekende interacties.

I-4 *Screening van het totale baggerslib extract op 'nieuwe' stoffen met een affiniteit voor de Ah-Receptor (stoffen uit (I-2) die niet tot (I-3) behoren).*

QPID is een door RIKZ ontwikkeld systeem, speciaal voor TIE studies. De Quality Peak Identification and Database is een database waarin fysisch-chemische, analytisch-chemische en toxicologische eigenschappen van stoffen zijn opgeslagen. Met behulp van een GCMS screening wordt de identiteit en het gehalte (ordegrootte) van zo veel mogelijk stoffen vastgesteld. Een expertsysteem binnen QPID berekent de mate waarin deze stoffen kunnen bijdragen aan de waargenomen activiteit.

I-5 *Interactiestudie.*

In het sedimentextract kunnen stoffen voorkomen die de activiteit van



andere stoffen in de DR-CALUX test bē invloed: versterken (synergisme) of verzwakken (antagonisme). Dit heeft twee gevolgen. Ten eerste wordt de werkelijk aanwezige hoeveelheid dioxines, dibenzofuranen en platte PCB's onjuist vastgesteld. Ten tweede wordt de berekening van het verklaarde percentage dioxine-achtige toxiciteit (binding aan de Ah-Receptor) door gē identificeerde verbindingen bē invloed.

Deel II van de TIE-studie is door WONS gefinancierd en bestaat uit de volgende onderdelen:

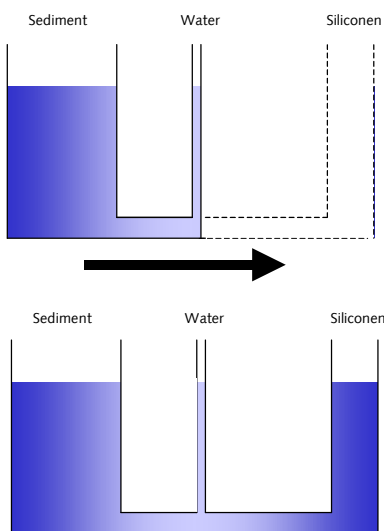
II-1 Vaststellen van de invloed van een biologisch relevantere clean-up (zuivering) op de activiteit van het extract in de DR-CALUX test.

Voor toediening van het extract aan de bioassay wordt binnen SPECIE-01 een clean-up procedure (zuivering) toegepast die ontwikkeld is voor analytisch-chemische bepaling van de zeer lage gehalten aan dioxines, dibenzofuranen en platte PCB's in dit extract. Deze clean-up haalt vrijwel alle stoffen uit het extract, behalve juist deze analytisch-chemische 'targets'. In het milieu worden organismen echter blootgesteld aan de volledige cocktail van aanwezige stoffen. Toepassing van een clean-up die de cocktail intact laat, leidt tot een meer biologisch relevante en veldrelevante uitslag van de test. De kwaliteit van het baggerslib kan juist dan effectgericht worden geëvalueerd.

II-2 Onderzoek naar de mate van biologische beschikbaarheid van de chemisch geëxtraheerde stoffen.

De isolatie van stoffen uit het baggerslib gebeurt volgens het SPECIE-01 protocol via vloeistof extractie met een hexaan:aceton mengsel. Het is onduidelijk in hoeverre de geëxtraheerde (en uiteindelijk aan de bioassay toegediende) stoffen in het milieu daadwerkelijk beschikbaar zijn voor opname door organismen.

Figuur 3: Schematische weergave van de opname van stoffen door siliconenrubber uit sediment/water. De wet op de communicerende vaten zegt dat in evenwicht het (verontreinigings-) niveau in alle systemen even groot is.



Bij RIKZ wordt sinds enige tijd onderzoek uitgevoerd naar de biologische beschikbaarheid van stoffen in sedimenten. De metingen richten zich niet op wat er in het sediment zit maar wat er uit komt, met andere woorden: wat het sediment aan de waterfase afgeeft.

Sediment, of baggerslib, wordt in een waterige suspensie gebracht waar zich ook een velletje siliconenrubber bevindt. Omdat het rubber nog 'leeg' is, vindt een herverdeling van stoffen plaats over de drie compartimenten (Figuur 3). Verdeling van stoffen tussen sediment, water en siliconenrubber volgt de wet van de communicerende vaten: als het systeem in evenwicht is, is in alle vaatjes het niveau gelijk.

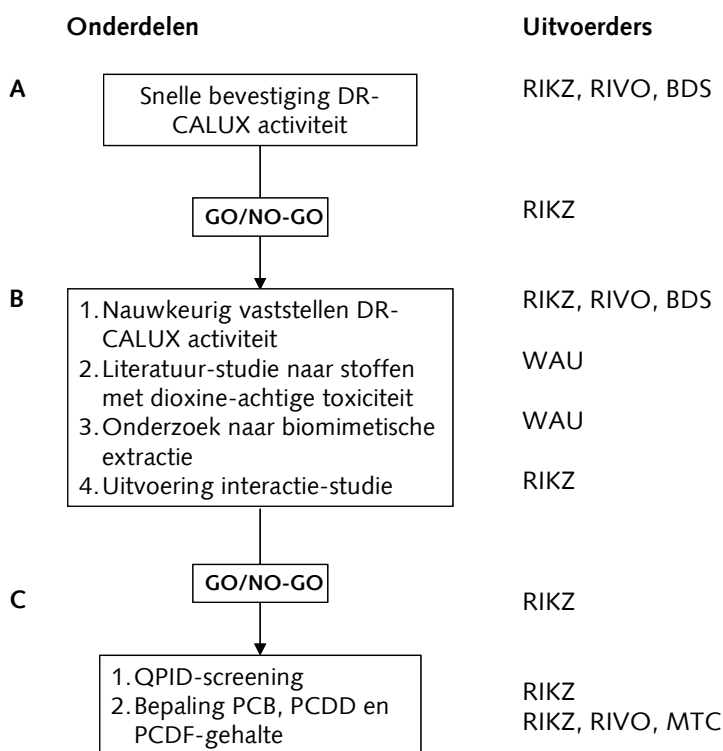
'Niveau' wil hier zeggen: het verontreinigingsniveau. Voor stoffen als PCB's, PAK's en dioxine-achtige stoffen kan het enkele weken duren voordat evenwicht bereikt is.

Deze methode van 'extractie' van sediment lijkt op hoe organismen stoffen uit sediment/water systemen opnemen en wordt daarom 'bio-mimetische' genoemd.

2 Praktische Opzet en Uitvoering

Deze TIE-studie is opgesplitst: in: uitvoering volgens het SPECIE-01 protocol en uitvoering volgens het niet-destructieve protocol. Elk onderdeel is in drie fasen opgedeeld, waarbij tussen de fasen een "go/no-go" besluit moest worden genomen. In Schema 1 zijn deze fasen weergegeven, waarbij ook de uitvoerende instanties worden genoemd.

Schema 1: Organisatie van de verschillende projectonderdelen binnen de Zeehavenkanaal DR-CALUX TIE studie. RIVO = Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek BV, IJmuiden; BDS = BioDetection Systems, Amsterdam; WAU = Universiteit van Wageningen; MTC = Milieu & Toxicologische Chemie, UvA, Amsterdam.



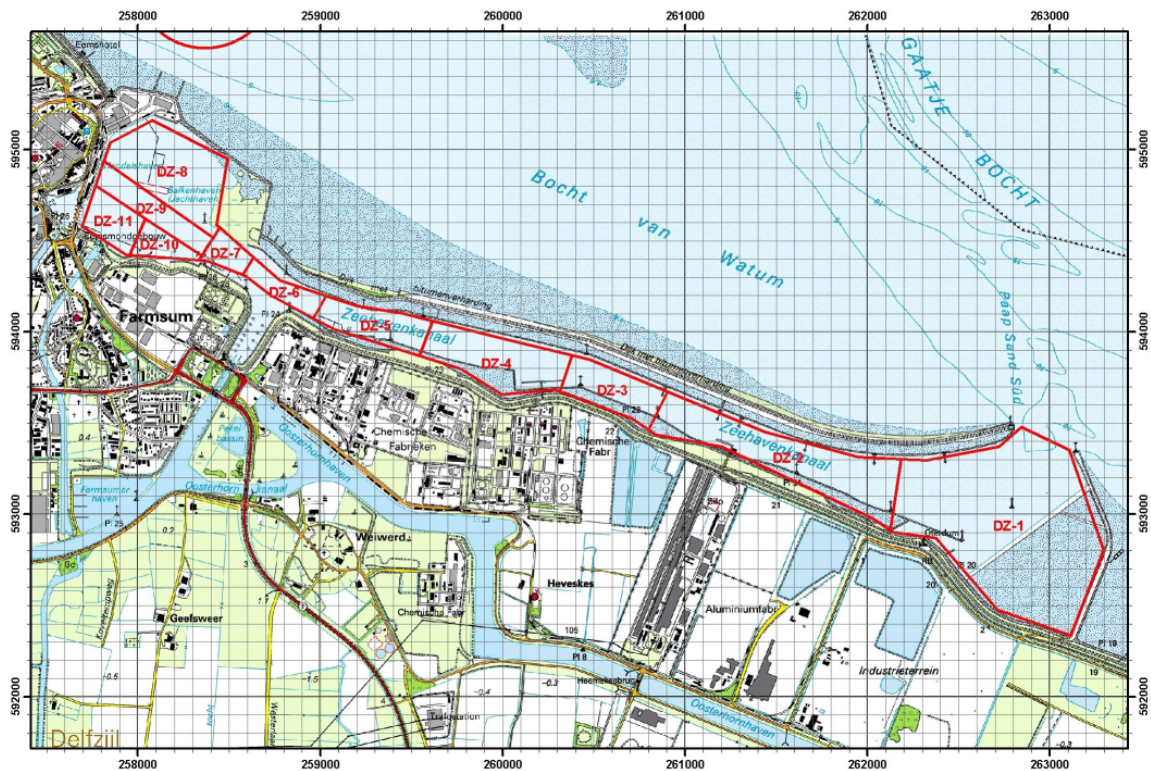
De uitkomst van de literatuurstudie in onderdeel B is zowel voor de TIE via het SPECIE-01 protocol gebruikt (deel I van deze studie) als voor de TIE via het niet-destructieve protocol (deel II).

2.1 Bemonstering Zeehavenkanaal sediment

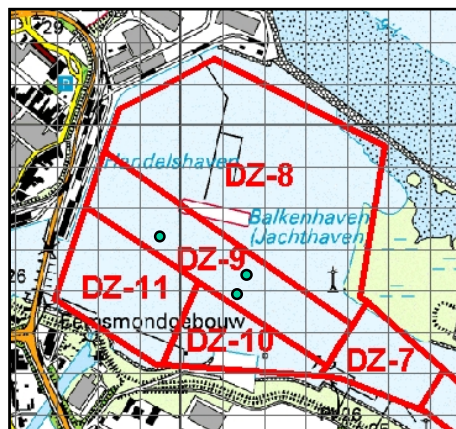
Op 11 oktober 2002 zijn op drie locaties in het Zeehavenkanaal (baggervak 9: zie Figuur 4) roestvrij stalen cilinders gevuld met opeenvolgende Van Veenhappen slib. Elke hap werd gelijkmatig verdeeld over de cilinders. Hiermee is een gemiddeld beeld van de locatie verkregen.

Direct na binnenkomst in het RIKZ lab te Haren werd uit één cilinder een submonster genomen en naar het RIVO te IJmuiden gestuurd, voor snelle bevestiging van de DR-CALUX activiteit (onderdeel A, Schema 1).

In het RIKZ lab in Haren werden de cilinders gedurende 2 weken in een draaiende opstelling (tuimelaar) geplaatst, waardoor het sediment twee maal per minuut werd gemengd en na deze periode als volledig gehomogeniseerd werd beschouwd.



X 257950, Y 594730
 X 258150, Y 594653
 X 258158, Y 594587



.....
Figuur 4: Monsternamen locaties in Baggervak 9 in het Zeehavenkanaal van Delfzijl.

Na homogenisatie werd het sediment volgens Schema 1, blok B en C in behandeling genomen. In onderstaand overzicht worden de verschillende fysieke, biologische en chemische behandelingen en analyses aangegeven. Uitgebreide laboratorium procedures zijn niet opgenomen - waar mogelijk wordt verwezen naar bestaande of in ontwikkeling zijnde protocollen, die deels op het RWS Intranet of op de SPECIE site (www.zeeslib.nl) zijn te vinden.

B1.	RIKZ	Vriesdrogen van een deel van het gehomogeniseerde sediment volgens RIKZ laboratoriumprotocol AK034.
	RIVO	In drievoud extractie van gevriesdroogde sediment volgens het RIKZ SPECIE-01 protocol. Zuivering van de extracten volgens het SPECIE-01 protocol, met multi-layer silica (MLS) voor deel I van deze studie. Zuivering van de extracten volgens de WT*2-BCI Gel Permeatie Chromatografie (GPC) procedure voor deel II van deze studie.
	BDS	Biologische analyse van de gezuiverde extracten m.b.v. de DR-CALUX test.
B3	RIKZ	In drievoud gedurende 14 dagen biomimetisch bemonsteren van het gehomogeniseerde sediment met behulp van siliconenrubber.
	RIVO	Extractie van de siliconenrubbers met hexaan Zuivering van de siliconenrubber-extracten volgens het SPECIE-01 protocol (deel I) en de WT*2-BCI GPC procedure (deel II).
	BDS	Biologische analyse van de gezuiverde siliconenrubber-extracten m.b.v. de DR-CALUX test
B4.	WAU	Onderzoek naar interactiemechanismen in de DR-CALUX test met (door RIVO bereide en gezuiverde) sedimentextracten.
C1.	RIKZ	Met behulp van GCMS screenen van de gezuiverde sedimentextracten (QPID)
C2.	RIKZ	Bepaling van het PCB en PAK-gehalte in de sedimentextracten, volgens RIKZ SOP A406 en A404.
	MTC	Bepaling van het gehalte aan dioxinen, dibenzofuranen en platte PCB's in de sedimentextracten

2.2 Literatuurstudie

In de klassieke uitvoering van een TIE-studie wordt een actief extract in (veel) fracties gesplitst. De activiteit van elke fractie wordt bepaald, waarna verdere fractionering plaats vindt, óf chemische analyse van de actieve fractie(s). Van alle stoffen die in de actieve fractie(s) gē identificeerd kunnen worden moet daarna de individuele activiteit worden bepaald (of in de literatuur worden opgezocht).

De aanpak van RIKZ bij deze DR-CALUX TIE-studie is anders. Ten eerste wordt niet gefractioneerd, opdat mogelijke interacties (synergisme, antagonisme) niet verloren gaan. Ten tweede wordt op een andere manier naar de te identificeren stoffen gekeken. Als bekend is wélke stoffen in de DR-CALUX test actief zouden kunnen zijn, is op voorhand bekend naar welke stoffen tijdens de chemische analyse gezocht moet worden. Om hieraan te voldoen is een studie uitgevoerd naar alle in de literatuur beschreven Ah-R agonisten: stoffen met een bewezen of mogelijke activiteit in de DR-CALUX test.

2.3 Screening

Het TIE-systeem van RIKZ, QPID, is gekoppeld aan een analytisch-chemisch instrument voor het screenen van 'onbekende stoffen'. Dit zijn stoffen die niet routinematig geanalyseerd worden, in tegenstelling tot de 'bekende' stoffen die in speciale projecten of in monitoringprogramma's bepaald worden. In deze

laatste categorieën vallen b.v. PCB's en PAK's (monitoring, binnen RIKZ) en dioxines, dibenzofuranen en vlamvertragers (speciale projecten, uitbesteed). Analyse van bekende stoffen gebeurt altijd met een speciaal daartoe geoptimaliseerde techniek, waarbij onder andere gevoeligheid voor de doelstoffen (de 'targets') een belangrijke rol speelt. Omdat niet nauwkeurig bekend is om welke stoffen het gaat, is screening op onbekende stoffen per definitie een 'non-target' analyse. Hierbij worden zo veel mogelijk stoffen gedetecteerd, wat gecombineerd gaat met een relatief lage gevoeligheid. Stoffen met een laag gehalte (bijvoorbeeld stikstof-PAKs, vlamvertragers, PCB's) worden dan ook lang niet altijd waargenomen. Er bestaan tegenwoordig screeningstechnieken met een hoge gevoeligheid; toepassing hiervan viel vooralsnog buiten dit project.

Identificatie is binnen QPID een meerstaps-proces. Het analytisch-chemisch instrument levert aan QPID een groslijst van stoffen op die waarschijnlijk aanwezig zijn. Het instrument geeft ook een kwantificering van deze waarschijnlijkheid, de match-factor, in procenten. De kans dat een stof inderdaad juist wordt waargenomen wordt verhoogd door een hoge matchfactor van 90% te nemen. De kans is minder dan 10% dat een stof door het apparaat, zonder verdere expertbeoordeling, onjuist wordt geïdentificeerd. QPID spreekt dan over indicatie. Door het gebruik van laboratoriumstandaarden, oplossingen van zuivere stoffen, wordt beoordeeld of het gedrag van de geïdentificeerde stof(fen) op het analyseapparaat overeenkomt met dat van een standaard. Als deze overeenkomst beter is dan 99% wordt van identificatie gesproken (minder dan 1% kans dat onjuist geïdentificeerd wordt). Tenslotte wordt van de nieuw geïdentificeerde stoffen de daadwerkelijke activiteit in de bioassay bepaald.

2.4 Interactiestudie

In de interactiestudie is onderzocht wat het effect is van het toevoegen van verschillende hoeveelheden (gezuiverd) sedimentextract op de standaard activiteit van 2,3,7,8-TCDD in de DR-CALUX test. Gekeken is zowel naar de hoogte van de maximale activiteit van TCDD, als naar de concentratie waarbij de activiteit 50% is van de maximale activiteit (EC_{50}). De theorie van het werkingsmechanisme van TCDD via binding aan de Ah-Receptor (Murk *et al.*, 1996), zegt dat bij interactie met stoffen die de receptor-concentratie verhogen (extra Ah-R receptor) de EC_{50} niet verandert, maar alleen de maximale activiteit.

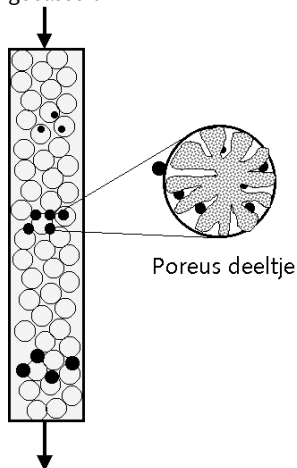
2.5 DR-CALUX TEF waarden

Om het percentage verklaarde DR-CALUX activiteit te kunnen berekenen (Formule 1) is voor elke geïdentificeerde en gekwantificeerde component de individuele TEF-waarde nodig. Voor dioxines, dibenzofuranen en PCB's staan de meest recent bekende TEF-waarden in Tabel 1 (Besselink and Brouwer, 2003). Van een aantal bij de screening geïdentificeerde stoffen is de dioxine-achtige toxiciteit bekend, hetzij als TEF-waarde, hetzij in een andere eenheid. Deze waarden zijn opgenomen in de bijlage.

Tabel 1: DR-CALUX TEF waarden van platte PCB's, dioxines en dibenzofuranen (Besselink and Brouwer, 2003).

(Platte) PCB's en HCB	TEF	Dioxines	TEF	Dibenzofuranen	TEF
PCB118	1×10^{-9}	2,3,7,8-T4CDD	1	2,3,7,8-T4CDF	0,32
PCB105	$1,2 \times 10^{-5}$	1,2,3,7,8-P5CDD	0,54	1,2,3,7,8-P5CDF	0,21
HCB	1×10^{-4}	1,2,3,4,7,8-H6CDD	0,3	2,3,4,7,8-P5CDF	0,5
		1,2,3,6,7,8-H6CDD	0,14	1,2,3,4,7,8-H6CDF	0,13
Non-ortho PCB		1,2,3,7,8,9-H6CDD	0,066	1,2,3,6,7,8-H6CDF	0,039
PCB 77	0,0013	1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	0,05	1,2,3,7,8,9-H6CDF	0,11
PCB 81	0,0001	OCDD	0,0001	2,3,4,6,7,8-H6CDF	0,18
PCB 126	0,067			1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	0,032
PCB 169	0,0034			1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	0,041
				OCDF	0,0001

Figuur 5: Principe van Gel Permeatie Chromatografie (GPC): grote moleculen (b.v. vetten, eiwitten) kunnen niet de poriën van de GPC-gel binnendringen en hebben daardoor een kortere weglengte door de kolom dan kleine moleculen. De zuivering is hierop gebaseerd.



2.6 Niet-destructieve zuivering

Om een sediment-extract geschikt te maken voor toediening aan de DR-CALUX moet het eerst gezuiverd worden van stoffen die de analyse hinderen. Voorbeelden van deze stoffen zijn grote moleculen als vetten, eiwitten, kleurstoffen e.d. Het SPECIE-01 protocol past een zuiveringstechniek toe die ontwikkeld is voor analytisch-chemische bepaling van de zeer lage gehalten aan dioxines, dibenzofuranen en platte PCB's in dit extract. Deze techniek staat bekend als 'zure silica' opwerking of 'multilayer silica' opwerking (MLS). De CTT gebruikt de DR-CALUX feitelijk als een bioanalyse van dioxines, dibenzofuranen en (platte) PCB's. Deze bioanalyse is kostenefficiënter dan chemische analyse: de DR-CALUX is bijna een factor 4 goedkoper. Uit de resultaten van de interactiestudie weten we dat er door synergisme een overschatting van de gehalten van deze stoffen is.

MLS is een destructieve techniek en haalt vrijwel alle stoffen uit het extract, behalve de analytisch-chemische 'targets'.

In het milieu is de situatie anders. Organismen worden blootgesteld aan de volledige cocktail van aanwezige stoffen. Wanneer baggerslib beoordeeld moet worden op dioxine-achtige toxiciteit (door de aanwezigheid van alle stoffen met affiniteit voor de Ah-Receptor), dan is toepassing van een andere zuiveringstechniek noodzakelijk.

Gel Permeatie Chromatografie (GPC) is zo'n een zuiveringstechniek. Hierbij kunnen grote biomoleculen gescheiden worden van kleinere moleculen (zoals verontreinigingen): zie Figuur 5. Toepassing van deze techniek maakt het extract geschikt voor toediening aan de bioassay, laat daarbij de aanwezige cocktail intact en leidt daardoor tot een meer veld en biologisch relevante uitslag van de assay. Hierdoor past de uitslag van de test beter bij effect gericht beleid.

2.7 Bio-mimetische bemonstering

In dit onderdeel van de studie is het siliconenrubber (zie Hoofdstuk 1, Figuur 3) gedurende 14 dagen met het baggerslib in contact geweest. Bekend is dat stoffen tot en met een log Kow van ca. 5.5 in die tijd evenwicht bereiken. Stoffen met een hogere log Kow (zoals dioxines) zijn minder vertegenwoordigd. Bij RIKZ loopt onderzoek om het evenwichtsproces te versnellen, zodat ook stoffen met een hogere log Kow evenredig vertegenwoordigd zijn.

3 Resultaten en Discussie

Onderdeel I: Uitvoering volgens SPECIE-01 protocol

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de TIE studie gepresenteerd, bij uitvoering volgens het SPECIE-01 protocol.

3.1 DR-CALUX activiteit

Baggerslib van het Zeehavenkanaal voldoet aan de voorlopige CTT-norm voor dioxine-achtige toxiciteit.

Direct na bemonstering in oktober 2002 werd een DR-CALUX activiteit gemeten van 45 pg TEQ.g⁻¹; na homogenisatie was de gemiddelde activiteit 43±12 pg TEQ.g⁻¹, beide op basis van droge stof. Met deze waarde voldoet het baggerslib aan de voorlopige CTT norm van 50pgTEQ.g⁻¹.

De tegenwoordige activiteit komt redelijk overeen met de waarneming uit 1999 van 32 pg TEQ.g⁻¹ (Stronkhorst *et al.*, 2002). Door de baggeractiviteiten in het Zeehavenkanaal is het recente baggerslib wellicht ander materiaal dan in 1999 (Riesenkamp, pers. med.).

In 1996 is op zes locaties in het Zeehavenkanaal het PCDD en PCDF gehalte in baggerslib onderzocht (Klamer, 1996). De chemische ΣTEQ (zie formule 1, op basis van DR-CALUX TEF waarden) was toen gemiddeld 40 pgTEQ.g⁻¹ en daarmee van gelijk niveau als in de latere jaren.

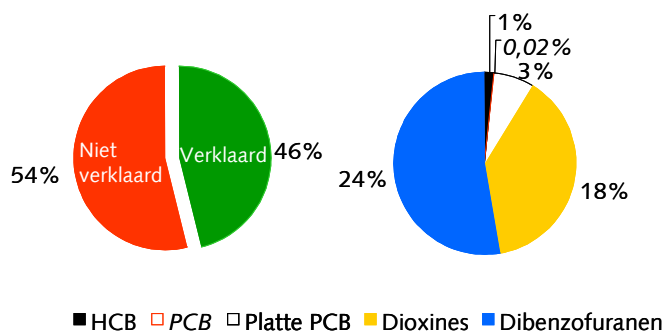
Dat de DR-CALUX activiteit tussen 1996 en 2002 binnen de meetfout gelijk is, kan gelegen zijn in nalevering van dioxine-achtige toxiciteit uit onderliggende oudere sliblagen en/of een locale of externe bron.

In het gezuiverde extract zijn de gehalten aan PCB's, HCB, platte PCB's, dioxines en dibenzofuranen gemeten. Tabel 2 geeft de gehalten van de componenten waarvan een DR-CALUX TEF bekend is (zie ook Tabel 1).

Tabel 2: Gehaltes [pg.g⁻¹ droge stof] aan (platte) PCB's, HCB, dioxines en dibenzofuranen in baggerslib van het Zeehavenkanaal te Delfzijl, bemonsterd op 11 oktober 2002 en gemeten volgens het SPECIE-01 protocol.

Component	Gehalte [pg.g ⁻¹]	Component	Gehalte [pg.g ⁻¹]	Component	Gehalte [pg.g ⁻¹]
(Platte) PCBs		Dioxines		Dibenzofuranen	
PCB 77	164	2,3,7,8-T4CDD	1,2	2,3,7,8-T4CDF	2,4
PCB 81	3,9	1,2,3,7,8-P5CDD	2,3	1,2,3,7,8-P5CDF	6,3
PCB 105	5,6×10 ⁵	1,2,3,4,7,8-H6CDD	1,6	2,3,4,7,8-P5CDF	6,7
PCB 118	1.35×10 ⁶	1,2,3,6,7,8-H6CDD	4,7	1,2,3,4,7,8-H6CDF	14
PCB 126	18	1,2,3,7,8,9-H6CDD	9,1	1,2,3,6,7,8-H6CDF	5,9
PCB 169	2,7	1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	67	1,2,3,7,8,9-H6CDF	2,2
		OCDD	574	2,3,4,6,7,8-H6CDF	2,3
				1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	65
HCB	3,38×10 ⁶			1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	4,5
				OCDF	163

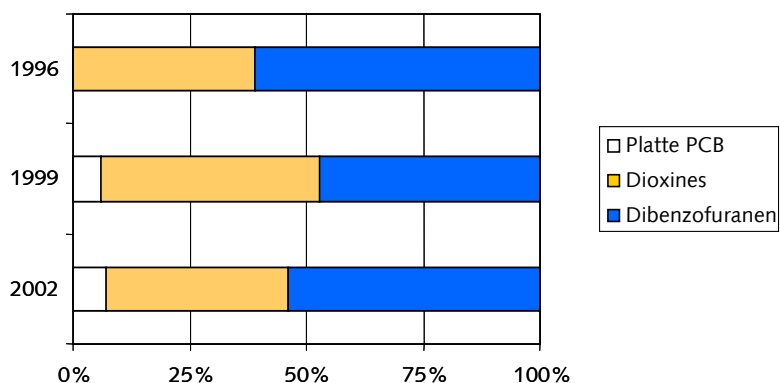
.....
Figuur 6: 46% van de gemeten DR-CALUX activiteit (in een sedimentextract van het Zeehavenkanaal; uitgevoerd volgens het SPECIE-01 protocol) kan verklaard worden door de aanwezigheid van PCBs (3%), HCB (1%), dioxines (18%) en dibenzofuranen (24%).



De 43 pg TEQ.g⁻¹ van het totale sediment-extract kon voor 46% (19.8 pgTEQ.g⁻¹) door de ΣTEQ van deze stoffen verklaard worden (Figuur 6). In 1999 kon 26% van de respons verklaard worden. Het grotere succes van de huidige studie komt door zowel een nauwkeuriger dioxine en dibenzofuraan-analyse (meer componenten), als door meer DR-CALUX TEF waarden van de afzonderlijke componenten (Tabel 1).

In 1996, 1999 en 2002 zijn in het sediment van het Zeehavenkanaal dioxines en dibenzofuranen gemeten; in 2002 ook platte PCBs. Het blijkt dat de concentratie-verhouding tussen deze stofgroepen in deze jaren weinig veranderd is: Figuur 7.

.....
Figuur 7: In 1996 (boven) was de verhouding (Σ TEQ) tussen dioxines en dibenzofuranen 39 en 61%. Deze onderlinge verhouding is in latere metingen weinig veranderd.



Een oude laag die recent slib contamineert ?

Dit resultaat biedt een verdere onderbouwing van de hierboven genoemde veronderstelling over de herkomst van de dioxine-achtige componenten in het slib van het Zeehavenkanaal: een oudere laag die bovenliggend recent slib contamineert. Verwijdering van deze laag zou wel eens een groot deel van de aanwezige dioxine-achtige toxiciteit in het Zeehavenkanaal kunnen doen verdwijnen.

3.2 Interactiestudie

In § 2.4 is uitgelegd dat in de interactiestudie wordt gekeken naar de activiteit van TCDD met en zonder aanwezigheid baggerslib extract. Gecorrigeerd voor de activiteit van het extract zelf blijkt dat in extract van baggerslib zich stoffen bevinden die de maximale activiteit van dioxine in de DR-CALUX test verhogen. De gemiddelde verhoging is 1,7 keer. De totale dioxine-achtige toxiciteit van het slib wordt hierdoor verhoogd.

De interactiefactor van 1,7 wil zeggen:

- *Er wordt meer receptor aangemaakt, waardoor*
- *de activiteit van dioxine-achtige stoffen schijnbaar wordt verhoogd,*
- *de DR-CALUX test een hogere respons laat zien en*
- *de chemische Σ TEQ wordt onderschat.*

Wat zegt dat over de berekende Σ TEQ: onderschatting of overschatting?

De activiteit van dioxine in aanwezigheid van slibextract is in de DR-CALUX test hoger zónder slibextract. De berekende Σ TEQ (Formule 1) onderschat dus de gemeten activiteit door TCDD in het aanwezige mengsel van stoffen. Wellicht geldt dit ook voor de activiteit van de overige dioxine-achtige stoffen (dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs).

Vanwege de destructieve clean-up komt de toepassing van de DR-CALUX test feitelijk neer op een biologische analyse van de aanwezige dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs. Een dure chemische analyse met een GCMS is vervangen door een goedkopere biologische analyse: een lichtgevende cel. Een interactiefactor van groter dan 1 betekent dat de aanwezige hoeveelheid van deze stoffen wordt overschat.

Het is niet duidelijk of de interactiefactor voor alle havens of baggervakken binnen een haven dezelfde is. De hoeveelheid aanwezige dioxine-achtige stoffen in een slibextract wordt mogelijk overschat, wat gevolgen kan hebben voor de beoordeling van de kwaliteit van de betreffende baggerspecie. Het is daarom nodig de grootte van de interactiefactor en eventuele regionale verschillen hierin door onderzoek vast te laten stellen.

Onderzoek naar de interactiefactor is van direct belang voor beleid en beheer, omdat het de onderbouwing en daarmee de acceptatie van de DR-CALUX test versterkt.

Welke stoffen veroorzaken de interactiefactor?

De situatie rondom het identificeren van stoffen die de interactiefactor veroorzaken is niet fundamenteel anders dan met de stoffen die direct werken. Dit vraagstuk is direct beleids- en beheersmatig belang omdat het de onderbouwing en daarmee de acceptatie van biologische toetsen als de DR-CALUX versterkt. Voor werkelijk effectgericht beheer is dit essentieel.

Ook nu kunnen pas maatregelen genomen worden als bekend is om welke stoffen het gaat en wie deze geloosd heeft. Aangetekend moet worden dat niemand van tevoren had kunnen weten dat stoffen die geloosd werden dit effect hadden kunnen hebben (J. Aarts, WU, pers. med.). Hetzelfde geldt voor effectmetingen 'aan de pijp' (TEB procedure van RIZA), waarbij stoffen uit de pijp in een per situatie wisselende omgeving terecht komen.

In het extract was de chemische Σ TEQ $19.8 \text{ pgTEQ.g}^{-1}$ (46% van de totale activiteit). Als deze 'chemische activiteit' vermenigvuldigd wordt met de interactiefactor dan wordt een verwachte biologische activiteit verkregen van 33 pgTEQ.g^{-1} . De biologische activiteit was 43 pgTEQ.g^{-1} . Uiteindelijk kan dus 77% van de waargenomen biologische activiteit in de DR-CALUX test worden verklaard door de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen (Figuur 8).

.....
Figuur 8: De invloed van de interactiefactor op de verklaring van de gemeten activiteit in de DR-CALUX test door dioxine-achtige stoffen.

Deze balk stelt de totale activiteit in de DR-CALUX test voor



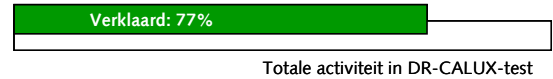
Berekend is dat 46% van de activiteit wordt veroorzaakt door dioxine-achtige stoffen



Interactie-factor zegt: gemeten activiteit is 1,7 x hoger dan de berekende



Dus verklaren dioxine-achtige stoffen niet 46, maar 77% van de gemeten activiteit



3.3 Literatuurstudie

De literatuurstudie heeft zich gericht op stoffen die een bewezen of mogelijke Ah-agonist zijn: stoffen met een bewezen of mogelijke activiteit in de DR-CALUX test. De literatuur tot eind 2002 is door de opdrachtnemer van deze deelstudie onderzocht, wat heeft geleid tot een lijst van totaal 430 stoffen met aangetoonde of vermoedelijke Ah-receptoraffiniteit. De complete lijst is beschikbaar op de volgende link naar het RIKZ-intranet: <http://vnwg01.minvenw.nl/venwdocs/RIKZ/290304hydrocarbon.pdf>

De individuele stoffen kunnen globaal in de groepen worden verdeeld:

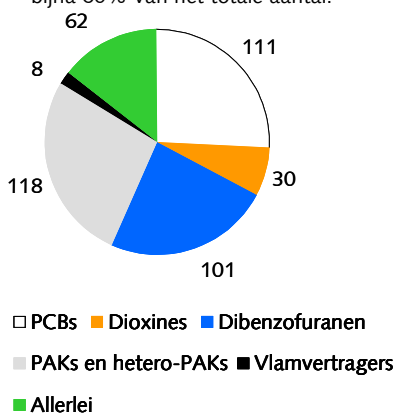
- Dioxines, dibenzofuranen, PCBs
- PAKs, gebromeerde vlamvertragers
- Flavonen en coumarines (plantaardige stoffen die een krachtige farmacologische werking vertonen)
- Aza-arenen (stikstof-PAKs) en metaboliëten daarvan
- Andere stikstofhoudende organische verbindingen
- Farmaceutische producten, voedingsadditieven, geurstoffen
- Natuurlijke pigmenten, anti-oxidanten en toxinen

In Figuur 9 is voor verschillende stofgroepen het aantal actieve componenten per stofgroep weergegeven; voor betere leesbaarheid zijn groepen als flavonen, farmaceutische producten enz. samengevat onder 'allerlei'.

Bekend is dat dioxines, dibenzofuranen en PCBs ("dioxine-achtige stoffen") Ah-Receptor affiniteit hebben; in Tabel 1 zijn de CALUX-TEFs opgenomen. Van enkele PAK's is de DR-CALUX TEF bekend. PAK's, en met name de aza-arenen (stikstof-PAKs), zijn van belang omdat de gehalten veelal enkele ordes van grootte hoger zijn dan die van de dioxine-achtige stoffen. Dit compenseert de relatief lage Ah-Receptor affiniteit ($TEQ = TEF \times Concentratie$; Formule 1). Enkele aza-arenen hebben een zeer hoge Ah-Receptor affiniteit, die in het geval van dibenzo-acridines zelfs *hoger* lijkt dan die van TCDD (dioxine) zelf (Machala *et al.*, 2001a).

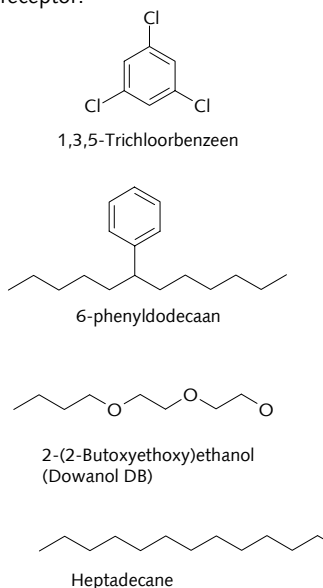
Zeer recent is de dioxine-achtige toxiciteit van een vijftal natuurlijke bioaccumulerende persistente verbindingen bekend geworden (Tittlemier *et al.*, 2003). Deze stoffen, met een even hoge bioaccumulatiefactor als PCBs, zijn aangetroffen in eieren van zeevogels en daarmee mogelijk relevant voor (de omgeving van) het Zeehavenkanaal. De Ah-Receptor affiniteit is weliswaar 20 tot 2500 keer zo laag is als TCDD, maar is vergelijkbaar met die van de platte PCBs.

.....
Figuur 9: In de literatuur (per eind 2002) worden 430 stoffen beschreven met aangetoonde of vermoedelijke Ah-receptor affiniteit. Bijna 25% hiervan zijn PAKs. De teller voor dioxine-achtige stoffen (PCBs, dioxines en dibenzofuranen) staat op 242 ofwel bijna 60% van het totale aantal.



3.4 Screening

.....
Figuur 10: Voorbeelden van stoffen in het extract bereid volgens SPECIE-01. Geen van de stoffen in dit extract heeft een bekende affiniteit voor de Ah receptor.



In het volgens het SPECIE-01 bereide slibextract werden 187 verschillende stoffen waargenomen, gēndiceerd, veelal stabiele alkaan- en benzeenderivaten. Door gebruik te maken van laboratoriumstandaarden konden 20 stoffen onomstotelijk worden gēdentificeerd: Tabel 3.

Stofnaam	Gehalte $\mu\text{g}/\text{kg}$
1,2,4-Trichlorobenzene	11
1,3,5-Trichlorobenzene	8
1,2,4-Trimethylbenzene	10
2-(2-n-butoxyethoxy)ethanol	15
Docosaan	130
Dodecaan	34
Eicosaan	105
6-phenyldodecaan	31
Heneicosaan	144
Heptadecaan	134
Hexadecaan	66
Nonadecaan	120
Octacosaan	173
Octadecaan	106
Pentadecaan	73
Tetracosaan	158
Tetradecaan	47
Triacontaan	166
Tridecaan	39
Undecaan	30

.....
Tabel 3: Gēdentificeerde stoffen en gehalten in het volgens SPECIE- 01 bereide slibextract. Gehaltes zijn in $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ droge stof, fractie < 63 μm .

Figuur 10 geeft hier enkele voorbeelden van deze stoffen; geen van de 187 gēndiceerde stoffen heeft een bekende Ah-affiniteit. De gehalten van de stoffen die wel gēndiceerd, maar niet met zekerheid konden worden gēdentificeerd, lagen in dezelfde orde grootte als de stoffen in Tabel 3.

3.5 Biologische beschikbaarheid van de chemisch geëxtraheerde stoffen.

In het siliconenrubber-extract komt van de dioxine-achtige stoffen uit Tabel 1 alleen PCB 77 in voldoende mate boven de detectiegrens uit om een vergelijking te kunnen maken met het sediment-extract. Van de overige stoffen blijft het gehalte achter. Dit is een indicatie dat deze stoffen slechts beperkt beschikbaar zijn voor extractie naar de waterfase en daarmee voor opname door organismen.

Het siliconenrubber-extract bevat na de destructieve zuivering (volgens het SPECIE-01 protocol) een *hogere* DR-CALUX activiteit dan het sediment-extract: 128 t.o.v. 43 $\text{pgTEQ}.\text{g}^{-1}$, terwijl het dioxinegehalte lager is. De activiteit moet dan ook door andere stoffen veroorzaakt worden. De identiteit van deze stoffen, die chemisch stabiel, biologisch beschikbaar *en* biologisch actief zijn, is vooralsnog onbekend.

4 Resultaten en Discussie

Onderdeel II: uitvoering met niet-destructieve zuivering

In dit hoofdstuk komen de resultaten van de TIE studie met de niet-destructieve zuivering ter sprake, zoals uitgelegd is in § 2.6.

4.1 DR-CALUX activiteit

Er is meer dan honderd keer zoveel dioxine-achtige toxiciteit aanwezig dan dat de uitslag van de toets volgens het SPECIE-01 protocol doet vermoeden.

De DR-CALUX activiteit van het op niet-destructieve wijze (GPC) gezuiverde slibextract was $4693 \pm 681 \text{ pgTEQ.g}^{-1}$. Dit is ruim *100 keer zo hoog* dan de activiteit van het volgens SPECIE-01 gezuiverde extract:

Onderzoek van baggerslib uit de Rotterdamse haven gaf een vergelijkbaar verschil (factor gemiddeld 75 \times ; Klamer *et al.*, 2002).

In het gezuiverde extract zijn, net als bij het SPECIE-01 extract (zie § 3.1), de gehalten aan PCB's, HCB, platte PCB's, dioxines en dibenzofuranen gemeten. Tabel 4 geeft de gehalten van de componenten waarvan een DR-CALUX TEF bekend is (zie ook Tabel 1). In het GPC-gezuiverde extract konden ook PAK's gemeten worden. De gehalten van deze stoffen zijn eveneens in Tabel 4 opgenomen.

Tabel 4: Gehaltes aan (platte) PCB's, HCB, dioxines, dibenzofuranen en PAK's in baggerslib van het Zeehavenkanaal te Delfzijl, bemonsterd op 11 oktober 2002 en gezuiverd met een niet-destructieve procedure (GPC). PAK's zijn in ng.g^{-1} , overige stoffen in pg.g^{-1} (droge stof).

Component	Gehalte [pg.g^{-1}]	Component	Gehalte [pg.g^{-1}]	Component	Gehalte [pg.g^{-1}]	Gehalte [ng.g^{-1}]	
PCBs		Dioxines		Dibenzofuranen		PAK's	
PCB 77	157	2,3,7,8-T4CDD	1,2	2,3,7,8-T4CDF	5,9	Fla*	338
PCB 81	4,2	1,2,3,7,8-P5CDD	2,3	1,2,3,7,8-P5CDF	6,7	Pyreen	249
PCB 105	$5,6 \times 10^3$	1,2,3,4,7,8-H6CDD	1,7	2,3,4,7,8-P5CDF	5,7	BaA*	139
PCB 118	$1,35 \times 10^3$	1,2,3,6,7,8-H6CDD	4,4	1,2,3,4,7,8-H6CDF	12	Chryseen	143
PCB 126	16	1,2,3,7,8,9-H6CDD	4,6	1,2,3,6,7,8-H6CDF	6,3	BbF*	236
PCB 169	2,4	1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	70	1,2,3,7,8,9-H6CDF	2,1	BkF*	105
		OCDD	619	2,3,4,6,7,8-H6CDF	4	BaP*	164
				1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	59	DbahA*	29,4
HCB	$3,38 \times 10^3$			1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	4,1	InP*	164
				OCDF	130		

Het chemische TEQ-gehalte aan dioxines, dibenzofuranen en (platte) PCBs in het extract was $19,7 \text{ pgTEQ.g}^{-1}$, wat vrijwel identiek is aan het SPECIE-01 extract ($19,8 \text{ pg TEQ.g}^{-1}$). Dit is te begrijpen omdat GPC-zuivering stoffen die de destructieve opwerking overleven, ook gewoon doorlaat (Leonards *et al.*,

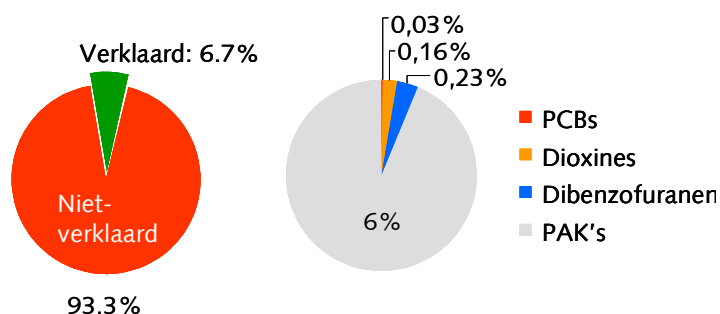
* Fla: Fluorantheen; BaA: Benzo[a]anthraceen; BbF: Benzo[b]fluorantheen; BkF: Benzo[k]fluorantheen; BaP: Benzo[a]Pyreen. DbahA: Dibenzo[ah]anthraceen; InP: Inden[1,2,3-cd]pyreen.

2002). Omdat de totale activiteit in het met GPC gezuiverde extract veel hoger is, wordt nu wordt slechts 0,4% van de respons door deze dioxine-achtige stoffen verklaard.

In het met GPC gezuiverde extract konden PAK's worden gemeten (zie ook § 4.3, screening). Het totale PAK gehalte was $1,72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ droge stof voor PAK's waar een DR-CALUX TEF van bekend was (zie Bijlage 1).

De chemische Σ TEQ van deze PAK's werd na berekening volgens formule 1 vastgesteld op $294 \text{ pgTEQ} \cdot \text{g}^{-1}$, ofwel 15 keer zo hoog als de TEQ van PCBs, dioxines en dibenzofuranen bij elkaar. De gemeten PAK's verklaarden 6% van de totale DR-CALUX respons in dit monster. In Figuur 11 worden de resultaten in het GPC extract nogmaals weergegeven.

Figuur 11: Van de totale DR-CALUX respons in het met GPC gezuiverde extract ($4693 \pm 681 \text{ pgTEQ} \cdot \text{g}^{-1}$) kan 6,7% worden verklaard. Het overgrote deel hiervan komt voor rekening van PAK's ($294 \text{ pgTEQ} \cdot \text{g}^{-1}$ ofwel 6% van het totaal).



In § 4.3, screening, wordt nader op de aard van de overige respons in het extract ingegaan.

4.2 Interactiestudie

De interactiefactor van het GPC extract was gelijk aan die van het extract dat volgens het SPECIE-01 protocol is bereid: ongeveer $1.7\times$. Ook nu moet benadrukt worden dat het om voorlopige resultaten gaat.

Dat de interactiefactor gelijk is, betekent waarschijnlijk dat de stoffen die de interactie veroorzaken stabiele stoffen zijn die de destructieve cleanup van het SPECIE-01 protocol overleven.

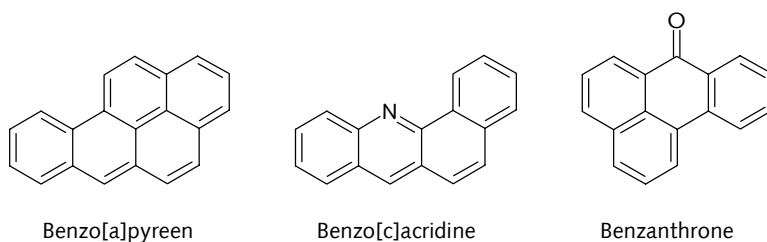
4.3 Screening

De gemeten DR-CALUX activiteit kan slechts voor een klein deel door bekende stoffen worden verklaard. Voor het grootste deel wordt de activiteit bepaald door nog onbekende stoffen. In het met GPC gezuiverde extract werden 558 verschillende stoffen gëndiceerd, waarvan er met behulp van laboratoriumstandaarden 76 konden worden gëdentificeerd. Vanwege de grootte is deze tabel opgenomen in de bijlage, Tabel B2.

Naast de bekende alkaan- en benzeenderivaten die ook in het volgens SPECIE-01 gezuiverde extract voorkwamen, bevatte het met GPC gezuiverde extract ook ftalaten en fenolen, PAK's (zie ook Tabel 4), stikstof-PAK's en derivaten hiervan.

Een groot deel van de gëdentificeerde PAK's en stikstof-PAK's zijn bekende Ah-agonisten en kunnen daardoor bijdragen aan de respons in de DR-CALUX test. Figuur 12 geeft enkele voorbeelden van deze stoffen.

.....
Figuur 12: Voorbeelden van stoffen in het met GPC gezuiverde extract. Van de 60 geïdentificeerde stoffen in dit extract hebben er 18 een aangetoonde Ah-Receptor affiniteit en 12 een gemeten DR-CALUX TEF, waaronder de drie getoonde stoffen.

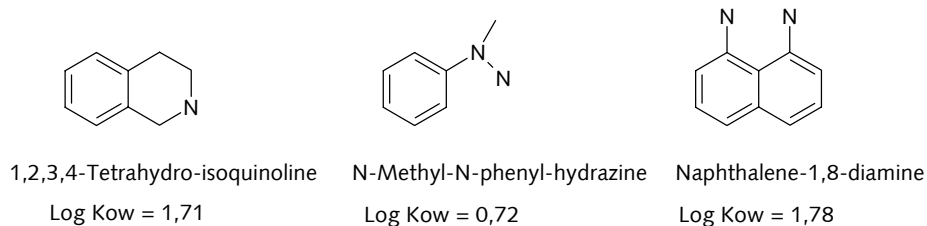


De Ah-receptor affiniteit van 12 van deze stoffen is vastgesteld met de DR-CALUX test en in de literatuur gepubliceerd (Machala *et al.*, 2001a en 2001b). Aanbevolen wordt gerichte analyses naar de gehalten van deze stikstof en zuurstof-PAK's uit te voeren ('target-analyse').

Voor een betere beoordeling van de bijdrage aan de totale activiteit wordt aanbevolen de activiteit van deze stoffen vast te laten stellen door hetzelfde laboratorium waardoor de overige DR-CALUX analyses in de TIE-studie zijn uitgevoerd.

Sommige stoffen met een gerapporteerde Ah-Receptor affiniteit hebben een relatief hoge wateroplosbaarheid, komen daardoor niet of nauwelijks in baggerslib voor en zijn daarom niet meegenomen in de berekening van de Σ TEQ van de geïdentificeerde stoffen. Zie Figuur 13 voor enkele voorbeelden (data van Nagy *et al.* 2002).

.....
Figuur 13: Voorbeelden van stoffen met aangetoond Ah-Receptor affiniteit (Nagy *et al.*, 2002), maar met een té hoge wateroplosbaarheid (lage Log Kow) om in de activiteit van baggerslib-extracten in de DR-CALUX test een rol te kunnen spelen.



4.4 Biologische beschikbaarheid van de chemisch geëxtraheerde stoffen.

Net als na de destructieve zuivering volgens het SPECIE-01 protocol, is de DR-CALUX activiteit in het sheetextract na GPC zuivering hoger dan in het sediment-extract: 8172 pgTEQ.g⁻¹ t.o.v. 4693 pgTEQ.g⁻¹.

Ook nu spelen dioxine-achtige stoffen (Tabel 1) geen rol van betekenis (zie ook § 3.5). Het gehalte aan deze stoffen is over het algemeen té laag voor detectie, waaruit geconcludeerd wordt dat de DR-CALUX respons door vooralsnog onbekende stoffen wordt veroorzaakt.

De resultaten van dit onderzoek wijzen er opnieuw op dat de stoffen die volgens het SPECIE-01 protocol de activiteit in de DR-CALUX test veroorzaken, niet of in ieder geval weinig, biologisch beschikbaar zijn.

De stoffen die volgens het SPECIE-01 protocol de activiteit in de DR-CALUX test veroorzaken, zijn niet, of in ieder geval weinig, biologisch beschikbaar.

5 Conclusies en Aanbevelingen

Deel I: uitvoering van de DR-CALUX test volgens het SPECIE-01 protocol.

De DR-CALUX activiteit in recent genomen baggerslibmonsters van baggervak 9 van het Zeehavenkanaal te Delfzijl bedraagt 43 ± 12 pg TEQ.g⁻¹. Hiermee voldoet het baggerslib aan de voorlopige CTT norm van 50 pgTEQ.g⁻¹. 46% van deze activiteit kon verklaard worden uit de gemeten aanwezigheid van dioxine-achtige verbindingen: dioxines, dibenzofuranen en platte PCBs.

Baggerslib uit vak 9 van het Zeehavenkanaal voldoet aan de voorlopige CTT-norm voor dioxine-achtige toxiciteit. Ongeveer de helft van de activiteit kon verklaard worden door de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen.

In het baggerslib zijn onbekende stoffen aanwezig die de activiteit van dioxine (2,3,7,8-T4CDD) in de DR-CALUX test verhogen. Voorlopige resultaten wijzen op een gemiddelde verhoging van 1,7x. Indien deze factor geldt voor alle gemeten dioxine-achtige verbindingen dan kan 77% van de gemeten activiteit verklaard worden door de aanwezigheid van deze verbindingen.

Aanbevolen wordt om onderzoek uit te voeren naar deze interactiefactor: wat is de exacte grootte, geldt de factor voor alle dioxine-achtige verbindingen, is de factor gelijk voor alle baggerslibmonsters of locatie-specifiek.

De DR-CALUX test overschat in de huidige opzet van het protocol de aanwezige hoeveelheid dioxine.

Uit een literatuurstudie blijkt dat, per ultimo 2002, 430 verschillende stoffen in de wetenschappelijke literatuur zijn gerapporteerd die een bewezen of vermoedelijke dioxine-achtige toxiciteit hebben. Bijna 25% hiervan zijn PAK's; stoffen die *niet* worden geanalyseerd wanneer het SPECIE-01 protocol wordt toegepast. Dioxine-achtige stoffen hebben met bijna 60% het grootste aandeel in de groep van 430.

Met behulp van siliconenrubbers werd een schatting gemaakt van de biologisch beschikbare fractie dioxine-achtige activiteit in de DR-CALUX test. De resultaten van dit onderzoek wijzen erop dat de stoffen die volgens het SPECIE-01 protocol de activiteit in de DR-CALUX test veroorzaken, niet of in ieder geval weinig, biologisch beschikbaar zijn.

Deel II: uitvoering van de DR-CALUX test met een niet-destructieve zuivering
RIKZ heeft een zuiveringsprocedure ontwikkeld en gevalideerd (GPC-zuivering), waarmee de aanwezige cocktail van organische stoffen in baggerslib beter bewaard blijft. Wanneer een baggerslibmonster daarna aan een biologische toets wordt blootgesteld, zal een betere indruk van de aanwezige stoffen worden verkregen dan wanneer een agressieve zuivering wordt toegepast.

Baggerslib bevat meer dioxine-achtige toxiciteit dan wordt gemeten volgens het SPECIE-01 protocol, tot wel 100 keer zo veel.

Dit betekent dat wellicht meer dioxine-achtige toxiciteit op zee mag worden verspreid dan wordt aangenomen.

Aanbevolen wordt:

- *onderzoek uit te voeren naar de chemische oorzaak van de hogere respons en*
- *onderzoek uit te voeren naar het biologisch werkingsmechanisme van deze stoffen.*

DR-CALUX activiteit in het baggerslibmonster uit het Zeehavenkanaal bedroeg na GPC zuivering 4693 ± 681 pgTEQ.g⁻¹, ofwel ruim honderd keer zo hoog als de activiteit in het volgens het SPECIE-01 protocol gezuiverde monster.

De beoordeling van de aanwezige dioxine-achtige toxiciteit met behulp van de DR-CALUX test volgens het SPECIE-01 protocol komt volgens dit onderzoek neer op het biologisch meten van de aanwezige hoeveelheid dioxines, dibenzofuranen en PCBs.

Een wisselend en soms laag percentage van de gemeten biologische activiteit kans door de aanwezigheid van deze stoffen worden verklaard (Stronkhorst *et al.*, 2002).

Aanbevolen wordt onderzoek uit te voeren naar de identiteit van de stoffen die de extra activiteit veroorzaken, naar hun oorsprong en persistentie in het milieu.

Screening van het met GPC gezuiverde extract laat zien dat in het baggerslib stoffen aanwezig zijn met een dioxine-achtige toxiciteit, met name PAKs en stikstof-PAKs. Aanbevolen wordt de DR-CALUX activiteit van deze stoffen te laten meten door hetzelfde laboratorium dat het baggerslibmonster heeft onderzocht. Hierdoor kan de bijdrage van deze stoffen aan de totale DR-CALUX activiteit nauwkeuriger vastgesteld worden.

De resultaten van het onderzoek naar de biologische beschikbare fractie DR-CALUX activiteit wijzen er opnieuw op dat de stoffen de activiteit in de DR-CALUX test veroorzaken, niet of in ieder geval weinig, biologisch beschikbaar zijn.

Aanbevolen wordt de in deze studie gestarte onderzoeksrichting naar GPC-zuivering en de siliconenrubber-extractie voort te zetten en de resultaten in nationaal en internationaal verband te valideren. Hiermee wordt de mogelijkheid geboden voortschrijdend wetenschappelijk inzicht in biologisch relevante extractie- en zuiveringsprocedures in het DR-CALUX protocol voor baggerslib te implementeren.

6 Literatuur

Aarts, Jac M.M.J.G. and Robin Palmer (2002). Established and deduced aromatic hydrocarbon (Ah) receptor (AhR) agonists and their relative potency. *i.o.v. RIKZ*

Besselink, H.T. and A. Brouwer (2003). Conversion of DR-CALUX-derived TCDD/F TEQs to WHO-TEQs. The determination of DR-CALUX to HRGCMS conversion factors for TCDDs/TCDFs and PCBs. Paper op Dioxin2003, Boston, USA.

Klamer, J.C. (1996). Dioxines en dibenzofuranen in sedimenten van het Zeehavenkanaal, Delfzijl. RIKZ werkdocument RIKZ/AB 94-609x.

Klamer, H.J.C., P.E.G. Leonards, M.H. Lamoree, and J.F. Bakker (2002). Chemical and toxicological risk assessment of North Sea surface sediments. Brominated flame retardants and dioxin-type toxicity. *Organohalog. Comp.* **59**, 111-114.

Leonards, P.E.G., I. van de Veen, M. Lohman, E. Felzel en S. Man (2002). *Vergelijk van extractie- en zuiveringsmethoden voor sediment voor analyse met de DR-CALUX assay.* RIVO, notanr. C048/02.

Machala, M., J. Vondracek, L. Blaha, M. Ciganek, J. Neca (2001a). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mut. Res.* **497**, 49-62.

Machala, M., M. Ciganek, L. Bláha, and J. Vondrák (2001b). Aryl hydrocarbon receptor-mediated and estrogenic activities of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes originally identified in extracts of river sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **20(12)**, 2736-2743.

Mount, D.I., L. Anderson-Carnahan (1988). *Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I. Toxicity characterization procedures.* US EPA, notanr. 600/3-88/034.

Murk, A.J., J. Legler, M.S. Denison, J.P. Giesy, C. van de Guchte, and A. Brouwer (1996). Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**, 149-160.

Nagy, S.R., G. Liu, K.S. Lam and M.S. Denison (2002). Identification of novel Ah receptor agonists using a high-throughput green fluorescent protein-based recombinant cell bioassay. *Biochemistry* **41**, 861-8.

Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* **21(1)**, 51-88

Stronkhorst, J., C.A. Schipper, J. Honkoop & K. van Essen (2001). Baggerspecie in zee: hoe regelen we dat verantwoord. Een nieuw effectgericht beoordelingssysteem. RIKZ, notanr. RIKZ/2001.030, pp.78.

Stronkhorst, J., P.E.G. Leonards, A.J. Murk (2002). Using the dioxin receptor-CALUX *in vitro* bioassay to screen marine harbor sediments for compounds with a dioxin-like mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* **21(12)**, 2552-2561.

7 Bijlage

PAK	DR-CALUX TEF
Fluorantheen (Fla)	2,27E-08
Pyreen	1,78E-06
Benzo[a]anthraceen (BaA)	7,04E-06
Chryseen	1,01E-04
Benzo[b]fluorantheen (BbF)	3,35E-05
Benzo[k]fluorantheen (BkF)	1,64E-03
Benzo[a]pyreen (BaP)	9,01E-05
Dibenzo[ah]anthraceen (DbahA)	1,17E-03
Indeno[1,2,3-cd]pyreen (InP)	2,96E-04

Tabel B1: DR-CALUX TEF-waarden van PAK's (Machala *et al.*, 2001a en 2001b).

Naam	Conc. [µg/kg]	Naam	Conc. [µg/kg]
1,2,3-Trimethylbenzeen	19	Benzo[h]quinoline	22
1,2,4,5-Tetramethylbenzeen	13	Benzo[k]phenanthreen	92
1,2,4-Trichlorobenzeen	13	Biphenyl	40
1,2,4-Trimethylbenzeen	38	Carbazol	28
1,2-Benzeendicarboxylzuur, diethyl ester	13	Cholesterol	213
1,2-Benzeendicarboxylzuur, dimethyl ester	18	Chryseen	90
1,3-Dichlorobenzeen	14	Decaan	26
1,4-Dichlorobenzeen	15	Dibenz[a,h]anthraceen	52
1-Hexanol, 2-ethyl-	24	Dibenzofuraan	56
1H-Inden-1-on, 2,3-dihydro-	8	Di-n-butyl phthalaat	23
1-Octanol	35	di-sec-octyl phthalaat	29
2-(2-n-butoxyethoxy)ethanol	34	Docosaan	158
2-Cyclohexen-1-on, 3,5,5-trimethyl-	18	Dodecaan	32
2-Methylquinoline	9	Eicosaan	93
3-Methyl-1,1'-biphenyl	27	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	42
3-Methylphenol	40	Heenicosaan	166
7H-Benz[de]anthracen-7-on	38	Heptadecaan	162
9,10-Anthraceendion	35	Hexacosaan	188
9H-Fluoreen	54	Hexadecaan	71
Acenaphtheen	42	Indeno[1,2,3-cd]pyreen	80
Acenaphthyleen	20	Indol	12
Acridine	22	Naphthaleen	55
Anthraceen	118	Naphthaleen, 1-methyl-	38
Benz[a]anthraceen	109	Nonadecaan	86
Benz[c]acridine	39	Octacosaan	183
Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-	9	Octadecaan	95
Benzeen, 1,3-dichloro-2-isocyanato-	13	Pentacosaan	264
Benzeenmethanol	16	Pentadecaan	78
Benzo(b)carbazol	23	Phenanthreen	118
Benzo[a]pyreen	132	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	66
Benzo[b]fluorantheen	101	Phenol, 4-(1,1-dimethylethyl)-	41
Benzo[b]fluoren-11-on	38	Tetracosaan	171
Benzo[b]naphtho[1,2-d]thiopheen	74	Tetradecaan	50
Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiopheen	73	Triacotaan	167
Benzo[b]naphtho[2,3-d]thiopheen	44	Tricosaan	233
Benzo[c]carbazol	23	Tridecaan	42
Benzo[e]pyreen	125	Tritriacontaen	293
Benzo[ghi]peryleen	104	Undecaan	31

Tabel B2: Geïdentificeerde stoffen in het met GPC gezuiverde baggerslibextract. Gehaltes zijn in µg/kg droge stof

