



Monitoring van 3 gevaarlijke stoffen in biota in de oppervlaktewateren van het Brussels Hoofdstedelijk Gewest

Finale versie

Maarten De Jonge, Freddy Dardenne en Lieven Bervoets

Auteurs:

Maarten De Jonge

Freddy Dardenne

Lieven Bervoets

Contact:

Universiteit Antwerpen, Departement Biologie

SPHERE - Systemisch Fysiologisch en Ecotoxicologisch Onderzoek

Groenenborgerlaan 171

B-2020 Antwerpen

www.sphere.be

Tel: ++/32/(0)3/2653533

Fax: ++/32/(0)3/2653497

E-mail: Maarten.Dejonge@ua.ac.be

Deze studie werd uitgevoerd in opdracht van het Brussels Instituut voor Milieubeheer (BIM) en dient te worden geciteerd als:

De Jonge M., Dardenne F. & Bervoets L. 2013. Monitoring van 3 gevaarlijke stoffen in biota in de oppervlaktewateren van het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Universiteit Antwerpen in opdracht van het Brussels Instituut voor Milieubeheer (BIM), Antwerpen, België.

Inhoudsopgave

Nederlandstalige samenvatting	5
English abstract	6
1. Inleiding	7
2. Materiaal en Methoden	11
2.1 Meetlocaties	11
2.2 Actieve biomonitoring met karper	11
2.3 Staalverwerking	13
2.4 Chemische analyse	15
2.4.1 Hg-analyse	15
2.4.2 Hexachloorbenzeen- en hexachloorbutadieen-analyse	16
2.5 Statistische verwerking	17
3. Resultaten	18
3.1 Hexachloorbenzeen en hexachloorbutadieen	18
3.2 Kwik	18
3.2.1 Toetsing MKN	18
3.2.2 Relatie met gewicht en vetgehalte	19
3.2.3 Vergelijking spierweefsel en totale vis	20
3.2.4 Tijdsafhankelijke accumulatie	21
4. Discussie	23
4.1 Bioaccumulatiemonitoring met karper	23
4.2 Vergelijking pollutentaccumulatie met biota-MKN	25
4.2.1 Hexachloorbenzeen en hexachloorbutadieen	25
4.2.2 Kwik	26
4.3 Vergelijking accumulatie volledige vis vs. Spier	27
4.4 Tijdsafhankelijke accumulatie	28
5. Conclusies en aanbevelingen	29
6. Referentielijst	31

Nederlandstalige samenvatting

Ter bescherming van het aquatische milieu stelde de Europese Commissie (EC) een lijst op van 33 prioritaire stoffen waarvoor een milieukwaliteitsnorm (MKN) in water werd afgeleid. Bepaalde stoffen zijn door hun lipofiele karakter echter moeilijk meetbaar in water en dienen bij voorkeur in sediment of biota te worden gemeten. Daarom werden door de EC biotanormen vastgelegd voor de drie prioritaire stoffen (methyl)kwik (Hg), hexachloorbenzeen (HCB) en hexachloorbutadieen (HCBd). De huidige studie voerde voor deze stoffen bioaccumulatiemonitoring uit in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest (BHG) met behulp van gekooide karpers (*Cyprinus carpio*). Juveniele karpers werden in mei 2013 uitgehangen op vijf meetplaatsen binnen het gewest en werden achtereenvolgens na 2, 4 en 6 weken opgehaald, waarna pollutanten werden geanalyseerd in zowel spierweefsel als totale vis.

Ondanks een goede overleving van de gekooide organismen op de meeste meetplaatsen na zes weken blootstelling, werd op bepaalde sites een verhoogde mortaliteit vastgesteld en gingen sommige kooien stuk of verloren. Om een maximale overleving van de blootgestelde organismen te garanderen, werden enkele aanbevelingen gemaakt met betrekking tot toekomstige bioaccumulatiemonitoring (vb. gebruik van sterkere materialen, het vetgehalte mee bepalen en de kooien uithangen in het midden van de rivier om dichtslibben te voorkomen).

Voor de stoffen HCB en HCBd lagen de concentraties steeds onder de rapportagegrens en dus onder de biota-MKN. Wat betreft de bioaccumulatie van Hg werden op alle meetplaatsen normoverschrijdingen vastgesteld, inclusief de organismen op tijdstip 0. Door de verhoogde achtergrondconcentraties en mede door de grote verschillen in voedselaanbod en vetgehalte van de vissen per meetplaats wordt de interpretatie van de Hg resultaten bemoeilijkt. Aangezien er op het meetpunt Zenne_UIT voldoende voeding aanwezig was maar geen toename in Hg werd geobserveerd wijst dit echter op een beperkte biobeschikbaarheid van deze pollutant in het milieu. In vergelijking met Hg-bioaccumulatie in vissen uit diverse Vlaamse en Europese waterlopen liggen de Hg-concentraties in deze studie eerder laag. Literatuuronderzoek toont aan dat de huidige biota-MKN voor Hg erg laag ligt en mogelijk onhaalbaar is voor de meeste EU-lidstaten (inclusief het BHG). Daarnaast toonde deze studie aan dat Hg-concentraties in spierweefsel hoger liggen dan deze gemeten in totale vis, hoewel het meten in totaal weefsel meer relevant is voor de toetsing aan biota-MKN die zijn opgesteld voor bescherming tegen secundaire vergiftiging.

English abstract

In order to protect the aquatic environment the European Commission (EC) has formulated a list of 33 priority pollutants, for which environmental quality standards (EQS) were derived. Due to their lipophilic properties some pollutants are however difficult to quantify in surface water and are preferably measured in sediment or biota. Therefore the EC proposed biota-EQS for the priority pollutants (methyl)mercury (Hg), hexachlorobenzene (HCB) and hexachlorobutadiene (HCBD). The present study performed bioaccumulation monitoring for these pollutants in the Brussels Capital Region (BCR) using caged carp (*Cyprinus carpio*). Juvenile carp were exposed in May 2013 at five sites within the region and subsequently collected after 2, 4 and 6 weeks, after which pollutants were analyzed in both muscle tissue and whole fish.

Although survival of the caged organisms was sufficient at most sites after six weeks of exposure, at some sites elevated fish mortality was observed and cages went lost or broken. To guarantee maximal survival of the caged fish, some recommendations were made regarding future bioaccumulation monitoring (e.g. use of stronger materials, measurement of lipid content and to place the cages in the middle of the river to prevent extreme sedimentation).

Regarding HCB and HCBD, concentrations in caged fish were below detection limits at all sites. Based on our results these pollutants currently are no problem in the BCR. Mercury bioaccumulation exceeded the biota-EQS at all sites, including the non-exposed fish. Due to the elevated background concentrations and the large differences in food availability and lipid content between sites, results regarding Hg bioaccumulation are difficult to interpret. Nevertheless the high food availability and lipid content together with the minor Hg addition observed in caged carp at site Zenne_UT, indicate a low bioavailability of the pollutant in the environment. Hg concentrations in caged carp of the present study were rather low compared to Hg bioaccumulation in fish from different Flemish and European watercourses. Based on literature review the current biota standard for Hg seems very low and possibly unfeasible for most European member states (including BCR). In addition the present study demonstrated that Hg concentrations in muscle tissue are generally higher compared to measurements based on whole fish. Nevertheless measurements in whole fish are more relevant for testing body concentrations against biota EQS, which are derived in order to protect against secondary poisoning.

1. Inleiding

Oppervlaktewateren en aquatische ecosystemen staan onder druk van chemisch verontreiniging, die mede veroorzaakt wordt door menselijke activiteiten. Dit heeft, samen met de ingrepen in de structuur, het verlies aan habitat en een dalende biodiversiteit tot gevolg. Afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van een stof kan deze zich manifesteren als bioaccumulatief en zich daardoor opconcentreren doorheen de voedselketen. De mens wordt vooral via de voedselketen aan verontreiniging van het aquatische milieu blootgesteld, i.e. door het eten van vis en schaaldieren.

De Europese commissie (EC) nam al verscheidene initiatieven om het aquatische milieu te beschermen tegen de nadelige effecten van schadelijke stoffen. Een concreet voorbeeld hiervan is de Europese dochterrichtlijn 2008/105/EC (omgezet op 24/3/2011 in Brussels recht) met betrekking tot milieukwaliteitsnormen (MKN) en de Kaderrichtlijn Water (KRW) (EC, 2000, 2008). Hierbij werd een lijst opgesteld van 33 prioritaire stoffen waarvoor een MKN voor waterconcentraties werd afgeleid. Bepaalde stoffen zijn echter door hun hydrofobe eigenschappen slecht meetbaar in water en zullen eerder binden aan de waterbodem of zich opstapelen in organismen. Voor deze pollutanten kan het raadzaam zijn om concentraties te gaan meten in weefsel van organismen in plaats van in water. Daarbij kunnen pollutantconcentraties in water vaak grote variaties vertonen doorheen de tijd en door plaatsgebonden verschillen in fysisch-chemische karakteristieken. Geaccumuleerde pollutantconcentraties in weefsel zullen deze verschillen integreren in tijd en plaats en daarom minder variëren.

De Europese dochterrichtlijn 2008/105/EC gaat uit van twee types MKN voor de waterkolom. Enerzijds een MKN op basis van een jaarlijks gemiddelde concentratie en anderzijds een MKN op basis van een maximaal toelaatbare concentratie gericht op zowel lange termijn chronische effecten als op korte termijn acute impact. De richtlijn laat de lidstaten de keuze om in bepaalde categorieën oppervlaktewateren te kiezen om MKN voor sediment en/of biota toe te passen in plaats van de normen op basis van metingen in de waterkolom. Dit voor stoffen waarvoor het niet mogelijk is om voldoende bescherming te bieden tegen directe effecten en doorvergiftiging (secundaire vergiftiging) enkel gebaseerd op MKN in water (bv. kwik); voor stoffen waarvoor er momenteel geen goede methoden voorhanden zijn om in water te meten (bv. chlooralkanen); voor stoffen waarvoor de concentratie in water slecht meetbaar is (bv. tributyltin); en voor stoffen

waarvoor de spreiding in bioconcentratiefactoren (BCF) zo groot is dat omrekening naar doorvergiftigingsrisico's vanuit de analyses in water niet haalbaar is (bv. lood) (EC, 2008).

Voor drie prioritaire stoffen werden al officiële MKN op basis van biota vastgelegd nl. voor **kwik** en -verbindingen (Hg) een MKN van $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, voor **hexachloorbenzeen** (HCB) een MKN van $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ en voor **hexachloorbutadien** (HCBd) een MKN van $55 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabel 1). Deze normen gelden voor metingen in weefsel van prooidieren (uitgedrukt per versgewicht) zoals vissen, weekdieren, schaaldieren en andere biota, waarbij de lidstaten vrij zijn in hun keuze voor het meest geschikte biomonitoringorganisme.

Tabel 1: Overzicht van bestaande biotanormen in de EU, Canada en VSA voor de bescherming van het aquatische leven voor secundaire vergiftiging via de voedselketen. *: Kan gemeten worden in vis, weekdieren, schaaldieren en andere biota. De EU lidstaten zijn vrij in hun keuze voor het al dan niet meten in biota en voor het meest geschikte organisme; ^Δ: Uitgedrukt in toxische equivalent eenheid (Toxic Equivalent Unit of TEQ), deze wordt bekomen door waarde te vermenigvuldigen met equivalentie factor (TEF), welke verschilt per chemisch congeener (De Jonge et al., 2012a).

Land	Richtlijn	Stof	Concentratie in biota ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ww)	Matrix
EU	Dochterrichtlijn (2008/105/EC)	Methylkwik	20	Prooidieren*
		Hexachloorbenzeen	10	Prooidieren*
		Hexachloorbutadien	55	Prooidieren*
Canada	Canadian Environmental quality guidelines (1999)	ΣDDT	14	Prooidieren
		Methylkwik	33	Prooidieren
		PCB's	Zoogdieren: $0.79 \text{ (ng TEQ kg}^{-1} \text{ ww)}^{\Delta}$	Prooidieren
			Vogels: $2.4 \text{ (ng TEQ kg}^{-1} \text{ ww)}^{\Delta}$	Prooidieren
		PCDD's, PCDF's (dioxinen en furanen)	Zoogdieren: $0.71 \text{ (ng TEQ kg}^{-1} \text{ ww)}^{\Delta}$	Prooidieren
			Vogels: $4.75 \text{ (ng TEQ kg}^{-1} \text{ ww)}^{\Delta}$	Prooidieren
		Toxafeen	6.3	Prooidieren
VSA+ Canada	Great Lake water quality agreement (1987)	Methylkwik	500	Top predatoren (vis)
		ΣPCB	100	Top predatoren (vis)
		ΣDDT	1000	Top predatoren (vis)

Vanaf eind 2015/begin 2016 wordt biotamonitoring tevens verplicht voor de volgende polluenten: Gebromeerde difenylethers (PBDE), de polyaromatische koolwaterstoffen (PAK) Fluorantheen en Benzo(a)pyreen, Dicofol, Perfluoroctaansulfonzuur en zijn derivaten (PFOS), Dioxinen en dioxineachtige verbindingen, Hexabroom-cyclododecaan (HBCDD), Heptachloor en heptachloor-epoxide (omzetting nieuwe dochterrichtlijn 2013/39/EG) (EC, 2013).

Volgens de richtlijn opgesteld door de Europese Commissie voor de chemische monitoring in biota onder de KRW (EC, 2010) moet een geschikte biomonitor aan de volgende eisen voldoen:

- Er moet een duidelijke relatie bestaan tussen de pollutieconcentraties in het organisme en gehalten in de omgeving
- Het bemonsterde organisme dient een prooidier te zijn voor predatoren (secundaire vergiftiging) of dient als voedsel voor de mens (humane consumptie)
- Het organisme accumuleert verschillende klassen van pollutanten
- Het organisme is sedentair en is dus representatief voor een bepaalde locatie
- De soort is wijdverspreid en komt in voldoende grote aantallen voor in het studiegebied
- Het organisme heeft een levensduur die lang genoeg is zodat, indien nodig, dezelfde populatie in de tijd kan bemonsterd worden
- Er dient voldoende biomassa te zijn voor analyse van verschillende pollutieclassen
- Het organisme is gemakkelijk te bemonsteren en tolerant t.o.v. vervuiling of afwijkende condities
- Het organisme is gemakkelijk en snel identificeerbaar

Concentraties vastgesteld in biota kunnen beïnvloed worden door tal van factoren (leeftijd, al dan niet in voortplantingsperiode, vetgehalte, voedingswijze, intern metabolisme,...). Zo zal de voedingswijze van het organisme in grote mate bepalen of de soort blootgesteld wordt via water, sediment, voeding, zwevend materiaal of een combinatie van voorgaande (De Jonge et al., 2012b). Het metabolisme van de soort bepaalt of de geaccumuleerde pollutanten (snel) worden afgebroken en/of geëlimineerd. Aandachtspunten voor bioaccumulatiemonitoring omvatten het inperken van seizoenale variabiliteit. Deze kan in grote mate gereduceerd worden door de bemonsteringsperiode en/of blootstellingsperiode op voorhand vast te leggen en constant te houden in de loop van de volgende jaren. Hierbij is het van belang dat er een constant voedselaanbod beschikbaar is en dat de omgevingscondities niet te streng zijn, zodat het organisme geen afwijkend gedrag vertoont. Verder dienen ook site-specifieke karakteristieken mee in rekening te worden gebracht, zoals waterloopkarakteristieken en bijzondere gebeurtenissen (bv. hermeanderingsprojecten en sanering). Algemeen wordt een lage frequentie (jaarlijks, 3-6 jaarlijks) van monitoren voorgesteld indien de beschouwde waterloop weinig

vervuild is. Een meer frequente bemonstering (wekelijks, maandelijks) is aangewezen indien de waterloop in het (recente) verleden aan verhoogde concentraties van één of meerdere polluenten is blootgesteld (De Jonge et al., 2012a). Om de vergelijkbaarheid van resultaten te vergroten is het aan te bevelen om polluenten op verschillende locaties, waar mogelijk, te bepalen in dezelfde organismen. Aangezien op de Zenne tot op heden geen vissen werden vastgesteld werd in de huidige studie geopteerd om te werken met gekooide organismen (actieve biomonitoring). Het werken met gekooide organismen zorgt voor een gestandaardiseerde blootstelling, waarbij steeds dezelfde soort voor vaste tijdsperiode wordt uitgehangen. In de huidige studie werd gekozen om te werken met karper (*Cyprinus carpio*). Deze inheemse vissoort is zeer tolerant voor vervuiling en omgevingsstress, is een goede accumulator van diverse micropolluenten en is gemakkelijk te manipuleren. Karpers voeden zich voornamelijk met detritus en benthische macro-invertebraten, waarbij ze de waterbodem sterk omwoelen (Vandelannoote et al., 1998). Hierdoor worden ze aan pollutentconcentraties in zowel water als sediment blootgesteld (De Jonge et al., 2012a). Daarbij werd karper reeds gebruikt in kooi-experimenten zowel in Vlaanderen (Reynders et al. 2008; Bervoets et al., 2009) als in Nederland (Verweij et al., 2004) waarbij deze soort geschikt werd bevonden voor de biomonitoring van micropolluenten in het aquatische milieu.

De doelstellingen van de huidige studie waren:

- 1) Uitvoeren en kritische evaluatie van bioaccumulatiemonitoring in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest met behulp van gekooide karper (*Cyprinus carpio*) voor de prioritaire stoffen kwik en zijn verbindingen, hexachloorbenzeen en hexachloorbutadieen als pilootproject voor toekomstige monitoring.
- 2) Vergelijking van pollutentaccumulatie in het weefsel van karper met de huidige EU biota-MKNs voor deze stoffen en nagaan of de norm al dan niet wordt overschreden.
- 3) Vergelijking van pollutentaccumulatie in spierweefsel van karper met deze gemeten in de totale vis.
- 4) Opvolgen van accumulatie doorheen de tijd (na 2, 4 en 6 weken) om een geschikte blootstellingsperiode af te leiden voor biotamonitoring van de desbetreffende polluenten.

2. Materiaal en Methoden

2.1 Meetlocaties

Als bemonsteringspunten werden de vijf door het BIM vastgelegde Toestand & Trend meetpunten gekozen, conform de Kaderrichtlijn Water, allen gelegen op het grondgebied van het Brusselse Hoofdstedelijk Gewest (Zenne, Kanaal en Woluwe). Deze zijn achtereenvolgens de Zenne bij het binnenkomen van het Gewest (ZEN_IN), de Zenne bij het verlaten van het Gewest en vlak na het waterzuiveringsstation Brussel-Noord (ZEN_UIT), het Kanaal (Kanaal Brussel-Charleroi) bij het binnenkomen van het Gewest (KAN_IN), het Kanaal bij het verlaten van het Gewest (KAN_UIT) en de Woluwe bij het verlaten van het gewest (WOL_UIT). Bijkomend werden kooien uitgehangen op een referentiesite in Nijlen. Deze site werd gekozen op basis van zijn ligging in een landelijk gebied, zonder gebruik van meststoffen en bestrijdingsmiddelen in de nabije omgeving, en deed in deze studie dienst als onvervuilde controle. Tabel 2 geeft een overzicht van de staalnameplaatsen (1-5) en de referentiesite (6).

Tabel 2: Plaats en coördinaten van de bemonsteringspunten (1-5) en de referentiesite (6).

Bemonsteringspunt	Code	BIM meetpunt	Plaats	X	Y
1 Zenne	ZEN_IN	ZEN025	Anderlecht, Viangros	145398	167278
2 Zenne	ZEN_UIT	ZEN070	Haren, Budabrug	153035	177441
3 Kanaal	KAN_IN	KAN005	Anderlecht, Ring West	149659	177053
4 Kanaal	KAN_UIT	KAN050	Haren, Budabrug	152751	177153
5 Woluwe	WOL_UIT	WOL 025/035	Woluwe, Hof ter Musschen	155425	171645
6 Referentie	REF	-	Nijlen, privé vijver	173683	205288

2.2 Actieve biomonitoring met karper

Vier weken voor de blootstelling werden juveniele karpers (*Cyprinus carpio*), afkomstig uit dezelfde stock (Intratuin, Aarschot), geacclimatiseerd aan een gemiddelde watertemperatuur van 17 ± 1 °C in één aquarium met niet-koperhoudend, onthard leidingwater (1300 L). Hier werden ze dagelijks 2% van het gemiddelde lichaamsgewicht gevoed gedurende 4 weken voor de blootstelling. Het water werd biologisch en mechanisch gefilterd, continu belucht, en ammoniak-

(< 0.25 mg L⁻¹) en nitriet- (< 50 mg L⁻¹) concentraties werden opgevolgd. Bij overschrijding van de ammoniak- en/of nitriet- concentraties werd telkens 30% van het water ververst.

Op 28 mei 2013 werden karpers op alle meetplaatsen uitgehangen in plasticen kooien (twee aan elkaar vastgemaakte vijvermanden: 60 cm x 40 cm x 40 cm met maasgrootte ± 2 mm x 4 mm) (Foto 1). De kooien werden uitgehangen in vrij zwevende toestand ongeveer 30 tot 50 cm onder het wateroppervlak, verzwaard met stenen en richting de oevers verankerd. Deze opstelling werd recentelijk getest en als de meeste geschikte geacht voor actieve biomonitoring met karper. Dit na een testperiode van 10 dagen waarin de geteste vissen geen daling vertoonden van de relatieve conditie factor (RCF), ongeacht een continue stroming, veel sediment en een twijfelachtige waterkwaliteit (Schoenaers, 2013). Er werden telkens drie replicaten gebruikt met acht individuen, wat resulteerde in een totaal van 24 karpers per meetplaats en per tijdstip (startaantal van 72 individuen verdeeld over 9 kooien). De manden werden gedurende zes weken wekelijks gecontroleerd op overtollig slib en integriteit. De kooien werden ter inspectie voor enkele seconden uit het water getild, waarna gekeken werd naar de hoeveelheid geaccumuleerd slib op en in de kooien, het uiterlijk van de vissen en eventuele mortaliteit. Bij vissterfte werd de kooi deels in het water geopend, de dode vis(sen) verwijderd, en de gesloten kooi terug geplaatst.



Foto 1: Kooi gebruik voor actieve biomonitoring met karper.

Na respectievelijk 2, 4 en 6 weken werden per meetplaats drie kooien bemonsterd. Levende organismen werden eerst afgespoeld met oppervlaktewater van de betreffende meetplaats waarna ze werden gedood door toediening van een overdosis trycaine methylsulfaat (MS 222). De

weefsels werden op ijs gekoeld tijdens transport en bij aankomst in het labo meteen ingevroren op -20 °C in afwachting van verdere behandeling en analyse.

Op meetplaats KAN_UIT konden na 2 weken slechts twee van de negen kooien worden teruggevonden (Tabel 2). Hierbij waren de touwen duidelijk gescheurd, waarschijnlijk door het aanleggen van één of meerdere boten aan de kade. De overgebleven kooien waren ook duidelijk beschadigd waardoor per kooi één of meerdere vissen waren ontsnapt. Op meetpunt ZEN_UIT waren na 4 weken alle kooien dichtgeslibd met sediment, waardoor er veel mortaliteit was en er slechts vier individuen konden worden meegenomen voor analyse op dit tijdstip. De massale opstapeling van sediment in de kooien is mogelijk te wijten aan of overstorten bij regenweer op de Zenne, of verlies van bentoniet ter hoogte van een werf een beetje bovenstrooms van de meetlocatie (mondelinge mededeling BIM). De overlevenden uit de overige kooien werden gepoold in een nieuwe, propere kooi waarna er geen additionele mortaliteit meer werd vastgesteld op meetpunt ZEN_UIT na 6 weken blootstelling. Op meetpunt REF waren er geen overlevenden na 6 weken blootstelling door een sterke overwoekering van waterplanten, wat waarschijnlijk aanleiding gaf tot zuurstofloosheid in de kooien.

Tabel 2: Totaal aantal overlevende per meetplaats en tijdstip. Het startaantal bedroeg per meetplaats 72 individuen (3 replicaten x 8 individuen x 3 tijdstippen). - : Geen kooien meer teruggevonden.

	Code	2 weken	4 weken	6 weken	Opmerkingen
1	ZEN_IN	24	22	21	/
2	ZEN_UIT	24	4	8	Veel mortaliteit na 4 weken; resterende overlevenden werden gepoold in 1 kooi
3	KAN_IN	24	22	19	/
4	KAN_UIT	8	-	-	Na 2 weken slechts 2 kooien teruggevonden, beide waren beschadigd. Waarschijnlijk aanvaring met boot.
5	WOL	24	20	13	/
6	REF	24	15	0	Geen overlevende na 6 weken; te sterke begroeiing met waterplanten

2.3 Staalverwerking

In het labo werden de vissen per replicaat en per tijdstip gemend voor pollutieanalyse (Tabel 3). Op meetplaats ZEN_UIT werden na 4 weken blootstelling dode vissen gebruikt voor replicaat 2

en 3, aangezien het betreffende weefsel nog voldoende vers was voor analyse. Op meetpunt KAN_UIT werd uit de twee overgebleven kooien telkens één individu gehaald om tot een derde pseudo-replicaat te komen. Ook voor meetpunt REF werd een derde pseudo-replicaat gemaakt op basis van de overige kooien. Op een select aantal stalen werd spierweefsel gedissecteed en gemengd (Tabel 4). Dit om de vergelijking te kunnen maken tussen pollutantaccumulatie in spierweefsel en de hele vis, zoals werd geformuleerd in doelstelling 3.

Alle stalen voor pollutantanalyse werden vacuüm en gekoeld verpakt, waarna deze werden opgestuurd voor verdere analyse.

Tabel 3: Overzicht van het aantal stalen hele vis die per replicaat en tijdstip werden gepoold voor pollutantanalyse. †: Dode vissen werden gebruikt. *: Pseudo-replicaat.

	Code	Replicaat	2 weken	4 weken	6 weken	Opmerkingen
1	ZEN_IN	1	6	6	6	
		2	6	4	3	
		3	6	6	6	
2	ZEN_UIT	1	6	2	6	Allen uit één kooi (6 w)
		2	6	4 †	-	
		3	6	5 †	-	
3	KAN_IN	1	6	5	6	
		2	6	5	4	
		3	6	6	3	
4	KAN_UIT	1	2	-	-	
		2	2	-	-	
		3	2*	-	-	Uit kooi 1 en 2 werd één vis genomen (2 w)
5	WOL	1	6	5	2	
		2	6	5	2	
		3	6	4	3	
6	REF	1	6	3	0	
		2	6	3	0	
		3	6*	3	0	Afkomstig uit kooi van replicaat 2 (4 w)

Tabel 4: Overzicht van aantal stalen die werden gemengd voor pollutantanalyse in spierweefsel. Additioneel werd ook één pool gemaakt van spierweefsel van 24 individuen op tijdstip 0.

	Code	2 weken	4 weken	6 weken
1	ZEN_IN	24	24	19
2	ZEN_UIT	24	-	-
3	KAN_IN	24	22	-
4	KAN_UIT	9	-	-
5	WOL	-	-	-
6	REF	-	12	-

2.4 Chemische analyse

Pollutantanalyses werden uitbesteed aan Laboratorium ECCA. Laboratorium ECCA is een onafhankelijk laboratorium met meer dan 30 jaar ervaring in analyses en consultancy. Het laboratorium is geaccrediteerd volgens EN ISO 17020 en ISO 17025. Labo ECCA is gespecialiseerd in voeding-, diervoeding- en milieuanalyses. De voornaamste activiteiten situeren zich in de microbiologie, chemische voedingsanalyses, chromatografie en ecotoxicologie. Wat betreft milieuanalyses staat ECCA in voor de correcte bepaling van de afvalwaterheffing en de naleving van de milieueffing. Algemene chemische parameters en anorganische parameters, waaronder metalen, alsook organische parameters worden bepaald met geavanceerde hoogwaardige instrumenten. Voedingsanalyses omvatten routineanalyses, controleanalyses en houdbaarheidstesten waarbij de chemische en bacteriologische kwaliteit van voedingswaren en hun grondstoffen worden gecontroleerd. Geavanceerde apparatuur zoals onder andere LC/MSMS, GC/MS, HPLC, AAS en ICP/MS, ondersteunt de gespecialiseerde analysetechnieken.

Bij aankomst in het ECCA labo werden alle visstalen (hele vis en spierweefsel op een beperkt aantal stalen) gehomogeniseerd met behulp van een inox mixer. Hiervan werd telkens een deelstaal (minimum 5 g is noodzakelijk voor analyse van zowel, Hg, HCB en HCBD) genomen voor pollutentextractie en analyse.

2.4.1 Hg-analyse

De stalen ondergaan digestie in ultrapuur HNO₃ (69% zuiverheid) in een sequentieel hogedruk microgolf systeem (Discover SP-D Explorer, CEM Corporation, Matthews, NC 28106, USA). Dit is een volledig gesloten digestiesysteem dat onder de gebruikte condities meer dan 95% recovery toelaat voor alle elementen, inclusief het vluchtige kwik. De analyse gebeurt op een high resolution inductively coupled plasma mass spectrometer (HR-ICP-MS; Thermo Scientific, Finnigan Element 2, Waltham, MA, USA). Het toestel wordt gebruikt in “cold plasma mode”.

Methodekarakteristieken van Hg analyse zijn achtereenvolgens een LOD (Limit of detection) < 1 ppt; een LOQ (Limit of quantification) < 50 ppt ($\approx 0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ voor een staal van 5 g in 3 ml volume), een rapporteringsgrens¹ van $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ en een meetonzekerheid² van 20%.

2.4.2 Hexachloorbenzeen- en hexachloorbutadieen-analyse

Hiervoor wordt 5 g staal in een mortier vermengd met Na_2SO_4 en gehomogeniseerd tot een droog poeder bekomen wordt. Het gedroogde staal wordt onderworpen aan een ASE-extractie (ASE: accelerated solvent extraction-toestel van dionex). Voor extractie wordt in de ASE-cel een inwendige standaardoplossing gespiket (^{13}C -hexachloorbenzeen). De gebruikte extractievloeistof is een mengsel van hexaan en aceton (50:50; v:v). De wasstap, waarbij aceton wordt verwijderd, gebeurt door het ASE-extract (± 30 ml) over te brengen in een scheidtrechter met een 200 ml bidest-water. Er wordt gedurende een 10'' krachtig geschud en men laat de fasen ontmengen. De waterfase wordt afgelaten en de wasstap wordt nog 2x herhaald. Hexaanfase wordt onder een zachte stikstofstroom ingedampt tot enkele ml. Opzuivering gebeurt vervolgens door een opzuiveringskolom aan te maken bestaande uit: 9 g aangezuurde silica + 1.5 g gedesactiveerde aluminiumoxide + 0.75 g Na_2SO_4 . De kolom wordt geconditioneerd met 20 ml hexaan. Extract wordt op kolom gebracht en er wordt ge-elueerd met 30 ml hexaan. Het extract van de kolomopzuivering wordt opgeconcentreerd naar 1 ml. Voor de uiteindelijke analyse wordt $1 \mu\text{l}$ extract geïnjecteerd op GC/MS (gas chromatografie/massa spectrometer) met Splitless- injectie en apolaire kolom (HP5MS (30 m x 0.2 mm x 0.25 μm)). Methodekarakteristieken van HCB en HCBd analyse zijn achtereenvolgens een LOD van $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, een rapporteringsgrens van $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ en een meetonzekerheid van 35%.

¹De rapporteringsgrens wordt gedefinieerd als de waarde beneden welke een component als niet kwantificeerbaar wordt gerapporteerd. Hierbij wordt de massa van het staal mee in rekening genomen.

²De meetonzekerheid wordt gedefinieerd als een in verband met het resultaat staande parameter die de spreiding van waarden, die redelijkerwijs aan de meetgrootte kunnen worden toegekend, karakteriseert. Deze wordt bepaald via de procedure CMA/6/B (VITO, 2012).

2.5 Statistische verwerking

Significante verschillen in pollutieaccumulatie per meetplaats of per tijdstip werden nagegaan via respectievelijk ANOVA (analysis of variance) (vergelijking tussen meerdere gemiddelden) of een t-test (vergelijking tussen twee gemiddelden). Aangezien beiden testen parametrische testen zijn die uitgaan van een normale verdeling van de data en ook van gelijkheid van de variantie ervan, dienen deze twee voorwaarden eerst te worden nagegaan. Normaliteit van de data werd getest via de Shapiro-Wilk test en gelijkheid van variantie werd nagegaan via de Levene test. Indien niet aan beide voorwaarden werd voldaan werden de niet-parametrische varianten gebruikt (respectievelijk Kruskal-Wallis en Mann-Whitney U test). Om na te gaan tussen welke meetpunten juist significante verschillen werden gevonden werd een Tukey post-hoc test gebruikt. Significante verschillen in pollutieaccumulatie worden telkens visueel voorgesteld door gebruik te maken van lettercodes (a, b, ab, c...). Resultaten met ongelijke lettercodes (vb. a en b) verschillen significant van elkaar; resultaten met dezelfde lettercode (vb. a en a) zijn niet significant verschillend. Een lettercode "ab" duidt aan dat het betreffende resultaat niet significant verschilt van resultaten met als respectievelijke code "a" of "b", maar wel significant verschilt van resultaten met code "c". Verschillen werden geacht significant te zijn indien $p < 0.05$. Verbanden tussen pollutieaccumulatie en massa van de karpers werd nagegaan via een Pearson correlatietest en regressieanalyse waarbij werd uitgegaan van een lineair verband en normaal verdeelde data. Statistische analyses werden uitgevoerd in SigmaPlot versie 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

3. Resultaten

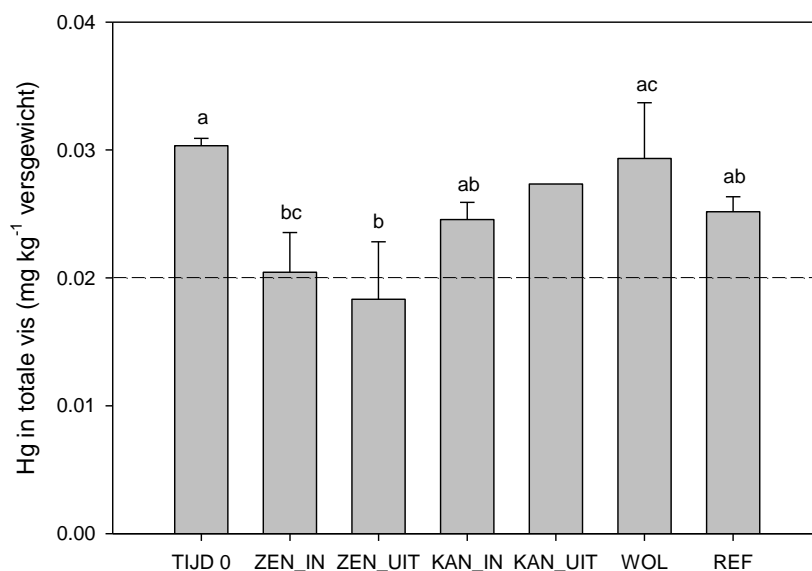
3.1 Hexachloorbenzeen en hexachloorbutadieen

Concentraties van HCB en HCBD in gekooide karper lagen op alle meetpunten en voor alle tijdstippen onder de rapportagegrens van $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dit zowel voor de stalen van hele vis als voor spierweefsel. Op alle meetplaatsen wordt dus ruim de biota-MKN gehaald voor zowel HCB ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) en HCBD ($55 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.2 Kwik

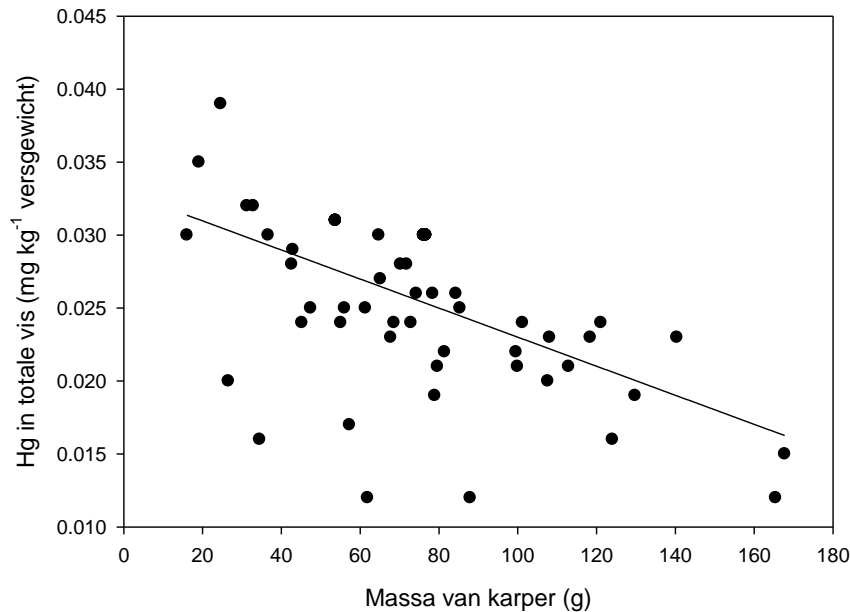
3.2.1 Toetsing MKN

Gemiddelde Hg-concentraties in volledige karper, uitgedrukt per versgewicht en gerapporteerd per meetpunt en per tijdstip, variëren van 0.018 mg kg^{-1} (ZEN_UIT) tot 0.030 mg kg^{-1} (TIJD 0) (Figuur 1). Op alle meetplaatsen wordt de biota-MKN voor Hg (0.020 mg kg^{-1}) overschreden. Opvallend is dat zelfs de niet-blootgestelde karpers (TIJD 0) en de karpers blootgesteld op de referentielocatie (REF) reeds Hg-concentraties bevatten die hoger liggen dan de MKN.



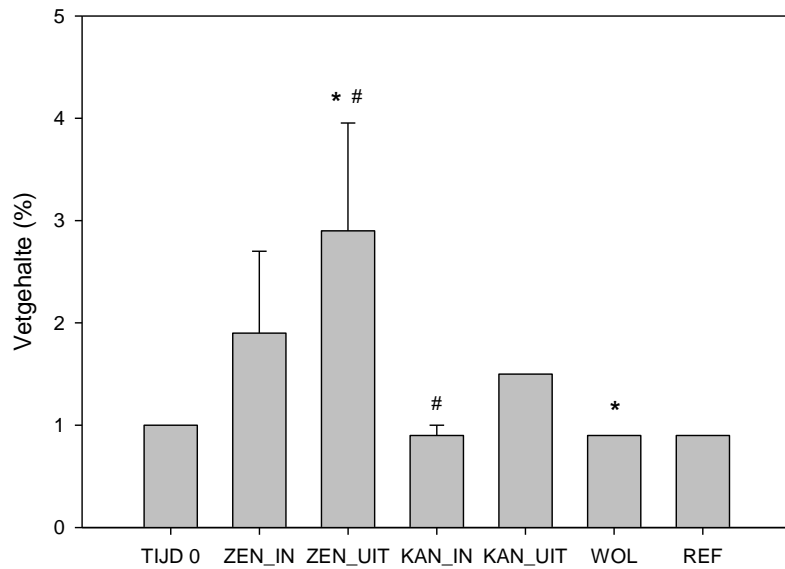
Figuur 1: Hg-concentratie in volledige karper op alle meetplaatsen. Telkens wordt de gemiddelde concentratie en standaard deviatie weergegeven per meetplaats en over alle tijdstippen ($n = 3$, behalve voor KAN_UIT en REF waarbij respectievelijk $n = 1$ en $n = 2$). De onderbroken lijn geeft de biota-MKN weer voor Hg (0.020 mg kg^{-1} versgewicht). Verschillende letters geven significante verschillen per meetpunt aan ($p < 0.05$).

3.2.2 Relatie met gewicht en vetgehalte



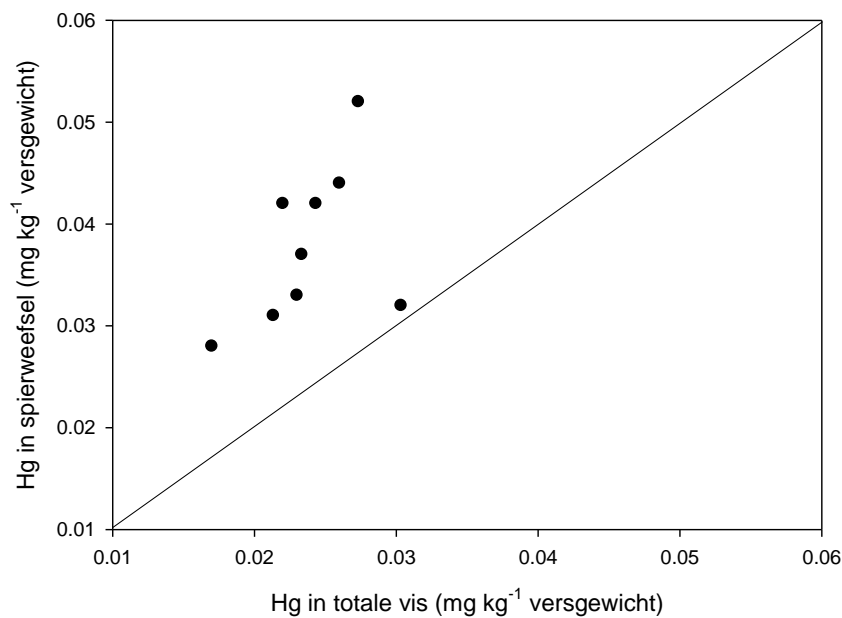
Figuur 2: Hg-concentratie in volledige karper in functie van de massa. Regressievergelijking: $y = -0.0001x + 0.033$; $R^2 = 0.30$; $R = -0.55$; $p < 0.0001$; $n = 63$.

Figuur 2 geeft een negatieve relatie aan tussen de geaccumuleerde Hg-concentratie en het gewicht van de karper. Hieruit volgt dat op meetplaatsen met een grotere voedselbeschikbaarheid en dus een grotere gewichtstoename, steeds lagere Hg-gehalten in karpers werden gemeten. Er is dus mogelijk een verdunningseffect op plaatsen met een hogere voedselbeschikbaarheid, dat de interpretatie van Hg-concentraties uitgedrukt per versgewicht bemoeilijkt. De variatie in voedselbeschikbaarheid tussen de meetplaatsen worden geïllustreerd door de verschillen in vetgehalte die geobserveerd kunnen worden tussen de karpers van de verschillende sites (Figuur 3). Vetgehalte was significant verschillend tussen de meetplaatsen ($F = 4.044$; $p = 0.030$). Hoewel een post-hoc test niet mogelijk was aangezien $n = 1$ voor sommige meetpunten, kon d.m.v. een t-test een significant verschil worden aangetoond in vetgehalte tussen vissen op meetpunt ZEN_UIT en WOL ($t = 3.288$; $p = 0.030$).



Figuur 3: Vetgehalte in volledige karper op alle meetplaatsen. Telkens wordt het gemiddelde vetgehalte en standaarddeviatie weergegeven per meetplaats en over alle tijdstippen ($n = 3$, behalve voor TIJD 0, KAN_UIT en REF waarbij telkens $n = 1$). De standaarddeviatie van meetpunt WOL is te klein om te worden weergegeven. *, #: Geeft significant verschil weer tussen vetgehalten op beide meetplaatsen ($p < 0.05$).

3.2.3 Vergelijking spierweefsel en totale vis

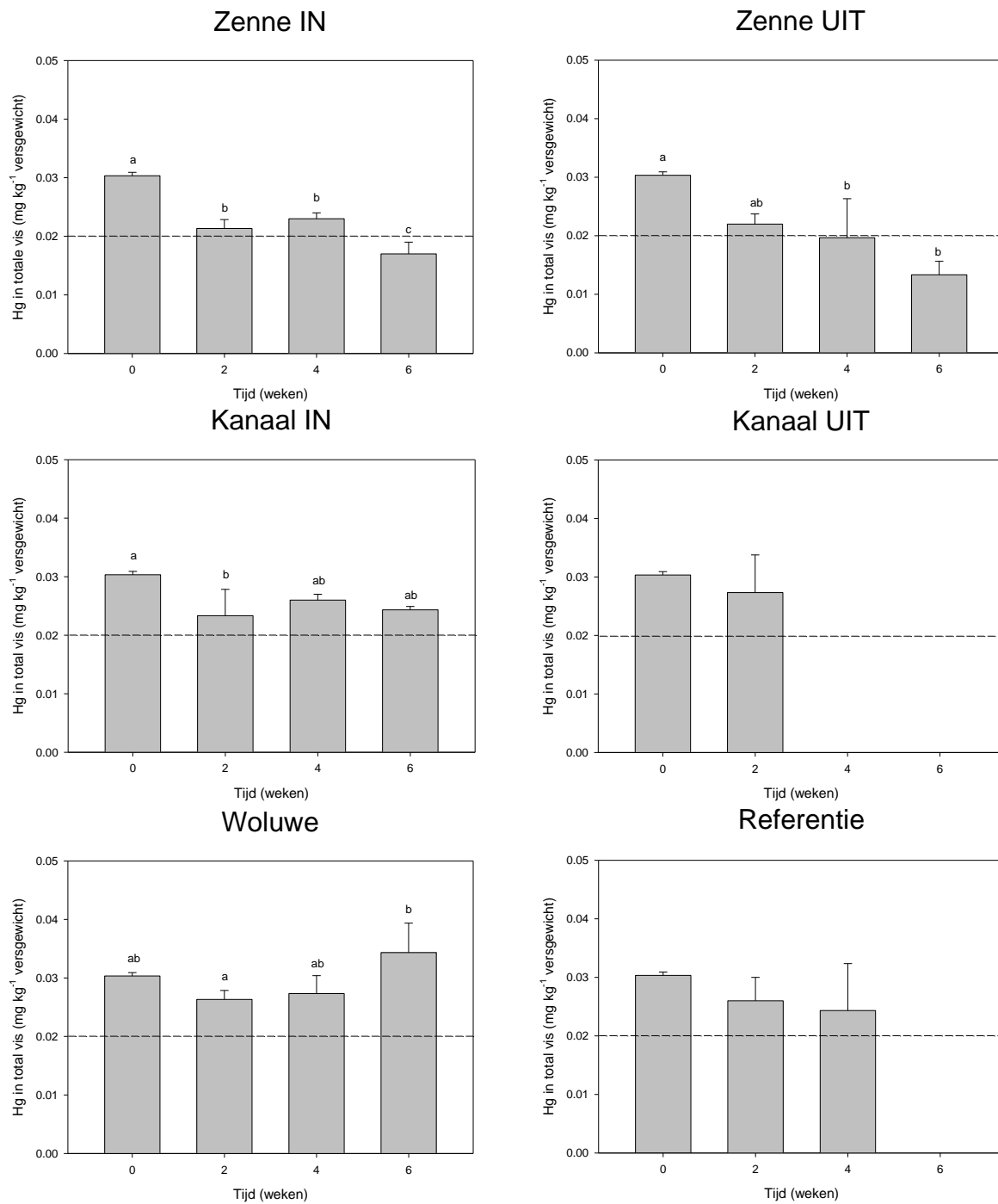


Figuur 4: Vergelijking van Hg-concentratie in spierweefsel met deze in de volledige vis ($n = 9$). De volle lijn geeft een perfecte 1:1 relatie weer.

Een significant verschil in gemiddelde Hg-concentratie tussen spierweefsel en de volledige vis werd aangetoond door middel van een niet-parametrische Mann-Whitney Rank Sum test ($T = 125$; $p < 0.001$). Hierbij lagen Hg-concentraties in spierweefsel steeds hoger dan deze in de volledige vis (Figuur 4). Concentraties in spierweefsel waren niet significant gecorreleerd met deze in de totale vis ($R = 0.460$; $p = 0.213$; $n = 9$).

3.2.4 Tijdsafhankelijke accumulatie

Op beide meetpunten van de Zenne werd een tijdsafhankelijke daling vastgesteld van de geaccumuleerde Hg-concentratie (Figuur 5). Voor ZEN_IN werden significante verschillen in Hg-concentratie gevonden tussen de vissen op tijdstip 0 en na respectievelijk 2 en 4 weken ($p < 0.05$). Na 6 weken blootstelling was de Hg-concentratie significant gedaald ten opzichte van alle andere tijdstippen en was de Hg-concentratie gezakt tot onder de biota-MKN. Ook voor ZEN_UIT daalde de Hg-concentratie in totale vis na 6 weken tot onder de norm en was deze significant verschillend van tijdstip 0 (een significant verschil in Hg-concentratie met tijdstip 0 werd eveneens al na 4 weken gevonden) ($p < 0.05$). Wat betreft KAN_IN werd er enkel een significant verschil in Hg-concentratie gevonden tussen tijdstip 0 en 2 weken blootstelling ($p < 0.05$). Voor de Woluwe werd een significant hogere Hg-concentratie gevonden na 6 weken in vergelijking met de gehalten na 2 weken blootstelling. Voor KAN_UIT en de Referentie site werden geen significante verschillen in Hg-concentratie gevonden met de tijd ($p > 0.05$).



Figuur 5: Hg-concentratie in volledige karper in functie van de blootstellingstijd op alle meetplaatsen. Telkens wordt de gemiddelde concentratie en standaard deviatie weergegeven per tijdstip (n = 3, voor uitzonderingen zie Tabel 3). Op meetpunt REF en KAN_UIT konden geen vissen geanalyseerd worden na respectievelijk 6 weken (REF) en 4 en 6 weken (KAN_UIT) (zie Tabel 3). De onderbroken lijn geeft de biota-MKN weer voor Hg (0.020 mg kg⁻¹ versgewicht). Verschillende letters geven significante verschillen per meetpunt aan (p < 0.05).

4. Discussie

4.1 Bioaccumulatiemonitoring met karper

De Europese dochterrichtlijn 2008/105/EC spoort de lidstaten aan om bioaccumulatiemonitoring uit te voeren voor lipofiele stoffen, die doorgaans moeilijk meetbaar zijn in oppervlaktewater. Voor drie prioritaire stoffen werden reeds officiële biota-MKN opgesteld; Hg, HCB en HCBd. Concentraties van deze pollutanten dienen dus gemeten te worden in biota en het verloop ervan dient te worden opgevolgd in de tijd. Vanaf eind 2015/begin 2016 wordt biotamonitoring tevens verplicht voor de volgende pollutanten: Gebromeerde difenylethers (PBDE), de polyaromatische koolwaterstoffen (PAK) Fluorantheen en Benzo(a)pyreen, Dicofol, Perfluorooctaansulfonzuur en zijn derivaten (PFOS), Dioxinen en dioxineachtige verbindingen, Hexabroom-cyclododecaan (HBCDD), Heptachloor en heptachloor-epoxide (omzetting nieuwe dochterrichtlijn 2013/39/EG) (EC, 2013).

De huidige studie gebruikte, mede door de afwezigheid van residente vissoorten in de Zenne, gekooide karpers voor bioaccumulatiemonitoring van de drie prioritaire stoffen en de toetsing van geaccumuleerde pollutantconcentraties met de Europese biota-MKN. Het huidige pilootproject was een eerste aanzet voor bioaccumulatiemonitoring in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Actieve biomonitoring (ABM) vormt een geschikte manier voor een gestandaardiseerde en tijdafhankelijke opvolging van geaccumuleerde pollutantconcentraties op waterlopen waar weinig vis of andere geschikte residente organismen aanwezig zijn, en/of voor het vergelijken van weefselconcentraties in dezelfde soort tussen verschillende waterlopen. Een belangrijk voordeel van ABM is dat telkens met dezelfde soort met dezelfde genetische en fysiologische achtergrond wordt gewerkt (Bervoets et al., 2003). In de huidige studie werd gekozen om te werken met karper (*Cyprinus carpio*). Deze inheemse vissoort is zeer tolerant voor vervuiling en omgevingsstress, is een goede accumulator van diverse micropolluenten en is gemakkelijk te manipuleren. Actieve biomonitoring met karper werd reeds gebruikt in zowel Vlaamse (Reynders et al. 2008; Bervoets et al. 2009) en Nederlandse rivieren (Verweij et al. 2004). De studies van Reynders et al. (2008) en Bervoets et al. (2009) toonden aan dat bioaccumulatie van Cd en Zn in het weefsel van karper een goede weerspiegeling gaf van de metaalvervuiling in het Netebekken (Grote Nete, Molse Nete en Scheppelijke Nete) en dat concentraties in gekooide karper overeenstemden met deze in residente blankvoorn. Verweij et al. (2004) toonden aan dat de

bioaccumulatie van PAKs in gekooide karper sterke correlaties vertoonden met gehalten gemeten in passieve samplers (Semi-permeable membrane device of SPMD). Hoewel uit voorgaande resultaten blijkt dat karper geschikt is voor bioaccumulatiemonitoring van micropolluenten in het aquatische milieu, wordt deze soort tot op heden in geen enkele Europese lidstaat gebruikt voor het uitvoeren van officiële monitoringsprogramma's met betrekking tot pollutentbioaccumulatie (De Jonge et al., 2012a).

Hoewel globaal gezien een goede overleving van de organismen werd vastgesteld na zes weken blootstelling, werden ook enkele belangrijke nadelen van ABM aangetoond. Zo werd een beperkt aantal kooien teruggevonden na twee weken op meetpunt KAN_UIT, wellicht door het aanmeren van schepen aan de kade. Daarnaast werd een sterk verhoogde mortaliteit van de vissen geobserveerd op de meetpunten ZEN_UIT en REF, dit door respectievelijk vermoedelijk overstorten of betoniet verliezen, en sterke begroeiing met waterplanten. Dergelijke tijdsgebonden gebeurtenissen hebben een sterke invloed op de overleving van de blootgestelde organismen en illustreren een belangrijk nadeel van ABM: nl. wanneer een kooi verloren gaat kan er ook geen meting plaatsvinden. Verderop worden enkele aanbevelingen gegeven om de overleving van blootgestelde organismen te garanderen/verhogen (zie deel 5: conclusies en aanbevelingen). Een bijkomend nadeel van ABM is ongetwijfeld de (veel) kortere blootstellingsduur en site-specifieke verschillen in voedselbeschikbaarheid, die de interpretatie van geaccumuleerde pollutent concentraties kunnen bemoeilijken. Hoewel deze variabelen niet gestandaardiseerd worden zal het meten in residente individuen (passieve biomonitoring) toch een geïntegreerd beeld geven van de pollutent-biobeschikbaarheid, waarbij alle mogelijke site-specifieke factoren die de accumulatie van een pollutent kunnen beïnvloeden (voedselbeschikbaarheid, waterchemie, ...) worden vervat en waarbij de pollutentconcentratie in het organisme in evenwicht is met de gehalten in de omgeving. Dit in tegenstelling tot ABM, waarbij men soms niet zeker weet of de gemeten bioaccumulatie na x aantal weken blootstelling representatief is voor de concentraties in de omgeving. Ten slotte vormt ABM een erg arbeidsintensieve methode voor biomonitoring in vergelijking met het bemonsteren van residente organismen.

4.2 Vergelijking pollutieaccumulatie met biota-MKN

4.2.1 Hexachloorbenzeen en hexachloorbutadieen

Gemeten HCB- en HCBD-concentraties in karper lagen op alle meetplaatsen en tijdstippen onder de rapportagegrens van $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ en liggen dus ruim onder de Europese biota-MKN (HCB: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; HCBD: $55 \mu\text{g kg}^{-1}$) (EC, 2008). In de recente studie van Jürgens et al. (2013), waarin de drie prioritaire stoffen Hg, HCB en HCBD werden gemeten in residentie blankvoorn (*Rutilus rutilus*), paling (*Anguilla anguilla*) en alver (*Alburnus alburnus*) uit vier Engelse rivieren, werden eveneens geen kwantificeerbare concentraties van HCBD gemeten ($<0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$). Daarentegen werden in Jürgens et al. (2013) wel HCB-concentraties gedetecteerd in totaal visweefsel variërend tussen 0.21 en $2.49 \mu\text{g kg}^{-1}$ versgewicht (tussen 7 en 26.9 ng g^{-1} op vetbasis). De studies van Maes et al. (2005, 2008) rapporteren HCB concentraties van gemiddeld $5.89 \mu\text{g kg}^{-1}$ (minimum $0.0026 \mu\text{g kg}^{-1}$ en maximum $192 \mu\text{g kg}^{-1}$) gemeten in spierweefsel van paling, bemonsterd uit diverse Vlaamse waterlopen in de periode tussen 1994 en 2005. Maes et al. (2008) rapporteren ook HCB-gehalten in paling uit verschillende Europese lidstaten, gaande van $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Orbetello lagoon, Italië) tot $59.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Omgeving van Amsterdam, Nederland) (Van Der Oost et al., 1996; Tulonen & Vuorinen, 1996; Bressa et al., 1997; Roche et al., 2000; Corsi et al. 2005). Bovenvermelde studies tonen aan dat de door karper geaccumuleerde HCB-concentraties in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest erg laag zijn in vergelijking met gemeten HCB bioaccumulatie in residentie vissen uit zowel Vlaamse als Europese waterlopen. Hexachloorbenzeen is een fungicide en een molecule gebruikt voor het maken van andere pesticiden, voornamelijk voor landbouwtoepassingen (bv. bescherming van zaden). Hierdoor is het logisch dat HCB concentraties eerder laag zijn in een sterk verstedelijkte omgeving zoals die van het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Daarbij werd de HCB productie en het gebruik ervan vanaf 2004 verboden door het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (Stockholm conventie). Hexachloorbutadieen is een oplosmiddel, gebruikt in de industrie voor het maken van andere gechloreerde verbindingen. In het verleden werd HCBD ook gebruikt als biocide maar omwille van de sterke toxische eigenschappen werd het gebruikt ervan grotendeels stopgezet.

4.2.2 Kwik

Op basis van de gemiddelde concentratie over de verschillende tijdstippen, wordt op alle meetplaatsen de biota-MKN (0.020 mg kg^{-1}) (EC, 2008) voor Hg overschreden. Hierbij dient echter te worden opgemerkt dat gemiddeld gezien de hoogste Hg-concentratie werd gemeten in karpers op tijdstip 0, die afkomstig zijn uit een onvervulde kweek en die nog niet werden blootgesteld in het milieu. Door deze verhoogde Hg-concentraties, reeds aanwezig in de karpers op het moment dat deze werden blootgesteld, is het moeilijk te zeggen of de geobserveerde normoverschrijdingen al dan niet het gevolg zijn van Hg-opname en accumulatie vanuit het milieu. Desondanks werd er op meetpunt Zenne_UIT, dat een grote voedselbeschikbaarheid had met de meest vette vissen, amper een toename in Hg gevonden. Nochtans is voeding de belangrijkste blootstellingsroute van het lipofiele methylkwik (CH_3Hg) voor de meeste vissen (Squadron et al., 2013). Deze resultaten wijzen dus op een beperkte biobeschikbaarheid van Hg in het aquatische milieu van het BHG. De verhoogde achtergrondconcentraties in de niet-blootgestelde vissen is zorgwekkend, des te meer omdat de Hg-concentraties de biota-MKN overschrijden. Een mogelijke verklaring voor deze verhoogde achtergrondconcentraties is contaminatie door voeding in de oorspronkelijke kweek. Echter, Hg-concentraties van vissen afkomstig van een erkende kweek uit Wageningen (Nederland) liggen zelfs hoger (0.059 mg kg^{-1}) (eigen meting) dan de achtergrondconcentraties in karpers die werden gebruikt in de huidige studie (gemiddeld 0.030 mg kg^{-1}). Deze resultaten geven aan dat de huidige biota-MKN voor kwik (0.020 mg kg^{-1}) erg laag ligt en wellicht onhaalbaar is voor de meeste biota.

Hg-concentraties gemeten in de studie van Jürgens et al. (2013) in totaal visweefsel van residentie blankvoorn, paling en alver varieerden van 0.017 tot 0.049 mg kg^{-1} . Hierbij werd de biota-MKN voor Hg in 79% van de metingen overschreden. Maes et al. (2005, 2008) rapporteren Hg-concentraties in spierweefsel van Vlaamse paling van gemiddeld 0.117 mg kg^{-1} over een periode van 1994 tot 2005. Hierbij werden maximale concentraties van 1.19 mg kg^{-1} Hg gemeten. Gemiddelde Hg-concentraties in spierweefsel van paling uit verschillende Europese lidstaten variëren van 0.170 mg kg^{-1} (Rivier Gironde, Frankrijk) tot 0.962 mg kg^{-1} (Mersey estuarium, VK) (Collings et al., 1996; Linde et al., 2004; Durrieu et al., 2005). Hg-concentraties gemeten in spierweefsel van residentie zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) uit Portugal lagen steeds hoger dan 0.2 mg kg^{-1} en lagen maximaal tussen 0.4 en 0.6 mg kg^{-1} (Meiro et al., 2011). Bovenstaande

resultaten tonen aan dat de Hg-concentraties in volledige karper, gemeten in de huidige studie (gemiddeld tussen 0.018 en 0.030 mg kg⁻¹), erg laag liggen in vergelijking met gehalten gemeten in verschillende residente vissoorten uit Vlaamse en Europese waterlopen, hoewel ook in de huidige studie op alle meetplaatsen normoverschrijdingen voor Hg werden vastgesteld. Uit een analyse van de meetresultaten van het voormalige Vlaamse palingpolluentenmeetnet van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) blijkt dat over een periode van 1994 tot 2009 in 97.4% van de metingen in paling (gebaseerd op 3546 individuen) de biota-MKN voor Hg werd overschreden (Van Ael et al. submitted). Wanneer dezelfde analyse werd gemaakt voor vissen anders dan paling (zowel roofvissen zoals baars, snoekbaars en snoek; invertivore vissen zoals zonnebaars en omnivore vissen zoals blankvoorn, zeelt en karper) bleek, uit een steekproef van 483 vissen, slechts één individu lagere Hg-concentraties te bevatten dan de MKN (0.2% van de gevallen). Deze resultaten geven aan dat de huidige Europese biota-MKN voor Hg mogelijk onhaalbaar blijkt voor de meeste Vlaamse waterlopen en dus mogelijk onrealistisch laag ligt.

4.3 Vergelijking accumulatie volledige vis vs. spier

De huidige studie toont aan dat Hg-concentraties in spierweefsel van karper significant hoger lagen dan de concentratie gemeten in de totale vis. Daarbij werd geen significante correlatie gevonden tussen concentraties in spier en totale vis. De studie van Has-Schön et al (2006) vond ook de hoogste Hg gehalten terug in spierweefsel van karper, in vergelijking met andere weefsels zoals kieuw, lever, nier en de gonaden. Dit patroon werd eveneens teruggevonden voor andere vissoorten zoals paling, zeelt (Has-Schön et al., 2006), kopvoorn (Houserova et al, 2006) en de Europese meerval (Squadrone et al., 2013). Wellicht is de doorgaans hogere Hg opstapeling in spierweefsel te wijten aan de grotere hoeveelheid vet per eenheid massa in dit weefsel in vergelijking met de totale vis. In het (aquatische) milieu wordt elementaire Hg na opname in het lichaam namelijk getransformeerd tot het erg lipofiele en toxische methylkwik (CH₃Hg) of rechtstreeks onder deze vorm geaccumuleerd via secundaire vergiftiging (Squadrone et al., 2013). Hierdoor wordt Hg-accumulatie in vette weefsels bevorderd, in tegenstelling tot andere cationische metalen (o.a. Cd, Zn) die meestal weinig in spierweefsel accumuleren (Reynders et al., 2008). De keuze om in de huidige studie pollutieanalyses hoofdzakelijk uit te voeren op totaal visweefsel valt te verantwoorden door het feit dat de biota-MKN, waaraan de

weefselconcentraties dienen te worden getoetst, werden opgesteld voor risico's van secundaire doorvergiftiging voor top-predatoren. Hierdoor is de pollutantconcentratie in het hele lichaam van het prooidier van belang en niet enkel het spierweefsel, dat doorgaans geanalyseerd wordt in het kader van bioaccumulatiemonitoring (De Jonge et al., 2012a).

4.4 Tijdsafhankelijke accumulatie

Op beide meetplaatsen op de Zenne werd een tijdsafhankelijk daling in Hg-concentraties in karper waargenomen, terwijl op de andere meetplaatsen weinig of geen significante verschillen in Hg-concentratie tussen de verschillende tijdstippen werden geobserveerd. Een dergelijke daling in concentratie is tegengesteld aan wat men zou verwachten en is waarschijnlijk te wijten aan pollutantverdunding door groei. Er werden namelijk grote verschillen in voedselaanbod vastgesteld tussen de meetplaatsen, zoals was af te leiden uit de verschillen in vetgehalte per meetplaats, en werd er een negatief verband gevonden tussen Hg-accumulatie en massa van de karper. Wellicht waren de Hg gehalten in de Zenne te laag om verdunding door groei te compenseren. Op basis van onze resultaten en mede door de lage Hg gehalten in het milieu is het praktisch onmogelijk om een geschikte blootstellingstijd af te leiden voor actieve biomonitoring met karper in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Mogelijk was de blootstellingduur van 6 weken in de huidige studie te kort voor accumulatie van het lipofiele methykwik en vormt dit een verklaring voor de eerder lage biotaconcentraties in vergelijking met residente vissoorten uit de literatuur (zie 4.2). De studie van Peterson et al. (1996) vergeleek Hg-bioaccumulatie in gekooide *Rhinichthys atratulus*, een kleine karpersoort, met residente individuen in Amerikaanse wateren. Uit deze studie bleek dat na 12 weken blootstelling Hg-concentraties in de gekooide vissen steeds een factor 2 lager waren dan de concentraties in de residente individuen. Het site-specifieke patroon van Hg-bioaccumulatie was echter hetzelfde tussen gekooide en residente vissen (Peterson et al., 1996). De studie van Reynders et al. (2008) vond vergelijkbare Cd en Zn concentraties in weefsel van gekooide karper en residente blankvoorn in het Netebekken. De EC adviseert een blootstellingsduur van 4 weken voor biomonitoring met behulp van gekooide organismen (EC, 2010). Op basis van de huidige studie en literatuur lijkt een blootstellingsperiode van 4-6 weken mogelijk te kort voor Hg-bioaccumulatie in karper, en dit in het bijzonder voor waterlopen met beperkte omgevingsconcentraties en een groot voedselaanbod.

5. Conclusies en aanbevelingen

In de huidige studie werd voor een eerste maal bioaccumulatiemonitoring uitgevoerd in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Hiervoor werd ABM toegepast door gebruik te maken van karper. Ondanks een goede overleving van de gekooide organismen na zes weken blootstelling op de meeste meetplaatsen, werd op bepaalde sites een verhoogde mortaliteit vastgesteld en gingen sommige kooien stuk of verloren, ondanks het feit dat alle bevoegde beheerinstanties op de hoogte werden gesteld van het pilootproject (BIM en haven van Brussel). Hoewel het onmogelijk is om een maximale overleving van de blootgestelde organismen te garanderen, kunnen toch enkele aanbevelingen worden gemaakt met betrekking tot toekomstige bioaccumulatiemonitoring:

- Bij voorkeur worden kooien en kabels gebruikt die bestaan uit sterkere materialen (bv. metaal of inox).
- Voor bevaarbare waterlopen kan met de bevoegde waterbeheerder best een vast meetpunt worden afgesproken, dat wordt afgeschermd van alle mogelijke activiteiten van scheepvaart.
- Voor natuurlijke, voedselrijke waterlopen met een grote diepte worden de kooien best in het midden van de rivier gehangen i.p.v. tegen de oever om het dichtslibben van de kooien ten gevolge van verhoogde sedimentatie te voorkomen.
- In meer voedselarme, ondiepe waterlopen worden de kooien best op de bodem van de rivier geplaatst om een goede voedselvoorziening van de gekooide vissen (vb. benthische macro-invertebraten en detritus) te verzekeren.
- Er wordt aanbevolen om telkens het vetgehalte van het organisme te analyseren, aangezien voedselbeschikbaarheid en verdunning door groei de interpretatie van bioaccumulatiegegevens kan bemoeilijken.

Voor de stoffen HCB en HCBd lagen de concentraties steeds onder de rapportagegrens en dus onder de biota-MKN. Op basis van de huidige studie kunnen we dus stellen dat er geen probleem is met deze stoffen op de huidige selectie van meetplaatsen in het Brussels Hoofdstedelijk Gewest.

Wat betreft de bioaccumulatie van Hg werden op alle meetplaatsen normoverschrijdingen vastgesteld, inclusief de organismen op tijdstip 0. Door de verhoogde achtergrondconcentraties en mede door de grote verschillen in voedselaanbod en vetgehalte van de vissen per meetplaats wordt de interpretatie van de Hg resultaten bemoeilijkt. Aangezien er op het meetpunt Zenne_UIT voldoende voeding aanwezig was maar geen toename in Hg werd geobserveerd wijst dit echter op een beperkte biobeschikbaarheid van deze pollutant in het milieu. In vergelijking met Hg-bioaccumulatie in vissen uit diverse Vlaamse en Europese waterlopen liggen de Hg-concentraties in karpers, blootgesteld in waterlopen uit het Brussels Hoofdstedelijk Gewest, echter erg laag. Mogelijk is dit te wijten aan een te korte blootstellingsduur van 6 weken. Literatuuronderzoek van Hg-accumulatie in vis toont aan dat de huidige Europese biota-MKN voor Hg erg laag ligt en op dit moment onhaalbaar blijkt voor Vlaanderen en mogelijk ook voor het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Daarnaast toonde deze studie aan dat Hg-concentraties in spierweefsel hoger liggen dan deze gemeten in totale vis, hoewel het meten in totaal weefsel meer relevant is voor toetsing aan biota-MKN die zijn opgesteld voor bescherming tegen secundaire vergiftiging.

Actieve biomonitoring vormt een mogelijk alternatief voor bioaccumulatiemonitoring op waterlopen waar weinig of geen residente organismen voorhanden zijn. Hoewel het een tijdgeïntegreerde en gestandaardiseerde methode is, kunnen een te korte blootstellingsduur en site-specifieke verschillen in voedselbeschikbaarheid de interpretatie van de resultaten bemoeilijken.

6. Referentielijst

Bervoets L., Smolders R., Voets J. & Blust R., 2003. Active biomonitoring (ABM), using aquatic invertebrates in *Biological evaluation and monitoring of the quality of surface waters*, Symoens, J.J. [edit.] - KBIN, Brussels, p. 71-76.

Bervoets L., Van Campenhout K., Reynders H., Knapen D., Covaci A. & Blust R., 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 720-728.

Bressa G., Sisti E. & Cima F., 1997. PCBs and organochlorinated pesticides in eel (*Anguilla anguilla* L.) from the Po Delta. *Marine Chemistry* **58**, 261-266.

Collings S.E., Johnson M.S. & Leah R.T., 1996. Metal contamination of angler-caught fish from the Mersey Estuary. *Marine Environmental Research* **41**, 281-297.

Corsi I., Mariottini M., Badesso A., Caruso T., Borghesi N., Bonacci S., Iacocca A. & Focardi S., 2005. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia* **550**, 237-249.

De Jonge M., Dardenne F., Blust R. & Bervoets L., 2012a. Haalbaarheidsstudie biotanolmen voor gevaarlijke stoffen: Onderbouwing meetstrategie voor de toetsing van biotanolmen. Universiteit Antwerpen in opdracht van de Vlaamse Milieumaatschappij (VMM), Antwerpen, België.

De Jonge M., Belpaire C., Geeraerts C., De Cooman W., Blust R., Bervoets L., 2012b. Ecological impact assessment of sediment remediation in a metal-contaminated lowland river using translocated zebra mussels and resident macroinvertebrates. *Environmental Pollution* **171**, 99-108.

Durrieu G., Maury-Brachet R., Girardin M., Rochard E. & Boudou A., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* **28**, 581-591.

Europese Commissie (EC), 2000. Richtlijn 2000/60/EG van het Europees parlement en de raad van 23 oktober 2000 tot vaststelling van een kader voor communautaire maatregelen betreffende het waterbeleid. Publicatieblad van de Europese Unie Nr. L327: 1-72, 23.10.2000.

Europese Commissie (EC), 2008. Richtlijn 2008/105/EG van het Europees parlement en de raad van 16 december 2008 inzake milieukwaliteitsnormen op het gebied van het waterbeleid tot wijziging en vervolgens intrekking van de Richtlijnen 82/176/EEG, 83/513/EEG, 84/156/EEG, 84/491/EEG en 86/280/EEG van de Raad, en tot wijziging van Richtlijn 2000/60/EG. Publicatieblad van de Europese Unie Nr. L348/84, 24.12.2008.

European Commission (EC), 2010. Guidance document No. 25 on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive. Common implementation strategy for the Water Framework Directive Technical Report-2010-3991.

Europese Commissie (EC), 2013. Richtlijn 2013/39/EU van het Europees parlement en de raad van 12 augustus 2013 tot wijziging van Richtlijn 2000/60/EG en Richtlijn 2008/105/EG wat betreft prioritair stoffen op gebied van het waterbeleid. Publicatieblad van de Europese Unie Nr. L226/1, 24.8.2013.

Has-Schön E, Bogut I & Strelec I., 2006. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **50**, 545–551.

Houserova P., Kuban V., Spurny P. & Habarta P., 2006. Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of Moravian rivers. *Veterinarni Medicina* **51**, 101-110.

Jürgens M.D., Johnson A.C., Jones K.C., Hughes D. & Lawlor A.J., 2013. The presence of EU priority substances mercury, hexachlorobenzene, hexachlorobutadiene and PBDEs in wild fish from four English rivers. *Science of the Total Environment* **461-462**, 441-452.

Linde A.R., Sanchez-Galan S. & Garcia-Vazquez E., 2004. Heavy metal contamination of European eel (*Anguilla anguilla*) and brown trout (*Salmo trutta*) caught in wild ecosystems in Spain. *Journal of Food Protection* **67**, 2332-2336.

Maes G.E., Raeymaekers J.A.M., Pampoulie C., Seynaeve A., Goemans G., Belpaire C. & Volckaert, F.A.M., 2005. The catadromous European eel *Anguilla Anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology* **73**, 99-114.

Maes J., Belpaire C. & Goemans G., 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* **153**, 223-237.

Mieiro C.L., Pacheco M., Pereira M.E. & Duarte A.C., 2011. Mercury organotropism in feral European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **61**, 135-143.

Peterson M.J., Southworth G.R. & Crumby W.D., 1996. Monitoring mercury in fish in a stream system receiving multiple industrial inputs. *Environmental Monitoring and Assessment* **40**, 91-105.

Reynders H., Bervoets L., Gelders M., De Coen W. & Blust R., 2008. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment* **391**, 82-95.

Roche H., Buet A., Jonot O. & Ramade F., 2000. Organochlorine residues in European eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. *Aquatic Toxicology* **48**, 443-459.

Schoenaers S., 2013 Ontwikkeling van moleculaire biomerkers in ecologisch relevante blootstellingsscenario's voor de karper. Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van Master in de Biologie. Universiteit Antwerpen, Antwerpen.

Squadrone S., Prearo M., Brizio P., Gavinelli S., Pellegrino M., Scanzio T., Guarise S., Benedetto A. & Abete M.C., 2013. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian rivers. *Chemosphere* **90**, 358-365.

Tulonen J. & Vuorinen P.J., 1996. Concentrations of PCBs and other organochlorine compounds in eels (*Anguilla anguilla*, L) of the anajavesi watercourse in southern Finland, 1990-1993. *Science of the Total Environment* **187**, 11-18.

Van Ael E., Belpaire C., Breine J., Geeraerts C., Van Thuyne G., Eulaers I., Blust R. & Bervoets L., 2013. Are persistent organic pollutants and metals in eel muscle predictive for the ecological water quality? *Submitted to Environmental Pollution*.

Van Der Oost R., Opperhuizen A., Satumalay K., Heida H. & Vermeulen N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). 1. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology* **35**, 21-46.

Vandelannoote A., Yseboodt R., Bruylants B., Verheyen R.F., Coeck J., Maes J., Belpaire C., Van Thuyne G., Denayer B., Beyens J., De Charleroy D. & Vandenabeele P., 1998. Atlas van de Vlaamse beek- en riviervissen. Water-Energik-vLario (WEL), Wijnegem, België.

VITO, 2012. Compendium voor monsterneming en analyse (CMA) - Meetonzekerheid CMA/6/B. Opgesteld door VITO in opdracht van OVAM. Ministerieel goedgekeurde versie van 18 januari 2012, België.