

**BODEMKWALITEITSPARAMETERS
STIMULERING GEBRUIK ECOTESTEN**

**G.P.M. van den Munckhof
M.F.X. Veul
C.A.M. van Gestel
J. Bloem**

Gegevens:

Bodemkwaliteitsparameters - Stimulering gebruik ecotesten / M.F.X. Veul, G.P.M. van den Munckhof, C.A.M. van Gestel en W. Bloem - Wageningen: Programmabureau Geïntegreerd Bodemonderzoek (Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek; deel 14) - 38 p., 4 bijl., E. summ. - ISBN 90-73270-28-6.

Trefwoorden: bodemonderzoek, bodemverontreiniging, ecotoxicologie.

Verantwoording:

Deze studie is het resultaat van onderzoek naar de bruikbaarheid van een aantal bestaande terrestrische bio-assays om in praktijkgevallen van bodemverontreiniging de actuele ecologische risico's te bepalen. In het onderzoek is gewerkt met grond, verontreinigd met zware metalen (Ni, Cr), afkomstig van een industrieterrein, grond verontreinigd met olie uit een landfarm, en baggerspecie uit sloten, verontreinigd met PAK. Op de monsters zijn bio-assays uitgevoerd met de regenworm *Eisenia fetida*, de springstaart *Folsomia candida*, micro-organismen en nematoden. De effecten van de verontreinigingen in verschillende concentraties zijn telkens vergeleken met een niet-verontreinigd referentiemonster.

Op grond van de studie wordt geconcludeerd, dat bio-assays zinvol zijn als tweedelijns beoordelingsinstrument voor de bepaling van de actuele risico's van bodemverontreiniging als aanvulling op het traditionele chemische toetsingskader. De studie besluit met aanbevelingen voor de verdere ontwikkeling van bio-assays voor toepassing op terrestrische gronden.

De studie is verricht in het kader van het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek door medewerkers van Witteveen+Bos, Raadgevende ingenieurs b.v. te Deventer, de Vrije Universiteit in Amsterdam en het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO) in Haren.

Het rapport is verkrijgbaar bij het Programmabureau Bodemonderzoek in Wageningen à f 40,--.

Projektuitvoering:

Witteveen+Bos Raadgevende Ingenieurs b.v., Van Twickelostraat 2, Postbus 233, 7400 AE Deventer: drs. M.F.X. Veul en ir. G.P.M. van den Munckhof, projectleiding;
Vrije Universiteit, Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie, De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam: dr.ir. C.A.M. van Gestel;
DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek, Oosterweg 29, Postbus 129, 9750 AC Haren: dr. J. Bloem.

Dankwoord:

De leiding van het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek is veel dank verschuldigd aan ir. R. van den Berg (RIVM) en prof.dr. P.C. de Ruiter (AB-DLO en RUU) voor de begeleiding van het projekt namens de Programmacommissie Geïntegreerd Bodemonderzoek.

© 1998. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek. Postbus 37, NL-6700 AA Wageningen; telefoon: 0317-484170; telefax: 0317-485051.

omslag : Ernst van Cleef
druk : Grafisch Service Centrum van Gils B.V., Wageningen

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING

SUMMARY

1. INLEIDING	1
2. FASE 1: SELECTIE BIO-ASSAYS EN KEUZE PROEFPROJECTEN	3
2.1. Selectie bio-assays	3
2.1.1. Bio-assays op basis van gestandaardiseerde toxiciteitstoetsen	3
2.1.2. Bio-assays met micro-organismen en nematoden	4
2.2. Keuze proefprojecten	6
2.2.1. Keuzecriteria	6
2.2.2. Gekozen proefprojecten	6
3. FASE 2: UITVOERING	7
3.1. Monstername proefprojecten	7
3.2. Chemische en fysische karakterisering monsters	8
3.3. Uitvoering bio-assays	8
3.3.1. Bio-assays met <i>Eisenia fetida</i> en <i>Folsomia candida</i>	8
3.3.2. Bio-assays met micro-organismen en nematoden	9
4. RESULTATEN	11
4.1. Bio-assays op met zware metalen verontreinigde grond	11
4.1.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters	11
4.1.2. Bio-assay met <i>Eisenia fetida</i>	12
4.1.3. Bio-assay met <i>Folsomia candida</i>	13
4.1.4. Micro-organismen	14
4.1.5. Nematoden	14
4.2. Bio-assays met olieverontreiniging	17
4.2.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters	17
4.2.2. Bio-assay met <i>Eisenia fetida</i>	17
4.2.3. Bio-assay met <i>Folsomia candida</i>	18
4.2.4. Micro-organismen	19
4.2.5. Nematoden	19
4.3. Bio-assays met baggerspecie	21
4.3.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters	21
4.3.2. Bio-assay met <i>Eisenia fetida</i>	22
4.3.3. Bio-assay met <i>Folsomia candida</i>	23
4.3.4. Micro-organismen	23
4.3.5. Nematoden	24
5. DISCUSSIE	25
5.1. Bio-assays op metaalverontreinigde grond	25
5.2. Bio-assays op met olie verontreinigde grond	26
5.3. Bio-assays op verontreinigde baggerspecie	27
5.4. Keuze van een referentie in bio-assays	28
5.5. De gebruikte toetsorganismen	29
5.6. Meerwaarde van bio-assays	30
5.7. Praktische toepasbaarheid van bio-assays	31
6. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	33
REFERENTIES	35

BIJLAGEN

	aantal bladzijden
I Overzicht gebruikte bio-assays bij de beoordeling van verontreinigde (water)bodems in Nederland en/of het buitenland	1
II Analyseresultaten grondmonsters (laboratoriumstaten)	10
III Data bio-assays <i>Eisenia fetida</i> en <i>Folsomia candida</i>	1

SAMENVATTING

In het kader van het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek is een onderzoek uitgevoerd naar de bruikbaarheid van een aantal bestaande terrestrische bio-assays om bij praktijkgevallen van bodemverontreiniging de actuele ecologische risico's te bepalen. Het onderzoek is uitgevoerd in twee fasen. In de eerste fase zijn de toe te passen bio-assays en de te bemonsteren verontreinigde locaties geselecteerd en in de tweede fase zijn de bio-assays uitgevoerd op grondmonsters afkomstig van deze locaties.

Er is gezocht naar representatieve en aansprekende praktijkgevallen van regionale of lokale bodemverontreiniging met een eenduidige verontreiniging (geen brede cocktail van stoffen) en zo constant mogelijke abiotische bodemparameters (o.a. humus, lutum, bodemtextuur en zuurgraad). Tevens is bij de selectie van de gevallen gelet op de aanwezigheid van een duidelijke concentratiegradiënt van de verontreiniging en op de beschikbaarheid van representatieve niet verontreinigde referentiemonsters. De volgende proefprojecten zijn gekozen:

- een proefproject met een met zware metalen (nikkel en chroom) verontreinigde grond (bedrijfsterrein galvanische industrie);
- een proefproject gericht op de monitoring van de voortgang van biologische reiniging van oliehoudende gronden in een overdekte grondreinigingsinstallatie;
- een proefproject gericht op het ecotoxicologisch beoordelen van de geschiktheid van met PAK verontreinigde baggerspecie (onderhoudsspecie) voor toepassing op het land.

Alle monsters voor de bio-assays zijn uitgebreid chemisch en fysisch (abiotisch) gekarakteriseerd. Tevens is gebruik gemaakt van het reeds door Witteveen+Bos verricht bodemonderzoek op de drie geselecteerde proeflocaties.

Op de monsters zijn de volgende bio-assays uitgevoerd:

- de overleving, groei en reproductie van de regenworm *Eisenia fetida* en de springstaart *Folsomia candida*. Deze testen zijn uitgevoerd op de Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van de Vrije Universiteit te Amsterdam. In deze testen is voor de zware metalen en PAK ook gekeken naar de interne concentraties van deze stoffen in de regenwormen en de springstaarten (accumulatie);
- meting van de biomassa en groeisnelheid van *bodemmicro-organismen* en de aantallen en populatiesamenstelling van *nematoden* in de grond. Deze metingen zijn uitgevoerd door de Afdeling Bodemecologie van het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheids-onderzoek in Haren.

In alle bio-assays met metaalverontreinigde grond werd een effect gevonden. Ook bleken de gehalten aan nikkel en chroom in de regenwormen zelf verhoogd te zijn na afloop van de bio-assays. Effecten bleken pas op te treden bij gehalten *boven de interventiewaarde*.

Op de met olie verontreinigde grond bleken de activiteit en de biomassa van bacteriën sterk verhoogd te zijn, met als gevolg dat ook het aantal nematoden was toegenomen. De soortensamenstelling (Maturity Index) van de nematoden was echter afwijkend van de referentie. Opvallend was dat ook de springstaarten en regenwormen een effect vertoonden op deze gronden, zelfs op de grond uit de reiniging die geen detecteerbare gehalten aan minerale olie meer bevatte.

Op de meest vervuilde baggerspecie (klasse 3) werd ook in alle bio-assays een effect gevonden. Ook zijn effecten bij de toetsorganismen waargenomen in het minst vervuilde baggermonster. Dit kon worden toegeschreven aan het hoge klei-gehalte van dit monster, dat ongunstig was voor zowel de regenwormen als de springstaarten.

Uit de resultaten van dit onderzoek kan worden geconcludeerd dat bio-assays een goede indicatie kunnen geven van het mogelijke actuele risico van bodemverontreiniging. Ook zijn bio-assays bruikbaar om onbekende stoffen met schadelijke werking aan te tonen. Bio-assays lijken vooral toepasbaar als tweedelijnsbeoordeling als aanvulling op het traditionele chemische toetsingskader. Alleen bio-assays geven een maat voor de biobeschikbaarheid van de verontreinigende stoffen in de bodem en daarmee een indicatie van de actuele ecologische risico's op een bepaalde locatie of in een bepaald gebied. Een goede interpretatie van de resultaten van bio-assays kan echter nog worden belemmerd doordat het vaak lastig is een geschikte referentie te vinden, waarin alle fysisch-chemische bodemeigenschappen overeenkomen met die in de verontreinigde gronden.

Aanbevolen wordt om een inventarisatie te maken van gegevens verkregen bij toepassing van bio-assays op verontreinigde bodems, in Nederland en het buitenland met als doel een databank en referentiekader te ontwikkelen. Dergelijke informatie kan bijdragen aan een beter inzicht in de praktische toepasbaarheid, reproduceerbaarheid en gevoeligheid van bio-assays. Mogelijk kan dergelijke informatie ook bijdragen aan een betere selectie en toetsingskader van testorganismen in relatie tot bodemtype en soort verontreiniging. Bovendien wordt aanbevolen om bij toekomstige studies de in dit onderzoek gehanteerde 'batterij' bio-assays uit te breiden met een toets met planten.

Tenslotte wordt aanbevolen om meer ervaring op te doen met bio-assays op uitvoeringsniveau, bijvoorbeeld in NOBIS-kader, om zo een beter inzicht te verkrijgen in de praktische toepasbaarheid van bio-assays bij de beoordeling van actuele ecologische risico's. Bio-assays geven een uitspraak over de 'bio-beschikbaarheid' van de verontreinigende stoffen in de bodem evenals over mengsel-toxiciteit en effecten van alle aanwezige stoffen. Bovendien beschikken bio-assays over meer zeggingskracht dan chemische analyses. Schade aan levende organismen kunnen meer een appèl doen op het voorstellingsvermogen van de betrokkenen dan de overschrijding van een getalsmatige grenswaarde. Dit kan van belang zijn bij het vinden van maatschappelijke consensus bij de risicobeoordeling van bodemverontreiniging.

SUMMARY

Within the frame-work of The Netherlands Integrated Soil Research Programme, a study was performed on the usefulness of a number of existing terrestrial bio-assays for the determination of the actual ecological risk of soil pollution. This study consisted of two phases: in phase 1 a selection of bio-assays and suitable contaminated test sites was carried out, while in phase 2 the bio-assays were applied to soil samples taken from the selected sites.

Test sites were selected on the basis of representativity for regional or local cases of soil pollution. They should be polluted with only a few compounds (no cocktail of pollutants) and as much as possible have a homogeneous composition with respect to abiotic soil characteristics (such as organic matter and clay content, texture and pH). In addition, sites were chosen to have a clear gradient of pollution and the availability of a representative non-polluted control. The following test sites were selected:

- a soil polluted with the heavy metals nickel and chromium;
- a pilot project aimed at the monitoring the progress of biological clean-up of oil-polluted soils in a groundsanitation facility.
- a pilot project aimed at determining the ecotoxicological risk of the application onto land of PAH contaminated sediment.

All samples have been analyzed for chemical and physico-chemical characteristics. Also the results of site investigations by Witteveen + Bos have been incorporated.

The following bio-assays were performed on the soil samples:

- survival, growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* and the collembolan *Folsomia candida*. These tests were carried out by the department of Ecology and Ecotoxicology of the Vrije Universiteit in Amsterdam. In the bio-assays, also internal metal and PAH concentrations have been measured in the earthworms and springtails (bioaccumulation);
- determination of the biomass and growth rate of soil microorganisms and the numbers and species composition of nematode communities in the test soils. These measurements were performed by the department of Soil Ecology of the DLO institute for Agrobiological and Soil Fertility Research in Haren.

In the metal polluted soils, all bio-assays showed a negative response. The levels of nickel and chromium in the earthworms were significantly increased at the end of the bio-assays. Effects did, however, occur at levels which were much higher than the so-called intervention values.

On the oil polluted soils, the activity and biomass of the micro-organisms was strongly increased, and, as a consequence, also the number of nematodes. The species composition of the nematode community (as measured by the Maturity Index), however, was different from that in the control soil. Most strikingly, the collembolans and earthworms still showed a negative response on the cleaned soil which contained no detectable oil residues.

The most polluted sediment (class 3) evoked a negative effect in all bio-assays. Also effects on most testorganisms were detected with the least polluted sediment, which might be attributed to the high clay content rendering this sample unfavourable for earthworms and springtails.

From the results obtained, it may be concluded that bio-assays may give a proper indication of the actual risk of soil pollution. Bio-assays seem to be most suitable for further assessments of soil pollution in addition to traditional chemical assessment. A proper interpretation of bioassay results may still be hampered by the difficulty to find a suitable reference soil, which has the same physico-chemical properties as the polluted soils under investigation.

It is recommended to make an inventory of bioassay results obtained in other studies in both the Netherlands and other countries with the aim to develop a database and provide references. Such information may contribute to a better insight into the practical applicability, reproducibility and sensitivity of bio-assays. In addition, such information may facilitate a better choice of reference soils. In addition, it is recommended to include a plant species in the 'battery' of bioassay species used in this study. Finally, more experience should be gained with bio-assays, and for that purpose the application of bio-assays, a.o. in NOBIS, is recommended to gain more insight into the practicalities of applying bio-assays in actual ecological risk assessments. Bio-assays provide an instrument to measure the bio-availability of toxic substances in the soil including effects of combi-toxicity and unknown substances. Moreover bio-assays can be more instrumental in society to visualize actual risks than chemical analyses.

1. INLEIDING

Risicobeoordeling bij gevallen van bodemverontreiniging gebeurt meestal op basis van chemische analyse op een selectie van mogelijk aanwezige xenobiotische stoffen. Hierbij worden concentraties gemeten en op basis daarvan worden uitspraken gedaan over de mate van verontreiniging. Dit is echter een bepaling van het potentiële risico. De resultaten zeggen niets over het werkelijke (actuele) risico van de verontreiniging. Bodemsamenstelling heeft een belangrijke invloed op de biologische beschikbaarheid van zowel essentiële als xenobiotische stoffen. Zo leidt een verlaging van de pH en de hoeveelheid organische stof en klei tot een verhoging van de biologische beschikbaarheid van verscheidene stoffen. Ten dele worden streef- en interventiewaarden hiervoor gecorrigeerd door omrekening naar organisch stofgehalte en lutumgehalte. Totaalgehalten geven daarom geen goed beeld van de biologisch beschikbare concentratie. Daarnaast zijn normen meestal gebaseerd op totaalgehalten van individuele stoffen. In de praktijk is echter vaak sprake van een vervuiling met een mengsel van stoffen, die elkaars werking kunnen verzwakken of versterken. Deze factoren worden niet meegenomen in een chemische bodemanalyse. Tevens meet men slechts een selectie van alle in het milieu aanwezige stoffen. Daardoor geeft een chemische analyse geen volledig inzicht in het actuele risico van een verontreiniging voor mens en milieu. Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het gebruikmaken van bio-assays.

Een bio-assay is een gestandaardiseerde test waarin organismen, meestal in het laboratorium, worden blootgesteld aan grond afkomstig van de locatie met bodemverontreiniging (of extracten daarvan). Aan de hand van parameters zoals overleving, groei en reproductie van de organismen wordt de toxiciteit van de verontreinigde grond bepaald. Bij een bio-assay worden in tegenstelling tot chemische analyses wel mengseltoxiciteit, biologische beschikbaarheid en het effect van alle verontreinigende stoffen in het milieu gemeten (Keddy et al., 1992; Van de Guchte et al, 1996). Bio-assays kunnen daarom zeer nuttig zijn bij het beoordelen van de actuele ecologische risico's op een vervuilde locatie. Ook zouden bio-assays gebruikt kunnen worden om het reinigingsproces van een verontreinigde bodem te volgen en de kwaliteit en toepassingsmogelijkheden van gereinigde grond te beoordelen (DECHEMA, 1995).

Er zijn reeds bio-assays in gebruik, met name voor het aquatische milieu. Deze bio-assays worden soms ook toegepast op poriewater of op grondextracten. Er zijn echter nog weinig bio-assays beschikbaar voor de bepaling van risico's voor het terrestrische milieu. Bovendien is hiermee nog weinig ervaring opgedaan. Vanwege de genoemde voordelen is door het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (PGB) een studie geïnitieerd naar de vraag of de reeds bestaande bio-assays voor het terrestrische milieu bruikbaar zijn voor de beoordeling van de ecotoxiciteit van verontreinigde grond.

Dit onderzoek (PGB project 602790), waarvan de resultaten in dit rapport worden beschreven, is uitgevoerd door de Afdeling Bodemecologie van het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek in Haren, de Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van de Vrije Universiteit en Witteveen+Bos Raadgevende ingenieurs b.v. Hoofddoel van het project is het vaststellen van de bruikbaarheid in de praktijk van een aantal reeds ontwikkelde terrestrische bio-assays. Het gaat om de beoordeling in de praktijk van actuele ecologische risico's van gevallen van bodemverontreiniging met behulp van bio-assays.

Het onderzoek moet uiteindelijk resulteren in:

- (een aantal) geschikte bio-assays;
- aanbevelingen met betrekking tot de introductie van de bio-assays.

Het onderzoek is uitgevoerd in twee fasen.

Fase 1 van het project bestond uit de volgende onderdelen:

- selectie van de in het project toe te passen bio-assays;
- identificatie van verontreinigde locaties (projecten), waarbij de bio-assays een duidelijke toegevoegde waarde kunnen hebben en vervolgens een keuze van de meest geschikte proefprojecten.

Fase 2 van het project bestond uit het toepassen van de geselecteerde bio-assays op grond- en sedimentmonsters afkomstig van de gekozen proefprojecten en het interpreteren van de resultaten van de bio-assays.

2. FASE 1: SELECTIE BIO-ASSAYS EN KEUZE PROEFPROJECTEN

2.1. Selectie bio-assays

Wil men een bio-assay gebruiken, dan moet deze aan een aantal eisen voldoen. De toetsorganismen moeten oecologisch relevant en genetisch homogeen zijn. De bio-assay moet eenvoudig en goedkoop zijn en de toetsorganismen moeten eenvoudig te kweken zijn (Kamerman en van Gestel, 1991). Daarnaast dienen de toetsorganismen de te onderzoeken stof goed te kunnen accumuleren en bij voorkeur voldoende biomassa te bezitten om eventuele chemische analyses mogelijk te maken.

In het onderzoek is gebruik gemaakt van enkele reeds gestandaardiseerde bio-assays en enkele recent ontwikkelde bio-assays. In paragraaf 2.1.1. en 2.1.2. wordt op de selectie van de toegepaste bio-assays ingegaan.

2.1.1. Bio-assays op basis van gestandaardiseerde toxiciteitstoetsen

In het kader van het Speerpuntprogramma Bodemonderzoek is een aantal bio-assays (verder) ontwikkeld met het oog op toepassingsmogelijkheden in Nederland. In bijlage I is een tabel opgenomen (afkomstig uit Van de Guchte et al, 1996) met een overzicht van bio-assays die in Nederland en/of in het buitenland worden gebruikt bij de beoordeling van verontreinigde water- en/of landbodems.

Voor landbodems zijn volgens de tabel één kortdurende screeningstest en vier chronische testen toepasbaar. De screeningstest is de Microtox-test met *Photobacterium phosphoreum*.

De vier genoemde chronische testen zijn:

- de wortelgroei-/spruitgroei-toets met sla (*Lactuca sativa*) en andere planten. Deze toets wordt vaak uitgevoerd op eluaat van grond, maar kan ook op grond zelf toegepast worden;
- toetsing van de overleving en reproductie van een protozo (*Colpoda steinii*);
- toetsing van de overleving, groei en reproductie van een regenworm (*Eisenia fetida*);
- toetsing van de overleving, groei en reproductie van een springstaart (*Folsomia candida*).

Opgemerkt moet worden dat de meeste van deze testen in principe zijn ontwikkeld voor de bepaling van de effecten van individuele stoffen op genoemde organismen. Het zijn dus eigenlijk toxiciteitstoetsen, die normaal worden uitgevoerd in een gestandaardiseerd substraat (vaak een kunstmatig samengestelde bodem of een gestandaardiseerde veldgrond). Men neemt aan dat deze testen ook toepasbaar zijn als bio-assay (zie bijv. DECHEMA, 1995; Keddy et al., 1992), maar ze zijn nog nauwelijks als zodanig toegepast. De reden hiervoor is, dat met name voor subletale parameters als groei en reproductie geldt dat deze ook sterk afhankelijk zijn van de fysisch-chemische eigenschappen van de te onderzoeken gronden (bijv. pH, organisch stofgehalte, nutriëntgehalte) (Van Gestel, 1997).

Bij de selectie van de bio-assays hebben onderstaande aspecten en overwegingen een rol gespeeld:

- toepassing van de Microtox-test, die gericht is op het nagaan van acute toxische effecten, is niet erg nuttig in het onderhavige project. De test blijkt in de praktijk vaak niet erg gevoelig te zijn (zie bijv. Vanhala en Ahtiainen, 1994). Het aantonen van acute toxiciteit met de Microtox-test bevestigt weliswaar dat er sprake is van een ongewenste verontreiniging, maar het afwezig zijn van acute toxiciteit betekent nog niet dat er geen sprake is van chronische toxische effecten. Bij risico-evaluaties bij gevallen van bodemverontreiniging is met name de chronische ecotoxiciteit bij aanwezigheid van lagere concentraties aan verontreinigende stoffen van belang;
- ten aanzien van de chronische testen gaat de voorkeur uit naar bio-assays die worden toegepast op de grond zelf en niet op extracten, eluaten of poriewater. De reden hiervoor is dat de aanwezige bodemdeeltjes de toxiciteit van de aanwezige stoffen kunnen beïnvloeden (zie bijvoorbeeld Gunkel et al., 1993) en dat een test op de grond zelf de praktijksituatie op het vervuilde terrein beter benadert;

- de voorkeur gaat uit naar toepassing van testmethoden die zijn vastgelegd in internationaal gestandaardiseerde protocollen. De toetsen voor het bepalen van de toxiciteit van milieugevaarlijke stoffen voor de springstaart en de regenworm zijn reeds beschreven in een internationale (concept)richtlijnen, en zijn als zodanig ook toepasbaar als bio-assay. De toets met de protozo is beschreven in de literatuur, maar (nog) niet uitgewerkt in een richtlijn.

Op basis hiervan is besloten in het onderhavige onderzoek in ieder geval de genoemde testen met *Eisenia fetida* (Savigny) en *Folsomia candida* (Willem) toe te passen. Beide testen konden bovendien operationeel gemaakt worden op de vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van de Vrije Universiteit te Amsterdam.

Regenwormen zijn belangrijke organismen in het (terrestrische) ecosysteem. Ze zorgen voor beluchting van de bodem en spelen een rol in de afbraak van organisch materiaal. Tevens zijn regenwormen een belangrijke voedselbron voor vogels en zoogdieren en kunnen daardoor als intermediair dienen bij de door vergiftiging in voedselketens (Kamerman en Van Gestel, 1991; Ma, 1987; Pankakoski, 1993). Regenwormen staan door hun intensieve contact met de bodem direct bloot aan aanwezige verontreinigingen (Kamerman en Van Gestel, 1991). *Eisenia fetida* is in internationaal verband gekozen als toetsorganisme voor toxiciteitsonderzoek (OECD, 1984). Testen met *Eisenia fetida* zijn in het verleden door verschillende auteurs beschreven op ondermeer vervuiling met zware metalen (Van Gestel et al., 1992b; Spurgeon en Hopkin, 1995, 1996; Spurgeon et al. 1994), vervuiling met organische verbindingen (Gibbs et al., 1996) en op vervuiling met poederkoolvliegias (Jenner, 1995). Een test waarin ook naar subletale effecten op groei en reproductie van regenwormen wordt gekeken is beschreven door de ISO (1993).

Folsomia candida is een parthenogenetisch voortplantende springstaart; springstaarten zijn ongevleugelde insectachtige dieren, die in grote aantallen in de bodem voorkomen. Voor *Folsomia candida* bestaat reeds een gestandaardiseerde toets (ISO, 1994). Hierbij kunnen in een standaardgrond chemicaliën worden getest en hieruit kunnen NOEC⁻ en EC₅₀-waarden worden afgeleid. Hieruit blijkt dat de organismen reageren op vervuiling in termen van verlaagde reproductie (Crommentuijn et al., 1993). Er is echter nog weinig ervaring opgedaan met het uitvoeren van deze test op veldgronden (Smit en Gestel, 1996). In dit onderzoek zal de ISO-methode als uitgangspunt worden gebruikt.

Zowel bij de regenwormen als bij de springstaarten is in het onderhavige project, naast overleving en reproductie, waar mogelijk ook gekeken naar accumulatie van verontreinigende stoffen in de organismen.

2.1.2. Bio-assays met micro-organismen en nematoden

Bij het samenstellen van een evenwichtige en complete batterij van toetsen spelen de representativiteit van de gekozen toetsorganismen ten aanzien van de ecologische functie, de blootstellingsroute en de taxonomische groep een rol (Van Straalen en Denneman, 1989). Voor een brede beoordeling is het nodig om, naast de bovengenoemde gestandaardiseerde toetsen, ook subletale effecten te bestuderen op andere organismen (waarvoor nog geen gestandaardiseerde bio-assays beschikbaar zijn). Bij bodemecologisch onderzoek van landbouwgronden en natuurterreinen worden meerdere biologische parameters tegelijk gemeten om een zo volledig mogelijk inzicht te krijgen in effecten van bodemverontreiniging en beheersmethoden op bodemecosystemen.

In de bodem spelen micro-organismen en microbivoren, zoals protozoën en nematoden, een sleutelrol bij de afbraak van organische stof en in de nutriëntenkringlopen (Bouwman et al., 1994; Bloem et al., 1997). In overleg met de betrokken partijen zijn daarom ook bio-assays met micro-organismen en nematoden toegevoegd. Het gaat om de volgende bio-assays, die zijn uitgevoerd door het AB-DLO te Haren:

- bodemmicro-organismen; meting biomassa (microscopisch) en groeisnelheid (met radioactief thymidine en leucine);

- nematoden; aantal en populatiesamenstelling (microscopisch).

Bij deze bio-assays wordt gekeken naar de micro-organismen en nematoden, die aanwezig zijn in de uit het veld afkomstige grondmonsters. Dit is een belangrijk verschil met de door de VU uitgevoerde testen, waar regenwormen en springstaarten op of in de grondmonsters worden geplaatst.

De betreffende bio-assays worden hieronder kort toegelicht. Voor aanvullende informatie wordt verwezen naar Michel en Bloem (1993), Bouwman et al (1994), Bloem (1995) en Bloem et al. (1995a,b).

De technische wijze van uitvoering van de bio-assays met de micro-organismen en de nematoden wordt besproken in paragraaf 3.3.2.

micro-organismen

Om effecten op de micro-organismen in de bodem te meten werd in het verleden meestal de bodemademhaling (zuurstofverbruik of CO₂-productie) gemeten. Metingen van de bodemademhaling vereisen relatief lange incubaties. In gronden waarin geen grote hoeveelheden gemakkelijk afbreekbare organische verbindingen zitten, is het zuurstofverbruik zo laag dat de monsters 2 tot 6 weken geïncubeerd moeten worden om de respiratie te kunnen meten. Het meten van de bodemademhaling alleen geeft vaak onvoldoende inzicht in het functioneren van de bodemmicro-organismen. Omdat iedere methode zijn beperkingen heeft zijn meestal meerdere parameters nodig om betrouwbare conclusies te kunnen trekken (Brookes, 1995).

AB-DLO verricht, naast traditionele metingen van de bodemademhaling, metingen van o.a. de microbiële biomassa en groeisnelheid. De gebruikte methoden (automatische beeldverwerking, inbouw van gelabelde verbindingen door microben) komen oorspronkelijk uit de aquatische ecologie (Bjørnsen, 1986; Moriarty, 1986), en worden sinds ongeveer 1990 met goede resultaten toegepast in de bodemecologie (Bååth, 1990; Bloem et al., 1995a).

Uit recent onderzoek van AB-DLO blijkt dat in landbouwgronden die met koper zijn verontreinigd (70-200 mg Cu kg⁻¹) de bacteriële groeisnelheid, gemeten als thymidine en leucine inbouw, na 13 jaar nog steeds met 75% is gereduceerd terwijl de biomassa en de ademhaling niet significant lager zijn dan in schone grond. Bij toevoeging van koper aan schone grond werd de groeisnelheid al geremd bij 10 mg Cu kg⁻¹, terwijl de biomassa en de ademhaling pas bij 100 mg Cu kg⁻¹ afnamen. De bodemademhaling is relatief ongevoelig voor verontreiniging met zware metalen (Brookes, 1995). Bååth (1992) en Diaz-Ravina en Bååth (1996) vonden ook significante effecten van zware metalen op de bacteriële thymidine- en leucine-inbouw. Deze technieken lijken dus veelbelovend voor het meten van effecten van bodemverontreiniging en beheersmaatregelen op micro-organismen in de bodem.

Er kan ook interessante informatie worden verkregen met selectieve tellingen van uit de bodem geïsoleerde bacteriën die kunnen groeien op bepaalde voedingsmedia (Doelman et al., 1994). Op deze wijze kan de gevoeligheid voor en resistentie tegen verontreiniging met zware metalen worden bepaald. Een nadeel van dergelijke technieken is dat slechts een klein deel (<10%) van de totale bacteriepopulatie in de bodem kan worden geïsoleerd en gekweekt. Daarom is in het onderhavige project gekozen voor methoden waarbij zoveel mogelijk de totale *in situ* aanwezige populatie wordt gemeten.

nematoden

Naast de microbiële biomassa en groeisnelheid worden aantal en populatiesamenstelling van de nematoden bepaald. Nematoden vormen een kwantitatief belangrijk en relatief eenvoudig te meten deel van de bodemfauna. De nematoden worden uit de grond geïsoleerd en vervolgens geteld en gedetermineerd onder het microscoop.

Op basis van de morfologie van de monddelen worden vier functionele groepen onderscheiden: bacterivoren (eten bacteriën), fungivoren (eten schimmels), herbivoren (of phytofagen, eten van plantenwortels) en omnivoren/predatoren (eten allerlei voedsel, waaronder andere nematoden). De samenstelling van de nematodenpopulatie geeft een indicatie over het relatieve belang van verschillende biologische processen in de bodem: afbraak van organische stof door bacteriën of door schimmels, aantasting van plantenwortels of predatie van nematoden door andere (predatore) nematoden.

In dit onderzoek werden de Tylenchidae tot de herbivoren gerekend. Uit de soortensamenstelling van de nematoden kunnen enkele indexen worden berekend, die de verhouding aangeven tussen snelle en langzame groeiers (opportunisten en conservatieven, r- en K-geselecteerde organismen). De snelle groeiers komen veel voor bij herkolonisatie na een verstoring, de langzame groeiers kunnen zich goed handhaven in een stabiele situatie. De Plant Parasitic Index heeft betrekking op de herbivore nematoden, de Maturity Index heeft betrekking op alle andere nematoden (Bongers, 1990).

2.2. Keuze proefprojecten

2.2.1. Keuzecriteria

Voor de identificatie en keuze van de proefprojecten zijn de volgende twee criteria van groot belang;

1. De projecten moeten betrekking hebben op relevante problemen uit de praktijk. Er is gezocht naar 'representatieve en aansprekende' praktijkgevallen van regionale of lokale bodemverontreiniging. Hierbij is het ook van belang dat de 'probleemhebbers' graag mee willen werken met het onderzoek;
2. De projecten moeten niet te complex zijn en er moeten uit eerder onderzoek voldoende gegevens over de bodemkwaliteit beschikbaar zijn. Ten aanzien van de complexiteit is het vooral van belang dat het om eenduidige bodemverontreiniging gaat (geen brede cocktail van stoffen) en dat de mate van verontreiniging de enige variërende factor is binnen het onderzoek. Belangrijke abiotische factoren, zoals organische-stofgehalte, kleigehalte en zuurstofgehalte moeten zo constant mogelijk zijn. Het meest ideaal is een homogene aërobe zandgrond. Om eventuele effecten op de toetsorganismen met enige zekerheid toe te kunnen schrijven aan de aanwezige verontreinigingen, is het van belang dat in de projecten sprake is van een duidelijke concentratie-gradiënt en dat representatieve niet verontreinigde controlemonsters beschikbaar zijn.

2.2.2. Gekozen proefprojecten

Op basis van de in de vorige paragraaf aangegeven criteria zijn de volgende proefprojecten gekozen:

- een proefproject met een met zware metalen (chromium en/of nikkel) verontreinigde grond afkomstig van een galvanisch bedrijf in Friesland. Op het terrein zijn monsters genomen met een verschillende mate van verontreiniging. Net buiten het terrein is een niet verontreinigd referentiemonster genomen;
- een proefproject gericht op de monitoring en beoordeling van het eindresultaat van biologische reiniging van oliehoudende gronden. Geïnteresseerde probleemhebbers zijn (biologische) grondreinigers en (overheids)bedrijven die veel problemen met olieverontreiniging hebben, zoals bijvoorbeeld oliemaatschappijen, NS en Defensie. Hiertoe zijn uit de reinigingshal van de biologische grondreiniger BION Overijssel in Almelo humusarme zandige grondmonsters genomen, afkomstig van dezelfde olieverontreiniging (een diesellekkage op een Defensieterrein) maar met een verschillende verblijftijd in de biologische reiniging. Als referentiemonster is op het gesaneerde terrein een 'schoon' monster genomen;
- een proefproject gericht op het ecotoxicologisch beoordelen van de geschiktheid van gedroogde baggerspecie voor toepassing op het land. Het is voor de probleemhebbers (o.a. Rijkswaterstaat en Waterschappen) van belang om te weten wat de ecologische risico's zijn bij het op het land brengen van klasse-1, -2, -3 en -4 (onderhouds)specie. In Waterschap Goeree-Overflakkee zijn slibmonsters genomen met een verontreinigingsgradiënt met PAK.

3. FASE 2: UITVOERING

Dit hoofdstuk bespreekt de wijze van uitvoering van het onderzoek. Achtereenvolgens komen aan de orde:

- monstername proefprojecten (paragraaf 3.1);
- chemische en fysische karakterisering monsters (paragraaf 3.2);
- uitvoering bio-assays (paragraaf 3.3).

3.1. Monstername proefprojecten

In het onderstaande wordt per proefproject op de monstername ingegaan. Bij elk project zijn de monsters genummerd van 1 tot 4 of 5 op basis van oplopende concentratie aan verontreiniging. De nummers 1 zijn de 'schoon' referentiemonsters en de hoogste nummers (4 of 5) de meest verontreinigde monsters. Met de code 'metaal', 'olie' of 'bagger' wordt de herkomst van de monsters aangeduid.

zware metalen verontreiniging galvanische industrie

De met zware metalen verontreinigde grond was afkomstig van een galvanisch bedrijfsterrein in Gorredijk in Friesland. Het achterterrein van het bedrijf is verontreinigd met nikkel en chroom als gevolg van een lekkage/overstroming met bedrijfsafvalwater. Er zijn twee monsters op het achterterrein genomen op plaatsen, waarvan verwacht werd dat ze een concentratiegradiënt van nikkel en chroom te zien zouden geven (metaal 3 en 4). Daarnaast is op ca. 25 meter buiten het terrein een 'schoon' referentiemonster genomen (metaal 1). Op de monsternameplaatsen werd eerst de humeuze toplaag van circa 20 cm verwijderd. Vervolgens werd de grond tussen 20 en 30 cm beneden maaiveld bemonsterd. Er is nauwlettend op toegezien dat de bodemkundige samenstelling van de monsters vergelijkbaar was.

Uit de analyse van de monsters (zie paragraaf 3.2 en 4.1.1) kwam naar voren dat er geen sprake was van eenzelfde concentratiegradiënt van nikkel en chroom, maar van een tegengestelde gradiënt. Het monster metaal 3 was relatief sterk verontreinigd met chroom en het monster metaal 4 was relatief sterk verontreinigd met nikkel. Daarom is besloten de concentratiereeks uit te breiden door aanvullend een mengmonster (metaal 2) samen te stellen uit de monsters metaal 1 en 3.

oliegrond biologische reiniging

Op 23 mei 1996 zijn twee monsters genomen uit een partij met olie verontreinigde grond, die gereinigd werd in de biologische reinigingshal van BION in Almelo. De partij was onderverdeeld in meerdere vakken met een verschillende startdatum van de biologische reiniging. De verblijftijd van het vak van het monster olie 2 in de reiniging bedroeg 8 weken (start op 28 maart 1996). De verblijftijd van het vak van het monster olie 4 bedroeg 7 weken (start op 4 april 1996). Als referentiemonster is op het gesaneerde defensie terrein, waar de partij grond vandaan kwam, een 'schoon' monster genomen (olie 1) net naast de uitgevoerde ontgraving (over hetzelfde dieptetraject als de uitgevoerde ontgraving).

Op basis van de gemeten oliegehalten in de monsters (zie paragraaf 3.2 en 4.2.1), is (net als bij de metaalgrond uit Gorredijk) besloten de concentratiereeks uit te breiden door aanvullend een mengmonster samen te stellen (olie 3) uit de monsters olie 1 en 4.

slibmonsters Goeree-Overflakkee

De slibmonsters zijn afkomstig uit vijf dicht bij elkaar gelegen sloten in het Waterschap Goeree-Overflakkee. De monsternameplaatsen zijn zodanig geselecteerd dat er in ieder geval één 'schoon' referentiemonster bij was (bagger 1) en waarschijnlijk vier monsters die verontreinigd waren met PAK in een gradiënt van klasse 0 tot 3. Behalve PAK was er, op basis van de beschikbare gegevens, in het slib op de monsternameplaatsen geen relevante andere verontreiniging aanwezig. Bovendien was het slib, volgens de beschikbare informatie, op de monsternameplaatsen vergelijkbaar qua bodemkundige samenstelling.

3.2. Chemische en fysische karakterisering monsters

Alle monsters voor de bio-assays zijn uitgebreid chemisch en fysisch (abiotisch) gekarakteriseerd op het milieulaboratorium van Biochem in Zoetermeer.

De monsters van de zware metalenverontreiniging zijn geanalyseerd op chroom en nikkel. De monsters van de biologische reiniging zijn geanalyseerd op minerale olie (GC).

De slibmonsters zijn breed onderzocht op het NVN-5740 pakket. Dit pakket bestaat uit arseen, zware metalen (cadmium, kwik, lood, koper, nikkel, chroom en zink), de somparameter EOCI (= som van de extraheerbare organische halogeenvverbindingen), minerale olie (gaschromatografisch) en Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (de 10 PAK van VROM).

Ten behoeve van de fysische karakterisering zijn alle monsters bij Biochem onderzocht op:

- zuurgraad (pH-KCl). Bij de baggermonsters is de pH-CaCl₂ gemeten;
- korrelgrootteverdeling, incl. kleigehalte;
- gehalte aan organische stof.

Op het laboratorium van de vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van de VU zijn in alle monsters ook nog de pH-H₂O en de Water Holding Capacity (WHC) bepaald. Van de met zware metalen verontreinigde grond is door de VU tevens de H₂O-oplosbare en de CaCl₂-uitwisselbare hoeveelheid chroom en nikkel bepaald.

De volledige resultaten (laboratoriumstaten) van de analyses bij Biochem zijn opgenomen in bijlage II. De resultaten worden, per project afzonderlijk, besproken in paragraaf 4.1.1, 4.2.1 en 4.3.1.

Door de VU zijn bij de uitvoering van de bio-assays ook interne metaal- en PAK-concentraties in de toetsorganismen gemeten om meer inzicht te krijgen in de biologische beschikbaarheid van deze stoffen. De resultaten hiervan worden toegelicht bij de bespreking van de resultaten van de betreffende bio-assays.

3.3. Uitvoering bio-assays

3.3.1. Bio-assays met *Eisenia fetida* en *Folsomia candida*

Eisenia fetida

De regenwormen voor de bio-assay waren afkomstig uit de kweek van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) te Bilthoven, waar de dieren worden gekweekt op een mengsel van potgrond en paardenmest. Voor de bio-assay met *Eisenia fetida* werden PVC potten gebruikt met een bodem van fijnmazig gaas en een inhoud van 880 cm³. De grond werd met demi-water op een vochtgehalte van 50 % van de WHC gebracht en hiermee werden de potten tot ongeveer vijfzesde gevuld. De potten werden in plastic petrischaaltjes geplaatst. In het midden van de grond werd een gaatje gemaakt waarin 1,5 gram gemalen en bevochtigde koemest werd gedaan als voedsel voor de wormen (verhouding mest : water 2:1).

In elke pot werden 10 volwassen *Eisenia fetida* gedaan, herkenbaar aan een ontwikkeld clitellum. De wormen werden van tevoren gewassen, droog gedept op filtreerpapier en individueel gewogen. De test werd in vijfvoud uitgevoerd; bij de baggerspecie in viervoud vanwege een tekort aan volwassen wormen. De potten werden voorzien van een transparant passend deksel en weggezet in de klimaatkamer bij 20°C, 75% relatieve luchtvochtigheid en 14/10 uur licht/donker. Eens per week werd het vochtgehalte op peil gebracht door de potten met demi-water op het oorspronkelijke gewicht te brengen. Als voeding zijn enkele korrels gist op de grond gestrooid. Als de korrels grotendeels of helemaal waren verdwenen werden de wormen bijgevoerd. Opkomend onkruid werd verwijderd.

Na zes weken werd de test uitgehaald. De overlevende wormen werden handmatig uit het medium gehaald en geteld. Nadat de wormen waren gewassen en droog gedept op filtreerpapier, werden zij individueel gewogen. Vervolgens werden de dieren op vochtig filtreerpapier geplaatst en 24 uur weggezet in de klimaatkamer. Gedurende deze tijd legen de dieren grotendeels hun darmkanaal. Hierdoor wordt, bij de meting van de interne metaal- of PAK-concentraties, de darminhoud (die voornamelijk uit grond bestaat) niet meegenomen. Na te zijn gewassen en drooggedept, werden de dieren in porties van ongeveer 1 gram afgewogen en ingevroren bij -20°C voor verdere analyses. De grond werd gecontroleerd op aanwezige cocons door deze met water door een 2 mm en een 1 mm zeef te spoelen. De cocons blijven dan achter op de zeven. Ook werd de pH van de grond na afloop van de bio-assay bepaald.

Folsomia candida

Voor de bio-assay met *Folsomia candida* werd de grond op een vochtgehalte van 40 procent van de WHC gebracht. In glazen potjes met een inhoud van 150 ml werd 25 gram vochtige grond gedaan. Hierop werden 10 dieren geplaatst met een leeftijd van 10 tot 12 dagen.

De even oude (gesynchroniseerde) dieren werden verkregen door volwassen dieren twee à drie dagen op een vochtige gipsbodem eieren te laten leggen en ze vervolgens weer te verwijderen. Na ongeveer twee weken komen de eieren uit en 10 tot 12 dagen hierna kunnen de dieren gebruikt worden voor de test.

De gebruikte populatie *Folsomia candida* is afkomstig van een kweek van de Freie Universität in Berlijn. Als voer werd een kleine hoeveelheid gedroogde bakkersgist gebruikt (Oetker). Elk monster werd in tienvoud getest. Van 20 dieren werd op de microbalans het begingewicht bepaald. Dit bedroeg bij de bio-assays op de metaal- en oliemonsters (gemiddelde \pm SD) $0,0084 \pm 0,0042$ mg. Bij de bio-assays op de baggermonsters bedroeg het begingewicht $0,0149 \pm 0,0047$ mg.

De potjes werden afgesloten en weggezet in de klimaatkamer bij 18°C, 75% relatieve luchtvochtigheid en 14/10 uur licht/donker. Tweemaal per week werden de potjes belucht door de deksels even te openen en werden de dieren, indien nodig, bijgevoerd. Het vochtgehalte werd gedurende het experiment gereguleerd door met demiwater de potjes op het oorspronkelijke gewicht te brengen. Omdat de uitdroging minimaal bleek te zijn, was dit maar eenmaal nodig.

Na ruim vier weken, toen er voldoende juvenielen zichtbaar waren, werden overleving en groei bepaald. De grond werd met water uit de potjes gespoeld in een 100 ml bekeerglas en goed geroerd, zodat alle dieren op het wateroppervlak kwamen drijven. Hiervan werd een dia gemaakt, waarop later de overlevende adulten en geproduceerde juvenielen werden geteld. Een aantal adulte dieren werd verzameld, gewogen en ingevroren voor bepaling van interne metaal concentraties. Na vriesdrogen werd van deze dieren het drooggewicht bepaald. Ook werd de pH van de grond na afloop van de bio-assay bepaald.

Statistische analyse van de resultaten van de bio-assays met de regenwormen en springstaarten is uitgevoerd met behulp van variantie-analyse (ANOVA) en een Student t-toets.

3.3.2. Bio-assays met micro-organismen en nematoden micro-organismen

Het totale aantal bacteriën en de afmetingen van de cellen werden bepaald door middel van directe microscopische tellingen (Bloem et al., 1995a,b). Dit gebeurde in grondpreparaten waarin de micro-organismen zijn gekleurd met een fluorescerende verbinding. Uit het aantal en de afmetingen werden het biovolume en de biomassa berekend. Deze metingen zijn subjectief, onnauwkeurig en tijdrovend als ze met het oog worden verricht. Daarom heeft AB-DLO apparatuur en computerprogrammatuur ontwikkeld waarmee deze metingen volledig automatisch kunnen worden uitgevoerd met behulp van een confocale laser-scan microscoop en automatische beeldverwerking (Bloem et al., 1995a).

De groeisnelheid van bacteriën is bepaald door de inbouw van radioactief gelabelde ^3H -thymidine en ^{14}C -leucine in respectievelijk DNA en eiwitten te meten (Michel en Bloem, 1993). Omdat de thymidine met ^3H en de leucine met ^{14}C is gelabeld kunnen beide parameters (de microbiële DNA- en eiwit-synthese) in één bepaling worden gemeten. Het verband van de groeisnelheid met thymidine-inbouw is constanter dan met leucine-inbouw. Daar staat tegenover dat sommige soorten bacteriën, vooral anaërobe, thymidine niet kunnen inbouwen, terwijl leucine door vrijwel alle bacteriën kan worden ingebouwd. Daarom zijn beide methoden gelijktijdig gebruikt. De incubaties zijn zo kort (circa 1 uur) dat de groeisnelheid van de bacteriën niet verandert tijdens de incubatie. Dit gebeurt pas nadat de lopende DNA-replicatieronde is voltooid. In principe wordt dus de in situ groeisnelheid gemeten. Ook de biomassameting wordt niet beïnvloed door monstername en incubatie omdat het monster direct na de monstername wordt gefixeerd en geconserveerd met formaldehyde. Zowel de biomassa- als de groeisnelheidsmeting zijn ook toepasbaar in anaërobe monsters (Moriarty, 1986).

Voor de bepalingen werden de volgende aantallen replicaties gebruikt: bacteriële groeisnelheid 4; bacteriële aantal en biomassa 10. De statistische significantie van verschillen tussen de monsters werd getoetst door middel van variantieanalyse (F-toets, gevolgd door Student-t-toets).

nematoden

De nematoden zijn uit de grond geïsoleerd met een Oostenbrink trechter (elutriator) (s' Jacob en Van Bezooyen, 1984), en vervolgens geteld en gedetermineerd onder de microscoop.

Bij het onderzoek van de nematodenpopulatie zijn drie replicaties uitgevoerd. De statistische significantie van verschillen tussen de monsters werd getoetst door middel van variantieanalyse (F-toets, gevolgd door Student-t-toets).

4. RESULTATEN

In dit hoofdstuk worden de resultaten van het uitgevoerde onderzoek besproken. Achtereenvolgens komen aan de orde:

- de bio-assays met de zware metalen verontreiniging (paragraaf 4.1);
- de bio-assays met de olieverontreiniging (paragraaf 4.2);
- de bio-assays met de met PAK verontreinigde baggerspecie (paragraaf 4.3).

4.1. Bio-assays op met zware metalen verontreinigde grond

4.1.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters

bodemkundige samenstelling

De bodemkundige eigenschappen van de grondmonsters van het terrein van de galvanische industrie zijn op een rij gezet in tabel 4.1. De grond is bodemkundig vrij homogeen van samenstelling. Dit hangt waarschijnlijk samen met het feit dat de grond op en bij het bedrijfsterrein in het verleden is opgehoogd. De grond kan worden gekwalificeerd als matig humeus kleiarm zand. De pH-H₂O en pH-KCl-waarden liggen rond de 6. Het organische stofgehalte varieert tussen 3 en 6 gew. % en het lutumgehalte ligt rond de 3 gew. %. In het meest verontreinigde monster (metaal 4) is het lutumgehalte (8 gew. %) duidelijk hoger dan in de rest van de monsters.

Tabel 4.1. Karakteristieken van de met metaal verontreinigde grond. De fractie < 2 µm is uitgedrukt als het percentage van de totale fractie 0-2000 µm

	metaal 1	metaal 2	metaal 3	metaal
pH-H ₂ O	6,2	5,8	6,1	6,4
pH-KCl	5,9	5,8	5,7	6,0
WHC (%)	43	43	52	46
organische stof	2,9	5,9	4,5	3,9
fractie < 2 µm (%)	3,7	2,6	2,5	8,0

verontreiniging

In tabel 4.2. zijn de totaalgehalten aan chroom en nikkel en de gemeten H₂O-oplosbare/CaCl₂-uitwisselbare metaalgehalten weergegeven.

Tabel 4.2. Totale, wateroplosbaar en CaCl₂-uitwisselbare fracties chroom en nikkel in de metaalgrond in mg/kg DW. Tussen haakjes staan de percentages oplosbaar en uitwisselbare fracties ten opzichte van de totale concentratie. Waarden voor oplosbare en uitwisselbare fracties zijn gemiddelden (n = 2)

	metaal 1	metaal 2	metaal 3	metaal 4
chroom	< 10	550	1.300	430
nikkel	< 5,0	350	930	2.800
H ₂ O-oplosbaar chroom	n.d.	6,6 (1,2)	14,7 (1,1)	0,7 (0,16)
H ₂ O-oplosbaar nikkel	n.d.	1,5 (0,43)	2,8 (0,30)	5,8 (0,21)
CaCl ₂ -uitwisselbaar nikkel	n.d.	29,9 (8,5)	84,9 (9,1)	216,0 (7,7)

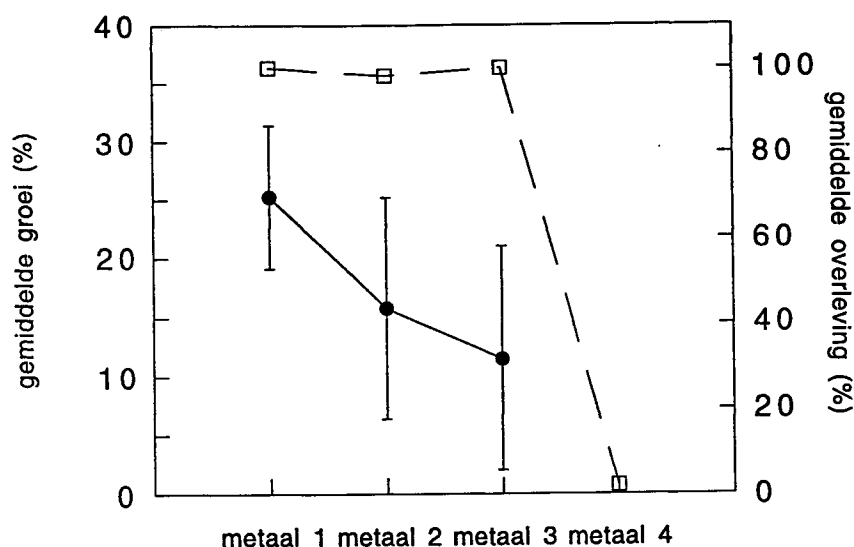
Monster metaal 1 is niet met metalen verontreinigd. De aanwezige totaalgehalten aan metalen in de monsters metaal 2, 3 en 4 zijn hoog. De totaalgehalten aan nikkel overschrijden respectievelijk 5, 12 en 26 keer de interventiewaarde. De totaalgehalten aan chroom overschrijden respectievelijk 3, 6 en 2 keer de interventiewaarde. De chroomgehalten in de monsters metaal 2 en metaal 4 liggen niet ver uit elkaar. Het totaalgehalte aan nikkel in de monsters metaal 1, 2, 3 en 4 vertoont een duidelijke gradiënt van schoon naar vuil. Voor chroom is geen duidelijke gradiënt aanwezig.

De wateroplosbare en uitwisselbare hoeveelheden nikkel en chroom lopen op met de gemeten totaalgehalten. Het hoge percentage lutum is er waarschijnlijk de oorzaak van dat de percentages wateroplosbaar en CaCl₂-uitwisselbaar metaal in dit monster lager zijn dan in de andere monsters. Omdat chroom voornamelijk als CrO₄²⁻ of als Cr₂O₇²⁻ aanwezig zal zijn,

is dit niet uitwisselbaar met de positieve calcium ionen. Daarom is er ook vrijwel geen chroom aangetroffen in de CaCl₂-extracten.

4.1.2. Bio-assay met *Eisenia fetida* overleving

Tijdens de test was er geen activiteit te zien van de wormen in het meest vervuilde monster (metaal 4, nikkelconcentratie 26 x Interventiewaarde (I) en chroomconcentratie 2 x I). Er werd niet gegeten, waardoor er schimmelgroei optrad op de als voedsel toegediende koemest. Na afloop bleek dat geen van de wormen de test had overleefd. De overleving in de andere drie gronden was op een enkele worm na maximaal (figuur 4.1.).



Figuur 4.1. Overleving (open vierkantjes) en groei (gesloten rondjes) in procenten van *Eisenia fetida* op met metaal verontreinigde grond. Waarden zijn gemiddelden (n=5) ± SD

De hoge nikkelconcentratie in de meest vervuilde grond (metaal 4) is waarschijnlijk voor de sterfte verantwoordelijk. De chroomconcentratie in metaal 4 is immers vergelijkbaar met metaal 2 en duidelijk lager dan in metaal 3. De grond van monster metaal 3 heeft de hoogste chroomconcentratie (6 x I) en hierin hadden alle wormen de test overleefd.

groei

Er is een afname te zien in de groei van *Eisenia fetida* bij toenemende metaalconcentraties. Alleen de groei in monster metaal 3 (nikkel 12 x I en chroom 6 x I) is significant lager (t-test, p=0,026) vergeleken met het schoonste monster (figuur 4.1.).

Er zijn in totaal slechts twee cocons gevonden, beide in de schoonste grond. De pH in de potten waarin de wormen de test hebben overleefd, is gemiddeld met 0,2 eenheden gestegen. Dit geldt voor zowel pH-H₂O als pH-KCl. De pH van monster metaal 4 was onveranderd.

interne metaalconcentraties

Tabel 4.3. geeft de gemeten interne metaalconcentratie van de regenwormen. De tabel laat zien dat de interne chroom en nikkel concentraties in de wormen de externe concentraties volgen. De chroom-concentraties zijn in de wormen uit monster metaal 3 significant hoger dan in monster metaal 2 (t-test, p=0.033). Twee van de vijf replica's uit monster metaal 1 hadden zowel een detecteerbaar chroom- als nikkelgehalte, dat duidelijk lager is dan in de monsters metaal 2 en 3 (data niet weergegeven). De interne nikkelconcentratie is op monster metaal 3 significant hoger dan op monster metaal 2 (t-test, p<0,001). In tabel 4.3.

staan geen waarden bij monster metaal 4, omdat geen van de wormen de test hebben overleefd.

Tabel 4.3. Interne metaalconcentraties van *Eisenia fetida* (in mg/kg DW) na 6 weken blootstelling aan een met metaal verontreinigde grond. Waarden zijn gemiddelde \pm SD (n=5). Waarden aangegeven met een sterretje (*) zijn significant hoger dan de concentraties bij metaal 2

	metaal 1	metaal 2	metaal 3	metaal 4
cadmium	3,78 \pm 0,98	3,17 \pm 1,18	4,60 \pm 1,20	--
chromium	n.d.	31,3 \pm 24,0	87,4 \pm 42,5 *	--
ijzer	408 \pm 137	239 \pm 53,5	335 \pm 64,9	--
nikkel	n.d.	20,7 \pm 2,40	32,6 \pm 3,80 *	--
zink	130 \pm 10,1	120 \pm 2,81	120 \pm 9,60	--

4.1.3. Bio-assay met *Folsomia candida* overleving

Overleving vertoonde geen afnemende trend en was met gemiddeld (\pm SD) 56 \pm 8,4 procent laag.

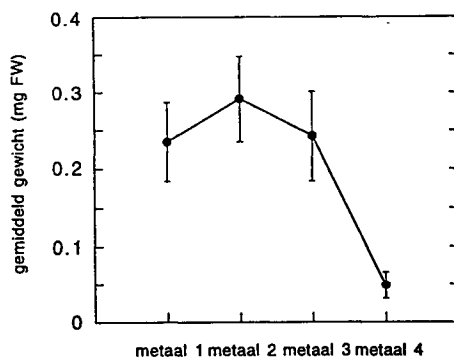
groei

De groei van *Folsomia candida* wordt alleen geremd in het meest vervuilde monster metaal 4. Gedurende de test bleef de groei in monster 4 achter bij de rest (figuur 4.2.). Nikkel lijkt ook hier de veroorzaker van de geringe groei. Monster metaal 4 heeft de op één na laagste chroomconcentratie (2 x l) en de hoogste nikkelconcentratie (26 x l, zie tabel 4.2.). Monster metaal 3 heeft de hoogste chroomconcentratie (6 x l) en daar was de groei niet significant lager dan in de monsters metaal 1 en 2.

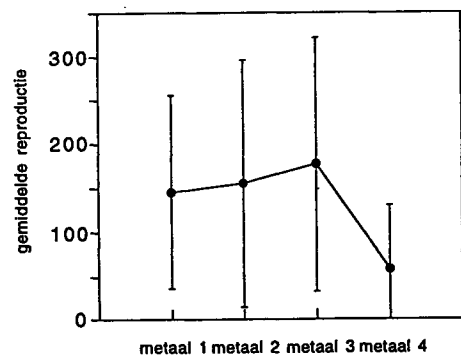
reproductie

Net als bij de groei is ook de gemiddelde reproductie alleen lager in het meest vervuilde monster metaal 4 (figuur 4.3.). Dit verschil is echter niet significant.

De pH is gemiddeld met 0,3 (pH-H₂O) tot 0,4 eenheden (pH-KCl) afgenomen tijdens de test.



Figuur 4.2. Eindgewichten (mg FW) van *Folsomia candida* na afloop van de bio-assay op met metaal verontreinigde grond. Waarden zijn gemiddelden (5 \leq n \leq 8) \pm SD



Figuur 4.3. Gemiddelde reproductie van *Folsomia candida* op met metaal verontreinigde grond. Waarden zijn gemiddelden (7 \leq n \leq 8) \pm SD

interne metaalconcentraties

In tabel 4.4. zijn de interne metaalgehalten in *Folsomia candida* gegeven na afloop van de bio-assay op de metaalgrond. Interne chroomconcentraties lijken een toename te vertonen

bij toenemende vervuiling, maar door de grote variatie tussen de replica's is deze toename niet significant (ANOVA, $p=0,490$). Bij chroom kwam meer dan 56% van de replica's boven de detectiegrens uit. De gemeten interne nikkelconcentraties verschillen significant van elkaar (ANOVA, $p=0,043$). Een t-test met inhomogene data laat zien dat de interne concentratie op het schoonste monster (metaal 1) significant lager is dan op de monsters metaal 2 ($p=0,033$) en metaal 4 ($p=0,038$). In alle dieren die zijn blootgesteld aan de twee meest vervuilde gronden is nikkel gevonden.

Tabel 4.4. Interne metaalconcentraties in *Folsomia candida* (in mg/kg DW), blootgesteld aan metaalverontreinigde grond. Waarden gemiddelden \pm SD ($3^2 n^2 5$). Waarden aangegeven met een sterretje (*) zijn significant hoger dan de concentratie bij metaal 1.

	metaal 1	metaal 2	metaal 3	metaal 4
cadmium	1,09 \pm 0,21	0,90 \pm 0,18	1,67 \pm 0,72	3,52 \pm 2,08
chroom	41,8 \pm 11,2	27,8 \pm 17,9	38,3 \pm 31,8	252 \pm 354
nikkel	5,07 \pm 2,62	21,5 \pm 9,28*	58,0 \pm 56,7	58,2 \pm 30,2

4.1.4. Micro-organismen

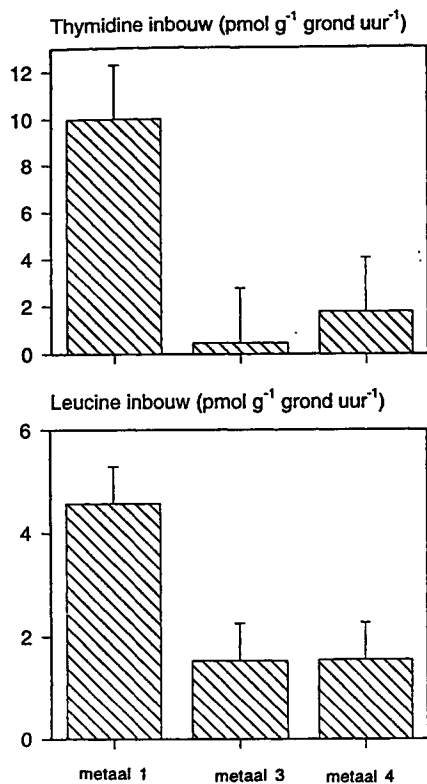
De testen met de micro-organismen (en de testen met de nematoden, zie paragraaf 3.3.2) zijn alleen uitgevoerd met de drie oorspronkelijke monsters (metaal 1, 3 en 4) en niet met het vierde samengestelde mengmonster (metaal 2). Dit is gedaan omdat bij deze testen wordt gekeken naar de micro-organismen en nematoden die reeds in de grond aanwezig zijn. Hierbij heeft het onderzoeken van een samengesteld monster, waarvan de deelmonsters al onderzocht zijn, geen nut.

In de verontreinigde monsters metaal 3 en 4 wezen zowel de thymidine- als de leucine-inbouw op een sterke afname van de bacteriële groeisnelheid (figuur 4.4.). De gemeten groeisnelheid in beide verontreinigde gronden was ruim een factor 3 lager dan in de schone grond.

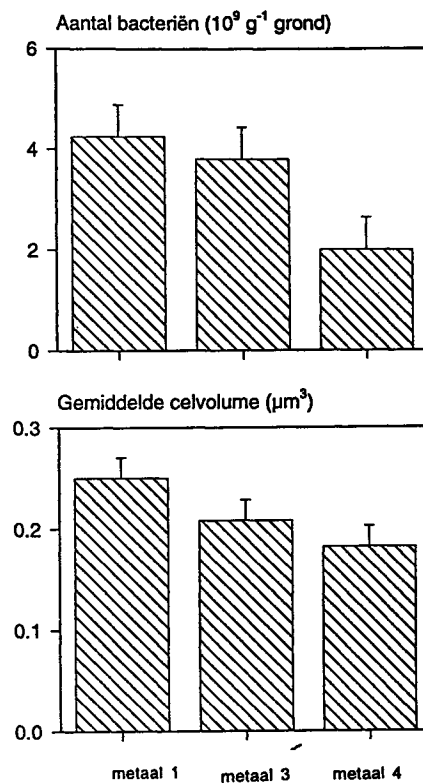
Ook het aantal bacteriën en het gemiddelde celvolume waren significant lager in de verontreinigde grond (figuur 4.5.). Dit had tot gevolg dat de totale bacteriële biomassa (berekend uit het aantal en het celvolume) afnam bij een toenemende verontreiniging met chroom en nikkel (figuur 4.6.). In het meest verontreinigde monster (metaal 4) was de bacteriële biomassa ongeveer een factor 3 lager dan in de schone grond en in monster metaal 3 een factor 1,3 lager.

4.1.5. Nematoden

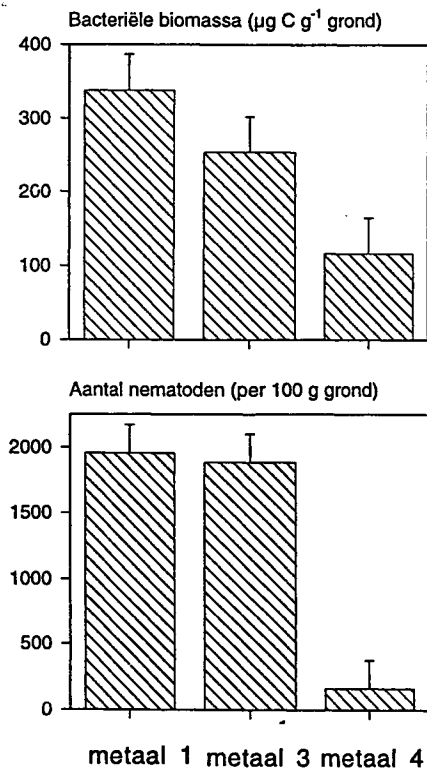
In de meest verontreinigde grond (metaal 4) was het aantal nematoden sterk verlaagd (tot 10% van het aantal in de schone grond, zie onderste deel figuur 4.6.). In het monster metaal 3, waarin de bacteriële groei al sterk was geremd, was het totale aantal nematoden nog normaal. De populatiesamenstelling was echter sterk gewijzigd (zie hiervoor tabel 4.5.). Het aandeel van de bacterivoren was afgenomen van 56% naar 15%, terwijl het aandeel van de herbivoren was toegenomen van 29% naar 84%. Dit wijst erop dat de verontreiniging wel de microbiële afbraakprocessen sterk remde, en dus ook de daaraan gekoppelde microbivore nematoden, maar niet de plantengroei en de daarvan afhankelijke herbivoren. In de meest verontreinigde grond (metaal 4) waren ook de herbivoren sterk gereduceerd. In beide verontreinigde monsters was het aantal te onderscheiden taxa (respectievelijk 9 en 6) veel lager dan in het schone monster (19) (zie tabel 4.5.). In het verloop van zowel de Maturity Index als de Plant Parasitic Index was geen trend zichtbaar.



Figuur 4.4. Thymidine en leucine inbouw in bacteriën, als maat voor de bacteriële groeisnelheid, in metaalverontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de 'Least Significant Difference' bij $p = 0.05$ ($LSD_{0.05}$)



Figuur 4.5. Het aantal bacteriën en het gemiddelde volume per cel in metaalverontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de $LSD_{0.05}$



Figuur 4.6. De bacteriële biomassa en het totale aantal nematoden in metaalverontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de $LSD_{0.05}$

Tabel 4.5. Samenstelling van de nematodenpopulatie in met zware metalen en dieselolie verontreinigde grond. B0 is een schone controle, B5 en B6 zijn respectievelijk 8 en 7 weken biologisch gereinigd. Gegeven wordt het gemiddelde van twee waarnemingen, met de standaardafwijking tussen haakjes

Monster	Veront- reiniging (mg/kg)	Relatieve abundantie van nematoden-type (%)						Aantal taxa			Maturity Index	Plant Parasitic Index	Dominante taxum (relatieve abundantie)
		Bacterivoren	Fungivoren	Herbivoren	Omniivoren/ predatoren	Totaal	Bacterivoren	Fungivoren	Herbivoren	Omniivoren/ predatoren			
G0	metaal 1	56 (8)	7 (8)	29 (1)	8 (1)	19,0 (0,0)	9,0 (1,4)	1,5 (0,7)	6,0 (1,4)	2,5 (0,7)	2,11	2,84	Cephalobidae (22%)
G1	metaal 3	15 (7)	1 (1)	84 (8)	1 (1)	9,0 (4,2)	3,5 (2,1)	0,5 (0,7)	4,5 (0,7)	0,5 (0,7)	1,57	2,92	Hemicyclophoridae (73%)
G2	metaal 4	81 (27)	2 (2)	18 (25)	0 (0)	5,5 (4,9)	2,0 (1,4)	1,0 (0,0)	2,5 (3,5)	0,0 (0,0)	2,25	2,81	Cephalobidae (45%)
B0	olie 1	1 (2)	43 (61)	53 (67)	3 (4)	3,5 (3,5)	0,5 (0,7)	0,5 (0,7)	1,5 (0,7)	1,0 (1,4)	2,12	N.D.	Aphelenchoiidae (86%)
B5	olie 2	66 (16)	15 (9)	19 (7)	0 (0)	9,5 (3,5)	5,0 (1,4)	2,5 (0,7)	2,5 (0,7)	0,0 (0,0)	1,63	2,21	Rhabditidae (37%)
B6	olie 4	84 (1)	4 (1)	11 (2)	1 (2)	9,5 (3,5)	4,5 (0,7)	1,0 (0,0)	3,0 (1,4)	0,5 (0,7)	1,31	2,29	Rhabditidae (68%)

4.2. Bio-assays met olieverontreiniging

4.2.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters bodemkundige samenstelling

De bodemkundige eigenschappen van de met olie verontreinigde grond zijn op een rij gezet in tabel 4.6. Het betreft humusarm, kleiarm zand. Uit tabel 4.6. komt naar voren dat de verschillende monsters bodemkundig goed met elkaar overeenkomen. Het lutumgehalte varieert tussen 3,0 en 4,4 gew. % en het gehalte organische stof tussen < 1,0 en 2,4 gew. %. Monster 2 heeft wel een wat lagere pH dan de andere monsters.

Tabel 4.6. Karakteristieken van de met olie verontreinigde grond. De fractie < 2 μm is uitgedrukt als het percentage van de totale fractie 0-2000 μm

	olie 1	olie 2	olie 3	olie 4
pH-H ₂ O	6,8	5,2	6,2	6,8
pH-KCl	5,6	4,6	5,3	6,3
WHC (%)	21	23	23	22
organische stof (%)	< 1,0	2,4	< 1,0	< 1,0
fractie < 2 μm (%)	4,4	3,4	3,6	3,0

verontreiniging

In het meest vervuilde monster (olie 4) was zintuiglijk een duidelijke dieselgeur waarneembaar. In het monster olie 2 werd een lichte dieselgeur waargenomen.

De oliegehalten van de vier monsters zijn opgenomen in tabel 4.7. Het controlemonster (monster 1) is niet verontreinigd. Monster 4 bevat een totaalgehalte aan minerale olie van 370 mg/kg ds. In monster 2 werd, ondanks de lichte dieselgeur, geen olie aangetroffen in gehalten boven de detectiegrens. In het uit monster 2 en monster 4 samengestelde mengmonster (monster 3) werd een oliegehalte gemeten van 53 mg/kg ds. De olieverontreiniging bestaat voor het grootste deel uit de fractie C12-C22.

Tabel 4.7. Totaal oliegehalte en gehalte van de verschillende oliefracties (in mg/kg DW) in de olieverontreinigde gronden

	olie 1	olie 2	olie 3	olie 4
minerale olie C10-C40	< 50	< 50	53	370
fractie C10-C12	< 20	< 20	< 20	24
fractie C12-C22	< 20	< 20	53	250
fractie C22-C30	< 20	< 20	< 20	54
fractie C30-C40	< 20	< 20	< 20	44

Gerelateerd aan het toetsingskader voor verontreinigde grond is de grond slechts licht verontreinigd met olie. De gehalten liggen ruim onder de interventiewaarde. De vervuilde monsters olie 2, 3 en 4 hebben een oliegehalte van resp. < 0,05, 0,05 en 0,37 x de interventiewaarde I. De streefwaarde wordt in twee van de drie monsters wel overschreden. De monsters olie 3 en 4 overschrijden de streefwaarde met een factor 5 resp. 37.

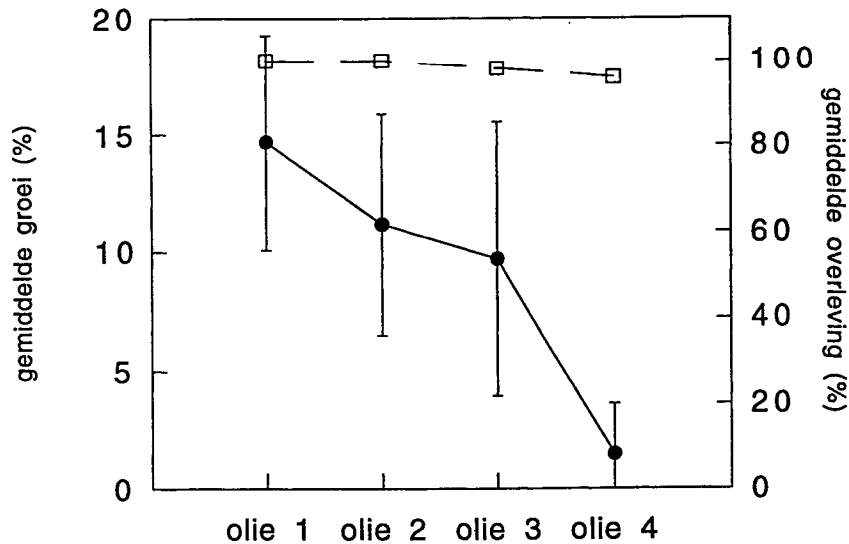
4.2.2. Bio-assay met *Eisenia fetida* overleving

Tijdens de test was er geen verschil te zien in de activiteit van de regenwormen in de verschillende monsters. Regelmatig bijvoeren was op alle monsters noodzakelijk. De hoeveelheid olie in de monsters heeft geen invloed op de overleving van *Eisenia fetida*. Op een enkeling na hebben alle regenwormen de test overleefd (zie figuur 4.7.).

groei

De groei van *Eisenia fetida* wordt wel beïnvloed door olie. Figuur 4.7. laat een duidelijke afname zien van de groei naarmate de olieconcentratie in de grond hoger wordt, maar alleen de groei van de regenwormen in monster olie 4 (0,37 x interventiewaarde I) is significant lager (t-test, $p < 0,018$).

In geen van de monsters zijn cocons aangetroffen. De zuurgraad is nauwelijks veranderd. Alleen de pH-KCl in het monster olie 1 is met 0,7 eenheden gestegen gedurende de bio-assay.



Figuur 4.7. Overleving (open vierkantjes) en groei (gesloten rondjes) in procenten van *Eisenia fetida* op met olie verontreinigde grond. Waarden zijn gemiddelden (n=5) \pm SD

4.2.3. Bio-assay met *Folsomia candida* overleving

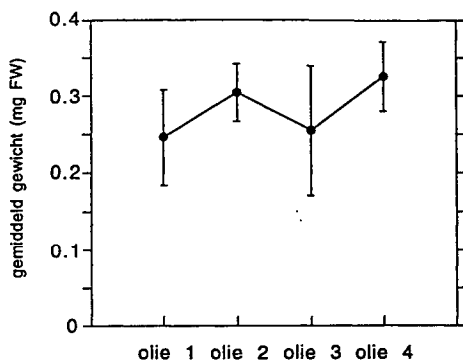
De overleving is met gemiddeld 40 procent laag, maar er is geen significante afname in overleving te zien bij toenemende verontreiniging.

groei

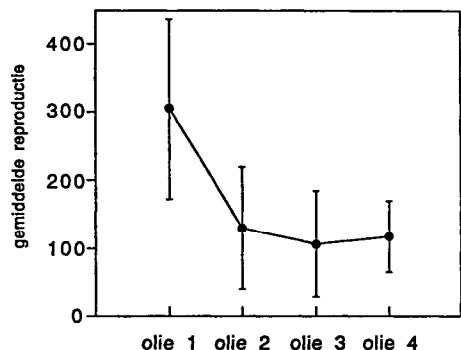
De groei van *Folsomia candida* wordt niet beïnvloed door de vervuiling met olie (zie figuur 4.8.). Het gemiddelde eindgewicht bij de vier gronden is vergelijkbaar.

reproductie

Uit figuur 4.9. blijkt dat de reproductie van de springstaarten bij een toenemende concentratie aan olie snel afneemt en vervolgens niet meer verandert. Reproductie op de schoonste grond is significant hoger dan bij de drie vervuilde gronden (t-test, $p < 0,005$). Een lichte olieverontreiniging (even boven de streefwaarde) lijkt al effect te hebben op de reproductie. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat zowel het aantal juvenielen als de overleving een grote spreiding in waarden vertoonden.



Figuur 4.8.
Eindgewichten (mg FW) van *Folsomia candida* na afloop van de bio-assay op met olie verontreinigde grond.
Waarden zijn gemiddelden ($n=10$) \pm SD



Figuur 4.9.
Gemiddelde reproductie van *Folsomia candida* op met olie verontreinigde grond.
Waarden zijn gemiddelden ($7 \leq n \leq 10$) \pm SD

4.2.4. Micro-organismen

De testen met de micro-organismen (en de nematoden) zijn uitgevoerd met de drie oorspronkelijke monsters olie 1, 2 en 4 en niet met het samengestelde mengmonster olie 3.

In het meest verontreinigde monster olie 4 ($0,37 \times l$) wezen de thymidine- en leucine-inbouw op een groeisnelheid die minstens tweemaal zo hoog was als in de niet verontreinigde controle grond (monster 1) (zie figuur 4.10.). In de bijna schone grond (monster 2, oliegehalte $< 0,05 \times l$), waarin de biologische reiniging op zijn eind loopt, was de bacteriële groeisnelheid weer gelijk aan die in de schone grond.

Het aantal bacteriën en het gemiddelde celvolume waren in de bijna schone grond na 8 weken reiniging (monster 2) nog steeds significant hoger dan in de schone grond (zie figuur 4.11.). De uit het aantal en het celvolume berekende bacteriële biomassa was in de beide met olie verontreinigde gronden minstens 5 keer zo groot als in de schone controle-grond (bovenste deel figuur 4.12.).

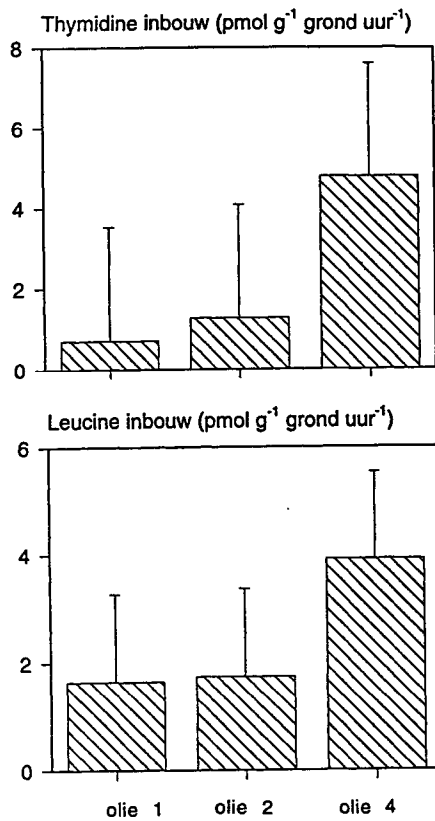
Geconcludeerd kan worden dat de dieselolie, die door de bacteriën wordt afgebroken, zoals verwacht, geen toxisch maar een stimulerend effect heeft op de micro-organismen.

4.2.5. Nematoden

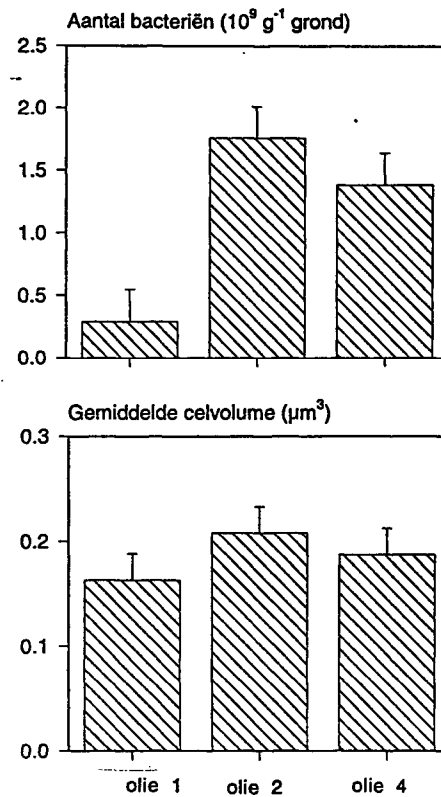
Evenals de microflora is ook het totale aantal nematoden in de meest met olie verontreinigde grond sterk verhoogd (met een factor 4). In de bijna schone grond na 8 weken reiniging (monster 2, zie figuur 4.12. onderaan) was het aantal nematoden weer wat afgenomen, maar nog wel hoger dan in de schone grond van monster 1.

De nematodenpopulatie in de verontreinigde grond bestond grotendeels (66 - 84%) uit snelgroeiende bacterivoren, voornamelijk *Rhabditidae* (zie tabel 4.5.), waarvan het aantal de groeisnelheid van de bacteriën (hun voedsel) lijkt te weerspiegelen.

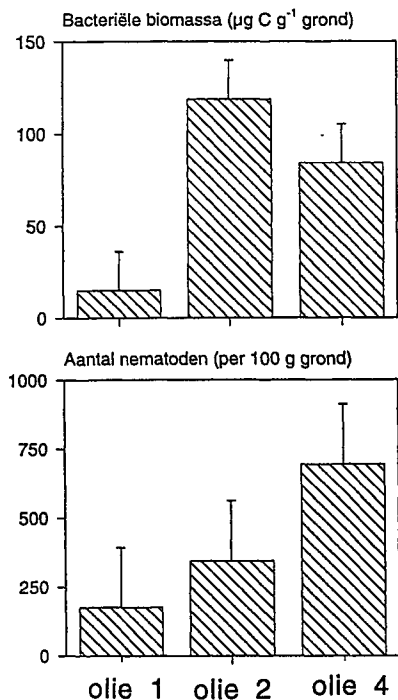
Het aantal taxa in de verontreinigde grond (circa 10) was veel hoger dan in de schone controle grond (circa 4). In de schone grond werd de aantal- en soortenarme nematodenfauna volledig gedomineerd door fungivore *Aphelenchoides*. Dit wijst erop dat de microflora hier niet door bacteriën werd gedomineerd. De verschuiving naar een snelle door bacteriën gedomineerde microbiële levensgemeenschap in de met olie verontreinigde grond ging gepaard met een daling van de Maturity Index van 2.12 naar 1.31.



Figuur 4.10. Thymidine- en leucine-inbouw in bacteriën, als maat voor de bacteriële groeisnelheid, in met minerale olie verontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de 'Least Significant Difference' bij $p=0.05$ ($LSD_{0.05}$)



Figuur 4.11. Het aantal bacteriën en het gemiddelde volume per cel in met minerale olie verontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de $LSD_{0.05}$



Figuur 4.12. De bacteriële biomassa en het totale aantal nematoden in met minerale olie verontreinigde gronden. De foutenbalken tonen de $LSD_{0.05}$

4.3. Bio-assays met baggerspecie

4.3.1. Bodemkundige samenstelling en verontreiniging monsters bodemkundige samenstelling

De bodemkundige gegevens van de slibmonsters zijn opgenomen in tabel 4.8. Bodemkundig gezien bleken de slibmonsters niet helemaal vergelijkbaar te zijn.

Tabel 4.8. Karakteristieken van de verontreinigde baggerspecie. De fractie < 2 μm is uitgedrukt als het percentage van de totale fractie 0-2000 μm . De pH-CaCl₂ is door Biochem Laboratorium BV gemeten volgens NEN 5750

	bagger 1	bagger 2	bagger 3	bagger 4	bagger 5
pH-H ₂ O	8,0	7,7	7,6	8,1	7,9
pH-CaCl ₂	7,9	7,5	8,3	8,0	7,8
WHC (%)	56	50	82	37	53
organische stof (%)	3,2	2,4	5,4	1,3	2,8
fractie < 2 μm (%)	26	9,4	25	4,0	11

De monsters bagger 3 en 1 zijn relatief kleiig (25 en 26 gew. % lutum) en bevatten het meeste organische stof (5,4 en 3,2 gew. %). Deze monsters kunnen worden gekwalificeerd als matig humeuze lichte klei. De monsters bagger 2, 4 en 5 hebben kleigehaltes van respectievelijk 9,4, 4,0 en 11,0 gew. % en organische-stofgehalten van 2,4, 1,3 en 2,8 gew. %. Deze monsters kunnen worden gekwalificeerd als matig humusarme zeer lichte zavel. De Water Holding Capacity (WHC) van de monsters varieert ook sterk. Met name het kleiige monster 3 heeft een hoge WHC. De zuurgraad is in alle monsters hoog. Mogelijk houdt dit verband met de in de monsters aanwezige schelpen.

Voordat de bio-assays met regenwormen en springstaarten konden worden ingezet, moest de natte en anaërobe baggerspecie eerst worden gedroogd en daarna herbevochtigd. Tijdens het drogen van de bagger zijn er veel kluiten ontstaan. Deze zijn verkruid tot een handelbaar medium. Door de hoge WHC moest monster bagger 3 (voor de bio-assays met de regenwormen en de springstaarten) tot 40 procent water worden aangevuld, wat de grond tot een kleiige en kluitige substantie maakte die een ongeschikt medium leek voor de wormen.

In algemene zin dient ten aanzien van de bodemkundige eigenschappen van de baggerspecie te worden opgemerkt, dat deze niet optimaal zijn voor de uitvoering van bio-assays met terrestrische organismen. De keuze voor de terrestrische bio-assays was echter ingegeven vanuit de wens om na te gaan wat de ecologische risico's zijn bij toepassing van baggerspecie op het land.

verontreiniging

De volledige resultaten van de chemische analyses van de baggermonsters zijn opgenomen in bijlage II.

In tabel 4.9. zijn de analyseresultaten samengevat en getoetst aan de vervuilingklassen volgens Waterbodernormstelling regeringsbeslissing ENW.

Monster bagger 5 bevat het hoogste PAK-gehalte (som 10 PAK VROM = 5,0 mg/kg ds = net klasse 3) en bevat ook een licht verhoogd gehalte aan minerale olie (190 mg/kg ds = klasse 1) en cadmium (0,7 mg/kg ds = klasse 1). De monsters bagger 2, 3 en 4 zijn alle drie klasse 2 verontreinigd met PAK (som 10 PAK VROM resp. 0,6, 0,7 en 1,4 mg/kg ds) en bevatten, met uitzondering van het oliegehalte in monster bagger 3 (96 mg/kg ds = klasse 1), geen noemenswaardig verhoogde gehalten aan andere stoffen. Monster bagger 1 is helemaal 'schoon' (klasse 0).

Tabel 4.9. Gehalten aan verontreinigingen (mg/kg DW) en klasse-indeling van de baggerspecie-monsters

	bagger 1	bagger 2	bagger 3	bagger 4	bagger 5
totaal PAK (som 10 VROM)	< 0,2	0,6	0,7	1,4	5,0
totaal PAK (16 EPA)	< 0,3	1,0	1,0	2,1	7,3
verontreinigingsklasse	0	2	2	2	3
overige verontreinigingen					
- minerale olie	< 50	< 50	96*	< 50	190*
- cadmium	0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,7*
* gehalten nevenverontreinigingen vallen in klasse 1					

4.3.2. Bio-assay met *Eisenia fetida* overleving

In de meest vervuilde baggerspecie (bagger 5, totaalgehalte PAK (10 VROM) van 5,0 mg/kg ds = klasse 3 (en minerale olie en cadmiumgehalten in klasse 1)) zijn alle regenwormen doodgegaan tijdens de test. Na een week lagen de dode wormen aan de oppervlakte.

In de vier andere minder vervuilde baggerspecies waren vrijwel alle wormen nog in leven (zie figuur 4.13.). Gedurende de test hadden de wormen in het kleiige monster bagger 3 nauwelijks nieuwe gangen gegraven. De dieren hielden zich op tussen de kluiten of zaten in de enkele gangen die de dieren in de kleibrokken hadden gemaakt. Desalniettemin hadden alle wormen dit toch onaantrekkelijke medium overleefd.

groei

In de baggerspeciemonsters 1, 2, 3 en 4 wordt geen significant verschil in groei gevonden (zie figuur 4.13.). De groei van de wormen neemt niet af bij een toenemende PAK-concentratie binnen het concentratietraject klasse 0 - 2. De groei in de schone baggerspecie (bagger 1) is zelfs lager dan in de andere monsters. Mogelijk hangt dit samen met het zeer kleiige karakter van deze specie.

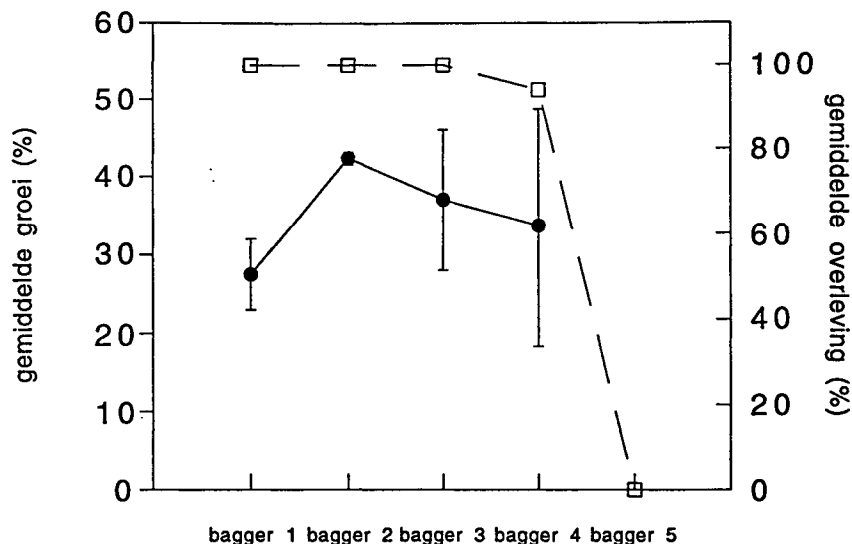
Er zijn in totaal slechts twee cocons aangetroffen, allebei in monster bagger 2. De pH-H₂O is tijdens de test niet veranderd.

interne PAK-concentraties

Tabel 4.10. toont de gemeten PAK-gehalten in de wormen na afloop van de bio-assays op de verontreinigde baggerspecie. In geen van de gevallen kan geconcludeerd worden dat de interne concentraties van de individuele PAK-verbindingen de externe concentraties volgen, ook niet wanneer de externe concentraties worden gecorrigeerd voor het gehalte aan organisch stof. De interne concentratie aan PAK-totaal loopt in grote lijnen wel op met de externe concentratie.

Tabel 4.10. PAK-concentraties (in µg/kg DW) in *Eisenia fetida* blootgesteld aan vervuilde baggerspecie. Waarden zijn gemiddelden van twee replica's gepaard met de helft van het verschil tussen de beide metingen

	bagger 1	bagger 2	bagger 3	bagger 4
fenantreen	99,5 ± 33,5	64,6 ± 2,98	96,9 ± 3,63	84,7 ± 5,91
fluoranteen	210 ± 11,7	132 ± 2,35	234 ± 1,21	74,2 ± 74,2
pyreen	107 ± 107	87,1 ± 87,1	268 ± 14,5	181 ± 9,66
benzo(a)antracene	0	66,3 ± 1,97	0	86,6 ± 5,98
chryseen	0	88,7 ± 2,04	0	147 ± 21,0
benzo(b)fluoranteen	0	0	0	0
totaal	416 ± 122	438 ± 96	599 ± 19	574 ± 117



Figuur 4.13. Overleving (open vierkantjes) en groei (gesloten rondjes) in procenten van *Eisenia fetida* op verontreinigde baggerspecie. Waarden zijn gemiddelden (n=4) \pm SD

4.3.3. Bio-assay met *Folsomia candida* overleving

De overleving wordt niet beïnvloed door de vervuiling in de baggerspecie, maar is gemiddeld (\pm SD) met $37 \pm 8,2$ procent erg laag.

groei

Alleen bagger uit klasse 3 (bagger 5) heeft invloed op de groei van *Folsomia candida*. Het eindgewicht in dit monster is significant lager (zie figuur 4.14.). In de andere vier baggerspecies is het eindgewicht van de springstaarten vergelijkbaar.

reproductie

De reproductie is gevoelig voor de mate van vervuiling (zie figuur 4.15.). Het aantal juvenielen op de meest vervuilde bagger (bagger 5) is nihil. In de drie klasse 2 monsters (bagger 2, 3 en 4) worden vergelijkbare aantallen juvenielen gevonden. Het schone klasse 0 monster (bagger 1) vertoont een lagere reproductie dan de klasse 2 monsters. Mogelijk hangt dit samen met het zeer kleiige karakter van dit monster.

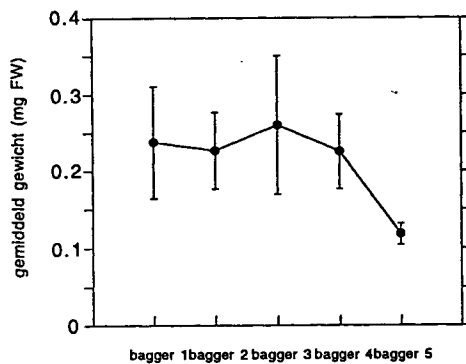
De pH-H₂O is gemiddeld met 0,2 eenheden gestegen. Er was sprake van een pH-H₂O daling met 0,5 eenheid in monster bagger 1 en een stijging van 0,6 eenheden in monster bagger 4.

4.3.4. Micro-organismen

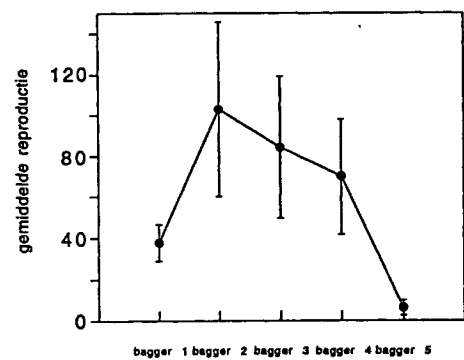
De natte en anaërobe baggerspecie werd voor de testen met de micro-organismen eerst uitgespreid en aan de lucht gedroogd. Daarna werden de monsters gezeefd (4 mm maaswijdte) en bevochtigd tot 50% van het waterhoudend vermogen. Hierdoor ontstond een aërobe veldvochtige grond. Na 5 weken incuberen bij 15°C werden de microbiële biomassa en groeisnelheid gemeten. Door het drogen veranderde de microbiële populatie drastisch van samenstelling. Dit zal ook het geval zijn als slib op het land wordt gedeponeerd. In feite wordt in deze situatie (na het op de kant zetten) de potentie tot activiteiten gemeten.

In de gedroogde en herbevochtigde baggerspecie was de bacteriële groeisnelheid het laagst in het meest met PAK verontreinigde monster (zie figuur 4.16.). In de klasse 3 baggerspecie (bagger 5) waren de thymidine en de leucine inbouw respectievelijk 80% en 50% lager dan in de schone controle (klasse 0). In de drie klasse 2 baggerspecies vertoonde de groeisnelheid wel een afname bij toenemend PAK-gehalte, maar was de groeisnelheid niet veel lager dan in de controle.

De bacteriële biomassa varieerde van 90 tot 150 mg C/kg grond en vertoonde geen verband met de mate van verontreiniging.



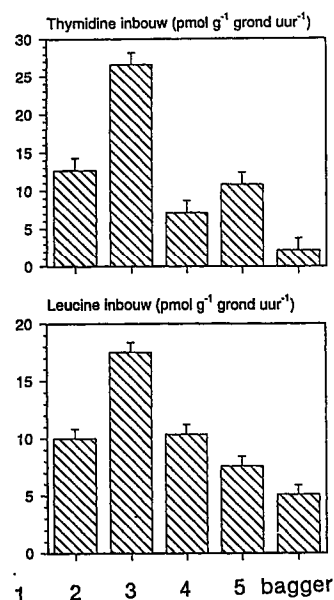
Figuur 4.14. Eindgewichten (mg FW) van *Folsomia candida* na afloop van de bio-assay op verontreinigde baggerspecie. Waarden zijn gemiddelden ($n = 8$) \pm SD



Figuur 4.15. Gemiddelde reproductie van *Folsomia candida* op verontreinigde baggerspecie. Waarden zijn gemiddelden ($7 \leq n \leq 8$) \pm SD

4.3.5. Nematoden

Omdat in de natte anaërobe baggerspecie nauwelijks nematoden voorkwamen zijn hieraan geen metingen verricht.



Figuur 4.16. Thymidine- en leucine-inbouw in bacteriën, als maat voor de bacteriële groeisnelheid, in verontreinigde baggerspecie. De bagger werd voor de meting gedroogd, bevochtigd tot 50% van het waterhoudend vermogen en 5 weken geïncubeerd. De foutenbalken tonen de $LSD_{0,05}$

5. DISCUSSIE

5.1. Bio-assays op metaalverontreinigde grond

Eisenia fetida en *Folsomia candida* lijken in de met metaal verontreinigde grond minder gevoelig te zijn dan de micro-organismen en nematoden. Overleving blijkt voor beide soorten geen goede parameter te zijn, omdat deze niet afneemt bij toenemende vervuiling. Ook groei reageerde niet gevoelig. Bij *Eisenia fetida* trad pas significante groeivermindering op bij concentraties chroom en nikkel die respectievelijk met 6 en 11 keer de interventiewaarde overschrijden. De groeivermindering op monster metaal 2 was niet significant lager, maar ook op deze grond worden de interventiewaarden voor chroom en nikkel wel overschreden.

In toxiciteitsexperimenten met chroom en nikkel worden over het algemeen al effecten op de overleving en reproductie van regenwormen gevonden bij veel lagere concentraties dan in de hier onderzochte met metaal verontreinigde gronden. Zo vonden Van Gestel et al. (1993) al een remming van de reproductie van *Eisenia andrei* bij 100 mg Cr/kg DW in een kunstgrond. Ma (1982a, b) vond een No-Observed-Effect-Concentratie (NOEC) voor het effect van nikkel op *Lumbricus rubellus* van 50-85 mg Ni/kg DW in een natuurlijke grond, en Neuhauser et al. (1985) rapporteren een LC₅₀ voor *Eisenia fetida* van 757 mg Ni/kg DW in een kunstgrond. Deze resultaten maken aannemelijk dat de biologische beschikbaarheid van chroom en nikkel in de met metaal verontreinigde grond veel lager is dan in de in het laboratorium (kunstmatig) vervuilde gronden. Ook de vorm waarin het metaal in de verontreinigde bodems aanwezig is, zal waarschijnlijk sterk verschillen van de goed oplosbare vorm die doorgaans in laboratoriumtoetsen wordt toegepast.

Toenemende chroom- en nikkelconcentraties in de grond leiden tot toenemende wateroplosbare en CaCl₂-uitwisselbare concentraties en tot hogere concentraties in de regenwormen. Deze interne referentie-gehalten zijn niet gerelateerd aan effecten. Er zijn door Van Gestel et al. (1992) bio-assays uitgevoerd op een flink aantal (19) relatief onbelaste gronden uit natuurgebieden. De daarna gemeten range aan metaalgehalten in regenwormen kunnen worden beschouwd als 'normaal'. Om een relatie met effecten te leggen is veel meer onderzoek vereist. De interne concentraties chroom en nikkel in *Eisenia fetida* op de monsters metaal 2 en 3 overschrijden de door van Gestel et al. (1992a) opgestelde referentiewaarden voor metaalgehalten in wormen op schone gronden (tabel 5.1.). Interne metaalconcentraties lijken dus gevoeliger te reageren dan de parameters overleving en groei.

Tabel 5.1. Referentiewaarden voor interne concentraties zware metalen (mg/kg DW) in *Eisenia fetida*, na 4 weken blootstelling aan grond uit relatief schone natuurgebieden. Naar van Gestel et al. (1992a)

element	referentiewaarde	element	referentiewaarde
As	0,65 - 8,7	Mo	3,7
Ba	1,2 - 12	Na	4400 - 6040
Ca	4393 - 8100	Ni	0,18 - 3,0
Cd	0,03 - 10,3	Pb	0,27 - 62
Co	1,0 - 7,7	Sb	0,009 - 0,52
Cr	0,17 - 3,3	Se	0,5 - 1,4
Cu	3,4 - 17	Sn	0,55 - 2,3
Hg	0,05 - 0,07	V	1,8
K	11400 - 13550	Zn	88 - 149
Mg	798 - 2900		

Voor *Folsomia candida* wordt de overleving niet beïnvloed door de vervuiling met chroom en nikkel en is ook hier de minst gevoelige parameter. Groei lijkt ook niet zo gevoelig te zijn, omdat dit pas bij een zeer hoge mate van vervuiling (metaal 4) significant lager is dan op de schoonste grond. *Folsomia candida* is ongevoeliger voor vervuiling met chroom en nikkel dan *Eisenia fetida*. Reproductie, die over het algemeen als de gevoeligste parameter wordt beschouwd (Smit, 1997; Van Gestel, 1991), geeft alleen op de sterkst vervuilde grond (metaal 4) een effect te zien. De spreiding in de aantallen juvenielen is zeer groot, zodat er

geen sprake is van een significant effect op de reproductie. In de literatuur zijn geen gegevens gevonden over de toxiciteit van nikkel of chroom voor springstaarten.

De activiteit van de micro-organismen, gemeten als de inbouw van thymidine en leucine) is sterk geremd op beide metaalverontreinigde gronden (metaal 3 en 4). De bacteriële biomassa is vooral sterk verlaagd op de grond die het sterkst is vervuild met nikkel (metaal 4). Effecten van chroom en nikkel op micro-organismen zijn door verschillende onderzoekers beschreven. Het meest gevoelig lijken de inbouw van thymidine en het patroon van de zogenaamde 'Phospholipid Fatty Acids' (FPLA) te zijn: Frostegård et al. (1993) en Diaz-Ravina et al. (1994) vinden een effect op deze parameters bij nikkelgehalten van 60-90 mg/kg DW. Deze gehalten liggen veel lager dan de concentraties in de onderzochte met metaal verontreinigde gronden. Ook in dit geval kan echter een deel van het verschil in gevoeligheid verklaard worden door een verschil in biologische beschikbaarheid, want ook deze auteurs voegden een goed oplosbaar nikkel-zout toe aan de grond in hun laboratorium-toetsen.

Het aantal nematoden vertoont alleen op de meest verontreinigde grond (metaal 4) een verlaging ten opzichte van het relatief onbelaste monster (metaal 1). Dit lijkt erop te duiden dat voor de nematoden nikkel toxischer is dan chroom. Er zijn echter geen gegevens beschikbaar over de toxiciteit van beide metalen voor nematoden. In een studie van Bardgett et al. (1994) werd een afname van het aantal nematoden en van de microbiële activiteit gevonden in met metaal verontreinigde gronden. Deze afname correleerde met het gehalte aan chroom en bij chroomgehalten boven 500-800 mg/kg DW werden effecten waargenomen. Deze effecten kunnen echter ook worden veroorzaakt door de aanwezigheid van verhoogde gehalten aan koper en arseen in deze gronden.

Concluderend kan worden gesteld dat alle bio-assays een effect laten zien van de metaalbelasting. De effecten zijn steeds het sterkst op de meest vervuilde grond (metaal 4), hetgeen erop duidt dat de effecten vooral worden veroorzaakt door nikkel. Omdat er geen sprake is van een eenduidige gradiënt met slechts één metaal, kan hierover echter geen harde conclusie worden getrokken. Hoewel slechts een beperkte gradiënt is onderzocht, duiden de bio-assays erop dat er sprake is van een ecologisch risico op de met metaal belaste gronden (metaal 3 en 4). Het later aangemaakte tussen-monster (metaal 2) laat geen effecten zien, terwijl de totaalgehalten aan nikkel en chroom toch de interventiewaarde overschrijden.

5.2. Bio-assays op met olie verontreinigde grond

De bio-assay met *Eisenia fetida* lijkt minder gevoelig te zijn voor olievervuiling. Alleen de groei op het meest vervuilde oliemonster verschilt significant van de andere monsters, maar de olieconcentratie is hier zeven keer zo hoog als in monster olie 3. Er is geen informatie bekend over de toxiciteit van olie voor regenwormen.

Folsomia candida reageert gevoeliger op olievervuiling dan *Eisenia fetida*. Overleving wordt niet beïnvloed door de hoeveelheid olie. Hetzelfde geldt voor het eindgewicht, maar dat zou veroorzaakt kunnen worden door de verhoogde biomassa van bacteriën in de meest vervuilde monsters. Waarschijnlijk was er meer voedsel beschikbaar voor de regenwormen en springstaarten. Ook het aantal nematoden is sterk verhoogd in deze monsters. Recent is aangetoond dat *Folsomia candida* zich ook kan voeden met nematoden (Lee en Widden, 1996). Mogelijk is de toename van het voedselaanbod ervoor verantwoordelijk dat de groei niet is afgenomen in de meest vervuilde monsters. De reproductie lijkt wel gevoelig te zijn voor olie. In het monster olie 2 is de reproductie al significant lager, terwijl de olieconcentratie nog beneden de detectiegrens ligt. De biomassa aan bacteriën is in dit monster echter ook nog verhoogd, de activiteit gemeten als thymidine- of leucine-inbouw echter niet. Het verder stabiel blijven van reproductie bij toenemende vervuiling kan worden verklaard door het toenemende voedselaanbod, maar ook kan ten gevolge van de toenemende bacteriële activiteit de olie-concentratie tijdens de bio-assay gedaald zijn.

Door Van den Munckhof en Veul (1994) werd in een bio-assay op met olie vervuilde grond gevonden dat de overleving en reproductie van *Folsomia candida* toenamen bij afnemende vervuiling. Het aantal juvenielen bij de hoogste concentratie olie in dit experiment was vergelijkbaar met de reproductie bij dezelfde concentratie in het onderzoek van deze auteurs.

De activiteit van micro-organismen is alleen verhoogd op de meest vervuilde grond (olie 4), terwijl de biomassa ook in het monster olie 2 nog verhoogd is. Dit duidt erop dat de dieselolie, die als voedingsbron dient voor de bacteriën, een overwegend stimulerend in plaats van een toxisch effect heeft op de micro-organismen. Dit komt overeen met de in de literatuur beschreven toename in microbiële activiteit en afname van in de Microtox-test gemeten effecten bij voortschrijdende afbraak van olie (Ahlf et al., 1993; Eiserman & Daei, 1993; Remde & Hund, 1994). In deze artikelen is echter sprake van veel hogere oliegehalten dan in de hier onderzochte monsters.

De nematodenpopulatie lijkt van de toename aan microbiële biomassa te profiteren, en vertoont eveneens een toename op de met olie vervuilde gronden. De Maturity Index (MTI) was echter lager in het meest vervuilde monster (olie 4), hetgeen lijkt te corresponderen met een daling van de MTI voor mariene nematodenpopulaties na de olieramp met de Amoco Cadiz in 1978 (Bongers et al., 1991).

Concluderend kan worden gesteld dat in alle bio-assays een effect wordt gevonden van de olie-vervuiling. Vreemd is dat er ook nog sprake is van een effect op de springstaarten in grond die uit de reiniging komt, en geen detecteerbare hoeveelheden olie meer bevat. Het is dus de vraag of hier sprake is van een direct toxisch effect van de olie, of dat de verandering in microbiële biomassa een negatief effect heeft op de springstaarten. Ook is niet uit te sluiten dat andere factoren, zoals verschillen in bodemeigenschappen en -textuur, een rol hebben gespeeld.

5.3. Bio-assays op verontreinigde baggerspecie

Alleen de baggerspecie van klasse 3 (monster bagger 5) geeft een significante vermindering van de groei van *Eisenia fetida*. De baggerspecie is voornamelijk vervuild met PAK's. De verminderde groei van *Eisenia fetida* en de verminderde reproductie van *Folsomia candida* in het schoonste monster (bagger 1), maar ook in de andere monsters, kunnen niet volledig worden toegeschreven aan de PAK-vervuiling. Het PAK-gehalte in de baggermonsters was niet hoger dan 7.3 mg/kg (bagger 5). Deze waarde ligt nog onder de interventiewaarde voor PAK. Door Bowmer et al. (1993) en Posthuma et al. (1996) worden pas bij veel hogere concentraties effecten op springstaarten en regenwormen gevonden. Hund en Traunspurger (1994) vonden dat de toxiciteit voor regenwormen van een met PAK vervuilde bodem sterk afnam wanneer de 3- en 4-ring PAK's waren afgebroken; op dat moment bedroeg het totale gehalte aan PAK echter nog zo'n 1000 mg/kg DW. Verder is door Alexander (1995) en Hatzinger en Alexander (1995) aangetoond dat bij toename van de verblijftijd van PAK's in de bodem, de biologische beschikbaarheid afneemt. Ook dit kan verklaren waarom geen effecten van PAK's worden waargenomen in veldmonsters. Mogelijk dragen ook de aanwezige metalen bij aan de toxiciteit van de bagger. De gehalten zijn echter te laag om directe effecten van metalen op de toetsorganismen te verwachten. Over de mogelijke combinatie-effecten van PAK's en metalen is niets bekend.

Tenslotte is niet uit te sluiten dat tijdens de incubatie van de bagger omzetting van PAK is opgetreden, waarbij potentieel meer toxische metabolieten zijn ontstaan.

De interne concentraties aan PAK in de regenwormen verschillen niet significant voor de verschillende monsters, en geven dus geen verdere indicatie over het mogelijke risico van de PAK's in de baggerspecie.

De activiteit van de micro-organismen vertoont eveneens een verlaging bij monster bagger 1 ten opzichte van het tweede monster en is ook verlaagd bij de vuilere monsters. Waarschijnlijk spelen hier dezelfde factoren een rol als genoemd voor de regenwormen en springstaar-

ten. Hund en Traunspurger (1994) vonden een toename van de nitrificatie in een met PAK vervuilde grond (5000 mg/kg DW) nadat de 3- en 4-ring PAK's waren afgebroken en er nog ca. 1000 mg PAK/kg DW aanwezig was in de bodem.

Concluderend kan worden gesteld, dat de fysisch-chemische eigenschappen van de onderzochte baggermonsters nogal sterk verschillen en daardoor een goede interpretatie van de bio-assay-respons in de weg staan. Het meest vervuilde bagger-monster (bagger 5) is duidelijk het meest toxisch, maar onduidelijk blijft of het gemeten effect een direct gevolg is van de vervuilende stoffen of een indirect gevolg van de minder gunstige abiotische omstandigheden in dit monster. Het zou beter geweest zijn om de geschiktheid van de bio-assays met bodemdieren te toetsen op enigszins op de 'walkant' gerijpte baggerspecie.

5.4. Keuze van een referentie in bio-assays

Wil men gebruik maken van bio-assays ter bepaling van de toxiciteit van verontreinigde gronden, dan is een goede referentie een noodzaak. De ideale referentie is een grond die precies hetzelfde is als de grond die getest moet worden, maar onbelast door verontreinigende stoffen. Wanneer referentiegrond en testgrond qua organisch gehalte, lutumgehalte, pH, textuur, nutriënten-beschikbaarheid en dergelijke precies gelijk zijn, dan is het verschil tussen de toetsresultaten een gevolg van de vervuiling en niet van andere stressfactoren. Het meenemen van een tweede referentie, in de vorm van een voor het organisme zo optimaal mogelijk medium, kan uitsluitel geven over stress in de te meten gronden. Wanneer de organismen het op deze referentie significant beter doen dan op de schoonste grond is er sprake van stress. Een dergelijke tweede referentie kan uiteraard niet worden toegepast in bio-assays waarin wordt gewerkt met in de bodem aanwezige organismen, zoals micro-organismen en nematoden.

In het onderzoek aan de bio-assays met regenwormen en springstaarten is naast een relatief schone grond uit de gradiënt als extra referentiegrond LUFA grond 2.2 meegenomen. Deze grond is schoon en wordt op de Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van de VU vaak gebruikt voor oecotoxicologisch onderzoek. Echter zowel de regenwormen als de springstaarten deden het niet goed op deze grond (resultaten niet getoond). De LUFA grond was niet optimaal voor de overleving van *Folsomia candida*. En bij de wormen traden een verminderde groei en reproductie op. LUFA grond is dus minder geschikt als referentiegrond.

In dit onderzoek is als referentiegrond het schoonste monster uit de gradiënt gebruikt, respectievelijk de monsters metaal 1, olie 1 en bagger 1. Het schoonste baggermonster kent, vergeleken met de overige baggermonsters, een wat hoger gehalte aan zware metalen, maar ook de andere baggermonsters zijn onderling niet met elkaar vergelijkbaar door verschillen in pH, organische-stofgehalte en WHC. Het referentiemonster voor de olie vervuiling is genomen vlak naast de afgraving en is qua samenstelling vergelijkbaar met de overige oliemonsters. Dit monster kan als schoon verondersteld worden omdat er geen detecteerbaar oliegehalte in is aangetroffen. Omdat het terrein bij de galvaniseerfabriek is opgehoogd, kennen alle monsters daar een gelijke samenstelling. Hier is het schoonste monster goed bruikbaar als referentie.

Als alternatief zou in bio-assays met regenwormen en springstaarten de door de OECD (1984) voor toxiciteitstoetsen met regenwormen ontwikkelde kunstgrond gebruikt kunnen worden als tweede referentie. Deze kunstgrond, die inmiddels ook in de toets met springstaarten wordt gebruikt (ISO, 1994), wordt in het laboratorium samengesteld uit turf, kaolien-klei en zand en met behulp van calciumcarbonaat op de gewenste pH gebracht. Met een organisch stofgehalte van 10 procent, een lutumgehalte van 20 procent een pH van $6,0 \pm 0,5$ is deze grond voor zowel regenwormen als springstaarten een geschikt substraat. In vergelijking met de in dit onderzoek gebruikte gronden zijn met name de percentages organische stof en lutum te hoog. Het is echter mogelijk om de percentages organische stof en lutum, alsmede de pH aan te passen aan de gewenste omstandigheden (Crommentuijn et al., 1997; Spurgeon en Hopkin, 1996), maar dit is nog niet gedaan als referentie voor bio-assays op gronden uit het veld. Probleem is dat de microbiële activiteit en nematoden-

dichtheid van deze kunstgrond natuurlijk veel moeilijker zijn te standaardiseren, en de grond dus nooit geschikt kan zijn voor de bio-assays met micro-organismen en nematoden.

5.5. De gebruikte toetsorganismen regenwormen

Eisenia fetida lijkt goed te functioneren als toetsorganisme in de in dit onderzoek uitgevoerde bio-assays. Allereerst is *Eisenia fetida* door zijn grootte handelbaar en daardoor makkelijk schoon te wassen, te wegen en terug te vinden in de gronden na afloop van de bio-assay. Verder blijken de parameters overleving en groei onderscheidend te zijn. Overleving is duidelijk de minst gevoeligste parameter. Helaas bleek *Eisenia fetida* in dit onderzoek niet of nauwelijks tot reproductie te komen. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door de wat minder goede conditie van de dieren in de kweek. Andere oorzaken, die bijgedragen zouden kunnen hebben aan een lage reproductie zijn: een minder gunstige pH, een ongeschikte textuur en een te hoog of te laag vochtgehalte van de monsters. Deze factoren lijken vooral in de baggermonsters een rol te hebben gespeeld.

Naast de genoemde letale en subletale toetsparameters, zou de interne concentratie van verontreinigende stoffen gebruikt kunnen worden als parameter in bio-assays met regenwormen. De interne concentratie geeft een maat voor de biologische beschikbaarheid en bij een verhoging van het interne gehalte kunnen effecten niet uitgesloten worden. Op dit moment bestaat er alleen voor zware metalen enige ervaring met het gebruik van interne concentraties als parameter in bio-assays met *Eisenia fetida*. In tabel 4.11. zijn de door Van Gestel et al. (1992a) afgeleide referentie-waarden voor een aantal metalen in deze soort weergegeven. Voordeel van het gebruik van interne concentraties is, dat ze minder afhankelijk zijn van allerlei abiotische factoren die van invloed zijn op de groei en reproductie van de regenwormen. Overleving van de wormen moet uiteraard wel mogelijk zijn in de te onderzoeken monsters. Door het gebruik van interne concentraties als parameter kan het referentieprobleem mogelijk voor een deel worden opgelost.

Biomonitoring biedt in deze een sleutel op voorwaarde dat meer bekend wordt over interne effect-concentraties voor metalen, bij voorkeur in combinaties met andere verontreinigingen.

springstaarten

De overleving van de springstaarten bleek in de meeste bio-assays veel lager te zijn dan de minimale overleving van 80% die wordt vereist in de standaardtoets voor de bepaling van de toxiciteit van chemische stoffen (ISO, 1994). Een oorzaak voor de lage overleving is niet aan te geven, ook in ringonderzoeken die zijn uitgevoerd ter ontwikkeling van deze ISO-richtlijn was de overleving soms vrij laag, zonder dat dit grote effecten leek te hebben op de reproductie.

Vergeleken met literatuurgegevens, waar op onbehandelde OECD kunstgrond het aantal juvenielen van *Folsomia candida* vaak groter is dan 500 (zie bijv. Crommentuijn et al., 1993), zijn de aantallen juvenielen in dit onderzoek laag te noemen. Op schone, natuurlijke gronden is de reproductie veel lager (Van den Munckhof en Veul, 1994), wat overeenkomt met de resultaten van de hier uitgevoerde bio-assays met *Folsomia candida*. De aantallen juvenielen lagen wel steeds hoger dan de door de ISO (1994) gestelde norm van 100 dieren in onbelaste grond. Oorzaken voor een lage reproductie kunnen worden gezocht in het gehalte organische stof en pH. De bodemtextuur lijkt geen grote invloed te hebben op overleving en reproductie.

De springstaarten zijn vanwege hun grootte minder goed hanteerbaar dan regenwormen. Bovendien kost de praktische uitvoering van de bio-assay, met name het wegen van de dieren en het tellen van het aantal juvenielen, veel tijd. Toch is *Folsomia candida* een geschikt organisme voor gebruik in bio-assays. Met name groei en reproductie reageren op de vervuiling, waarbij reproductie de gevoeligste parameter is. Een nadeel is de grote variatie in het aantal juvenielen. Overleving is minder geschikt als parameter.

micro-organismen

De bio-assays met micro-organismen hebben als voordeel dat ze direct in de vervuilde grond kunnen worden uitgevoerd. De bio-assays geven een indicatie van zowel de aantallen als de conditie van de bodembacteriën, en lijken voldoende gevoelig te zijn. Het referentieprobleem speelt echter ook voor deze organismen.

nematoden

Zowel het aantal nematoden als de Maturity Index lijken geschikte parameters voor opname in bio-assays. Beide parameters hebben, evenals de microbiële parameters, het voordeel dat ze direct in de vervuilde gronden kunnen worden toegepast. Deze nematologische parameters hebben echter ook als nadeel, dat een goede referentie beschikbaar moet zijn, want ook het voorkomen en de samenstelling van de levensgemeenschap aan nematoden wordt voor een belangrijk deel bepaald door abiotische factoren.

5.6. Meerwaarde van bio-assays

De doelstelling van dit PGBO-project is het nagaan van de bruikbaarheid van een aantal reeds ontwikkelde terrestrische bio-assays voor de beoordeling van actuele ecologische risico's op locaties met bodemverontreiniging. De vraag is nu of de meetresultaten (zie hoofdstuk 4) zodanig zijn dat, aanvullend op de chemische analyseresultaten, sprake is van aanvullende informatie en toegevoegde waarde bij de beoordeling van de actuele ecologische risico's op de verontreinigde locaties. Dat is het onderwerp van deze paragraaf.

De aanvullende informatie uit de bio-assays is technisch bruikbaar als ze representatief, reproduceerbaar en interpreteerbaar is.

Ten aanzien van de **representativiteit** gaat het erom of de gebruikte toetsorganismen gezamenlijk een brede vertegenwoordiging vormen van een te beschermen ecosysteem of van de functionele ecologische processen in de bodem (Van Straalen en Denneman, 1989). In dit project is gestreefd naar toepassing van een zo breed mogelijke set aan bio-assays. Een volledig representatieve set was, binnen de gegeven financiële en praktische randvoorwaarden van het project, niet haalbaar. De gebruikte set aan toetsorganismen (regenwormen, springstaarten, nematoden en micro-organismen) vormde een redelijke vertegenwoordiging van de belangrijkste taxonomische groepen, ecologische functies en blootstellingsroutes in de bodem. Een belangrijke groep die ontbrak in de gebruikte set, waren de planten (primaire producenten).

Onder **reproduceerbaarheid** wordt verstaan dat bij herhaling van de toets of bij uitvoering in een ander laboratorium, dezelfde resultaten worden behaald. Dit aspect is niet te beoordelen op grond van de hier beschreven resultaten.

Ten aanzien van de **interpreteerbaarheid** is het, naast het feit dat de meetwaarden van de gemeten parameters niet te sterk mogen variëren, met name van belang dat de meetwaarden een duidelijke indicatie geven over de mate van ecologisch risico in een bepaald geval van bodemverontreiniging. In dit onderzoek is vooral nagegaan of er sprake was van een verband met de gemeten concentraties aan verontreinigingen in de grond. Dit lijkt bij alle uitgevoerde bio-assays het geval. Alle bio-assays laten een verband zien tussen de mate van verontreiniging en de gemeten parameters. Wanneer afwijkingen te zien zijn, is dat meestal wel toe te schrijven aan andere, abiotische factoren die ook van invloed zijn op het functioneren van de toetsorganismen. Dit is bijvoorbeeld het geval in het schone referentiemonster bij de baggerspecie (bagger 1), waarin het hoge kleigehalte ongunstig bleek te zijn voor de ontwikkeling van de gebruikte toetsorganismen. Een ander voorbeeld is de afname van reproductie van springstaarten bij toenemende olieconcentratie (paragraaf 4.2.3.). Een lichte olieverontreiniging heeft al effect op de reproductie. Interpretatie wordt bemoeilijkt door de grote spreiding in waarden.

5.7. Praktische toepasbaarheid van bio-assays

Waarom stimulering gebruik ecotesten?

Deze studie is in het kader van PGBO opgezet vanwege de behoefte aan een instrument voor de beoordeling van actuele ecologische risico's op locaties met bodemverontreiniging. Deze behoefte is met name pregnant geworden door de overgang van een saneringsbenadering (vanuit de optiek: 'NL-Gifvrij') naar een beheersmatige aanpak (leren leven met een erfenis). Of in vakjargon: van een potentiële risicobenadering naar een beoordeling op basis van actuele risico's (wat is er nu echt aan de hand !).

Een bio-assay of nog beter een testbatterij van bio-assays geeft inzicht in het functioneren van het bodemecosysteem in zijn geheel. Het is een systeemindicator voor de biologische beschikbaarheid van het complex van aanwezige verontreinigingen en geeft daardoor inzicht (getalsmatig en in beeldwaarde) in de actuele risico's. Per situatie zal steeds weer opnieuw gezocht moeten worden naar testorganismen die geschikt zijn voor toepassing onder de locatiespecifieke milieucondities. Met behulp van bio-assays kan het actuele risico inzichtelijk worden gemaakt en kan ook maatschappelijke zeggingskracht ontstaan door de beeldende waarde van bio-assays in aanvulling op chemische data. Schade aan organismen in de zin van groei, voortplanting of sterfte spreekt immers meer tot de verbeelding dan overschrijding van chemische normen.

Ter illustratie van deze behoefte zijn in het kader van deze PGBO-studie een aantal praktijkgevallen bestudeerd, namelijk bodemverontreiniging van een galvaniseerbedrijf met zware metalen (nikkel, chroom), een dieselolieverontreinigde locatie en een locatie met baggerspecie op de slootkant. Soortgelijk onderzoek is schaars in Nederland en eveneens in het buitenland. De vraag is of bio-assays meerwaarde hebben in het kader van de risicobeoordeling.

risicobeoordeling (1e en 2e lijn)

In het kader van de risicobeoordeling van bodemverontreiniging zijn chemische analyses aan te merken als een eerste lijnsinstrument. Chemische data bieden informatie over totaalgehalten aan stoffen in een bodem maar zeggen niets over de biologische beschikbaarheid. Een ontsluiting met koningswater van een bodemmonster zegt alleen iets over de extraheerbaarheid van zware metalen in die grondmatrix met een sterk zuur¹. Evenzo geldt dit voor organische microverontreinigingen die chemisch-analytisch wordt bepaald op basis van extractie met hexaan of aceton. Dergelijke middelen heeft een organisme niet tot zijn beschikking. Een chemische bepaling is een (zeer) indirecte maat voor de biologische beschikbaarheid.

Organismen nemen stoffen op via de waterfase. De verdeling van stoffen over grondmatrix, bodemvocht en bodemorganisme is complex. Evenwichtspartitie-theorieën voor organische microverontreinigingen en zware metalen zijn nog steeds onderhevig aan wetenschappelijk debat en onderzoek (zie o.a. Van Gestel, 1997). In het kader van actuele risicobeoordeling is naast een analytische benadering van opname en effecten van verontreinigende stoffen in deelsystemen ook een ander spoor te volgen. Het gaat dan om een 'overall' gevoeligheid van het bodemsysteem voor stress als gevolg van aanwezigheid van bodemverontreinigende stoffen, zoals vastgesteld door directe metingen. Bio-assays geven een indicatie over het 'welzijn' van het hele systeem in relatie tot aanwezige bodemkwaliteit. Hiermee worden de effecten van actuele blootstelling uitgedrukt in schade aan organismen en populaties. Dit is dan een maat voor de biologische beschikbaarheid in een bepaalde situatie. Ook maakt het de ecologische schade zichtbaar die de aanwezigheid van verontreinigende stoffen in de bodem kan veroorzaken. Zoals uit dit rapport blijkt kunnen interventiewaarden voor metalen worden overschreden zonder aantoonbare effecten op bio-assays, terwijl olie- en PAK-verontreiniging onder de interventiewaarde wel positieve effecten op de bio-assays vertonen.

1. Voor verschillen tussen ontsluiting met sterk zuur, water CaCl_2 en de interne concentratie van regenwormen wordt verwezen naar § 4.

Bio-assays zouden kunnen worden gebruikt als een tweede lijnsinstrument (specialistenniveau), en worden ingezet als generieke normen, zoals de chemische streef- en interventiewaarden aangeven dat sprake is van potentiële risico's. In het kader van een gebieds- of locatiegerichte risico-analyse kunnen vervolgens met behulp van bio-assays (eventueel in combinatie met veldonderzoek) de feitelijke risico's worden onderzocht in die bepaalde situatie. Het zou in dat kader te overwegen zijn om de toepasbaarheid van de zogenaamde TRIADE-benadering voor terrestrische bodems nader te onderzoeken. Deze benadering wordt reeds toegepast voor aquatische systemen (Chapman, 1986; Van de Guchte, 1992).

bio-assays (uniek of universeel)

Bij de ontwikkeling van bio-assays als 2^e lijnsinstrument kunnen 2 sporen worden onderscheiden:

1. analoog aan de chemische benadering wordt gezocht naar universeel toepasbare testorganismen met objectieve/kwantificeerbare waardering. Het gaat om gemakkelijk toepasbare toetsen die in elke soortgelijke situatie tot een vergelijkbaar (lees reproduceerbaar) resultaat komen. Een voorbeeld hiervan is de forel als overall testorganisme bij beoordeling (drink)waterkwaliteit. In heterogene systemen zoals de bodem is een dergelijke aanpak moeizamer te realiseren dan in meer homogene water- of luchtsystemen; daarnaast kun je een forel zien zwemmen en gedragsreacties waarnemen. Het bodemcompartiment is veel meer een 'black box';
2. maatwerk per gebied, per type verontreiniging, ook aan te duiden als het locatiespecifieke spoor. Per situatie wordt gekeken naar de meest geschikte testorganismen om iets te zeggen over de actuele risico's en/of biologische beschikbaarheid. Vergelijkingsmateriaal kan worden gezocht binnen verontreinigingsgradiënten binnen de verontreinigde locatie of via een referentie. Vaak ontbreekt een gradiënt of is niet opportuun zoals bijvoorbeeld bij diffuse bodemverontreiniging.

Er is bij bodemverontreiniging met name behoefte aan het tweede spoor, namelijk een verdieping in kennis van feitelijke risico's indien op basis van de conventionele 1e lijnsmethode geconcludeerd wordt dat sprake is van potentiële risico's. De combinatie van chemische analyse-gegevens, bodemkarakteristieken en verontreinigingskenmerken (voor zover bekend) geeft samen met bio-assays en veldinventarisaties de mogelijkheid tot het vaststellen van actuele risico's. Hiermee kan zowel de status-quo als de autonome ontwikkeling worden ingeschat. Een dergelijke tweede lijns-aanpak zegt iets over het functioneren van bodemecosystemen.

conclusies

De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat bio-assays een semikwantitatief instrument kunnen zijn bij de risicobeoordeling. Het gaat om interpretaties in termen van meer en minder. Hetzelfde fenomeen blijkt ook uit buitenlandse gegevens (zie bijv. DECHEMA, 1995; Hund en Traunspurger, 1994; Keddy et al., 1992). Een harde objectieve waardering is niet mogelijk vanwege een gebrek aan referentiegegevens. De vraag is evenwel of voorlopig bij een tweede lijnsaanpak niet volstaan kan worden met een meer/minder waardering.

bruikbaarheid bio-assays

Bio-assays hebben semi-kwantitatief en kwalitatief een toegevoegde waarde bij het vaststellen van de locatie-specifieke actuele risico's. Op grond hiervan kan, met oog voor de feitelijke consequenties, een besluit worden genomen over saneren of beheren. De mate van toegevoegde waarde wordt bepaald door de beschikbaarheid van referentiegegevens. Dergelijke informatie is schaars en derhalve is sprake van een kip/ei-discussie. Om deze discussie te doorbreken is informatieverzameling op grotere schaal nodig. Dat kan tot stand komen door bio-assays mee te laten liften in grotere projecten als instrument voor de actuele risicobeoordeling. Gedacht kan worden aan de zogenaamde 10 mln -plus projecten, NOBIS-projecten etc., aangevuld met een gerichte zoekactie naar in het buitenland reeds vergaarde informatie.

6. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Uit de resultaten van de uitgevoerde bio-assays kan het volgende worden geconcludeerd:

- Er worden meestal duidelijke verbanden gevonden tussen de mate van verontreiniging en de verschillende gemeten ecologische parameters. De verbanden zijn semi-kwantitatief, een gevolg van de beperkte opzet van dit proefproject. De bruikbaarheid van bio-assays is het inzichtelijk maken van de actuele ecologische risico's bij overschrijding van interventiewaarden. Deze chemische bepaalde waarden geven inzicht in de potentiële risico's en niet in de actuele.
- De keuze van een geschikte referentie blijkt in de praktijk een lastig probleem, maar is wel essentieel. Bij de beoordeling gaat het om relatieve verschillen. Absolute niveaus van effecten zijn niet vast te stellen. Bij het zoeken naar een geschikte referentie dient gelet te worden op afwezigheid van bodemverontreiniging, terwijl overige stressfactoren gelijk blijven.
- Een belangrijke randvoorwaarde is daarom dat de bio-assays op een deskundige wijze worden toegepast. Belangrijke aspecten hierbij zijn:
 - . het bewustzijn dat, naast de verontreiniging, ook andere abiotische factoren, zoals organische-stofgehalte, kleigehalte, bodemtextuur en pH, van invloed kunnen zijn op het testorganisme. Bij de selectie van de te testen monsters moet er naar gestreefd worden dat deze andere 'leefcondities' in de monsters zoveel mogelijk gelijk zijn en dat alleen de mate van verontreiniging varieert;
 - . de testen uit te voeren met een serie monsters, die zo mogelijk een gradiënt van verontreiniging representeren. Het is hierbij van belang dat ook een niet-verontreinigd representatief monster van de locatie als referentie wordt meegenomen;
 - . de gekozen testorganismen moeten zo goed mogelijk aansluiten op de ecologie en de blootstellingsroute van de gegeven praktijksituatie.
- De concentraties waarbij effecten worden waargenomen wijken af van de ecotoxicologische toetsingswaarden. Bij de verontreiniging met de zware metalen chroom en nikkel worden pas effecten waargenomen bij concentraties die (ver) boven de ecologische interventiewaarde liggen. Bij de verontreiniging met dieselolie worden al effecten waargenomen bij een concentratie even boven de streefwaarde. Zowel positieve als negatieve effecten worden waargenomen. De PAK-verontreiniging heeft een toxisch effect vanaf klasse 3. De gevonden afwijkingen ten opzichte van de gangbare ecotoxicologische normering benadrukken het nut en de toegevoegde waarde van een locatiespecifieke risico-evaluatie met behulp van terrestrische bio-assays. De interventiewaarden hebben alleen een signaleringsfunctie ten aanzien van de potentiële aanwezigheid van ecologische risico's. Voor een beoordeling van het daadwerkelijke actuele risico zijn bio-assays nuttige (en zelfs noodzakelijke) instrumenten.
- De groeisnelheid en omvang van de microbiële biomassa en de omvang en samenstelling van de nematodenpopulatie zijn gevoelige en geschikte ecotoxicologische parameters. Bij de toegepaste bio-assays met regenwormen en springstaarten blijkt overleving geen gevoelige parameter te zijn. Groei en reproductie zijn gevoeliger en daardoor beter geschikt als toetsparameters.

Aanbevolen wordt:

- om nader onderzoek uit te voeren naar de keuze van geschikte referenties voor de uitvoering van bio-assays en de in dit onderzoek gehanteerde 'batterij' bio-assays uit te breiden met een toets met planten;
- om meer ervaring op te doen met de uitvoering van bio-assays, bijvoorbeeld in 10 miljoen-plus-projecten en in NOBIS-kader, om zo een beter inzicht te verkrijgen in de praktische toepasbaarheid en zeggingskracht van bio-assays. Chemische analyses geven een eerste lijnsbeoordeling over de aanwezigheid van verontreinigde stoffen. Bio-assays geven een

maat voor de biobeschikbaarheid. Bovendien verschaffen bio-assays een beeldkwaliteit van de actuele risico's van bodemverontreiniging in aanvulling op het chemische toetsingskader;

- om middels een literatuurstudie en contacten met instituten en universiteiten een inventarisatie te maken van gegevens verkregen door toepassing van bio-assays op verontreinigde bodems, in Nederland en het buitenland. Dergelijke informatie kan bijdragen aan een beter inzicht in de praktische toepasbaarheid, reproduceerbaarheid en gevoeligheid van bio-assays. Mogelijk kan dergelijke informatie ook bijdragen aan een betere keuze van referenties.

REFERENTIES

- Ahlf, W., J. Gunkel & K. Rönnpagel, 1993. Toxikologische Bewertung von Sanierungen. In: Stegman, R. (Ed.). Bodenreinigung. Biologische und chemisch-physikalische Verfahrensentwicklung unter Berücksichtigung der bodenkundlichen, analytischen und rentlichen Bewertung., Economica Verlag, pp. 275-286.
- Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29, 2713-2717.
- Bååth, E., 1990. Thymidine incorporation into soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 22, 803-810.
- Bååth, E., 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization centrifugation. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1167-1172.
- Bardgett, R.D., T.W. Speir, D.J. Ross, G.W. Yeates & H.A. Kettles, 1994. Impact of pasture contamination by copper, chromium, and arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. *Biol. Fertil. Soils* 18, 71-79.
- Bjørnsen, P.K., 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1199-1204.
- Bloem, J., 1995. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In: A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas & F.J. de Bruijn (Eds.): *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 4.1.8:1-12.
- Bloem, J., P.R. Bolhuis, M.R. Veninga & J. Wieringa, 1995b. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: K. Alef & P. Nannipieri (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 162-173.
- Bloem, J., P.C. De Ruiter & L.A. Bouwman, 1997. Food webs and nutrient cycling in agroecosystems. In: J.D. Van Elsas, J.T. Trevors & E. Wellington (Eds.): *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker Inc. New York, pp. 245-278.
- Bloem, J., M. Veninga & J. Shepherd, 1995a. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 926-936.
- Bongers, T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83, 14-19.
- Bongers, T., R. Alkemade & G.W. Yeates, 1991. Interpretation of disturbance-induced maturity decrease in marine nematode assemblages by means of the Maturity index. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 76, 135-142.
- Bouwman, L.A., J. Bloem, P.H.J.F. Van Den Boogert, F. Bremer, G.H.J. Hoenderboom & P.C. De Ruiter, 1994. Short-term and long-term effects of bacterivorous nematodes and nematophagous fungi on carbon and nitrogen mineralization in microcosms. *Biol. Fertil. Soils* 17, 249-256.
- Bowmer, C.T., P. Roza, L. Henzen & C. Degeling, 1993. The development of chronic toxicological tests for PAH contaminated soils using the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. TNO-rapport IMW-R 92/387.

Brookes, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19, 269-279.

Chapman, P., 1996. Sediment quality criteria from the sediment quality TRIAD: an example. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 957-964.

Crommentuijn, T., J. Brils & N.M. Van Straalen, 1993. Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 26, 216-227.

Crommentuijn, T., A. Doornekamp & C.A.M. Van Gestel, 1997. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate, as influenced by pH and organic matter. *Appl. Soil Ecol.* 5, 261-271.

DECHEMA, 1995. Biologische Testmethoden für Böden. Bericht des Interdisziplinären Arbeitskreises 'Umweltbiotechnologie - Boden' 4: Adhoc-Arbeitsgruppe 'Methoden zur Toxikologischen/Ökotoxikologischen Bewertung von Böden; Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Frankfurt am Main.

Diaz-Ravina, M., E. Bååth & A. Frostegård, 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2238-2247.

Diaz-Ravina, M. & E. Bååth, 1996. Thymidine and leucine incorporation into bacteria from soils experimentally contaminated with heavy metals. *Appl. Soil Ecol.* 3, 225-234.

Doelman, P., E. Jansen, M. Michels & M. Van Til, 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soils* 17, 177-184.

Eiserman, R. & B. Daei, 1993. Evaluation of soil pollutions applying an ecotoxicological assay. in: Eijsackers, H.J.P. & T. Hamers (eds.): *Integrated soil and sediment research: a basis for proper protection.*, Kluwer Acad. Publ., pp. 313-314.

Frostegård, Å., A. Tunlid & E. Bååth, 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3605-3617.

Gibbs, M.H., L.F. Wicker & A.J. Stewart, 1996. A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to the earthworm, *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 360-368.

Gunkel, J., K. Rönnpagel & W. Ahlf, 1993. Eignung mikrobieller Biotests für gebundene Schadstoffe. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 21, 215-220.

Hatzinger, P.B. & M. Alexander, 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537-545.

Hund, K. & W. Traunspurger, 1994. Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29, 371-390.

ISO, 1993. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 2: Method for the determination of effects on reproduction. ISO/DIS 11268-2.

ISO, 1994. Soil quality - Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): method for the determination of effects on reproduction. ISO/DIS 11267.

- s'Jacob, J.J. & J. Van Bezooijen, 1984. A manual for practical work in nematology. Landbouwniversiteit Wageningen.
- Jenner, H.A., 1995. Assessment of ecotoxicological risks of element leaching from pulverized coal ashes. Proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen. pp 191.
- Kamerman, J.W. & C.A.M. Van Gestel, 1991. Beoordeling van gereinigde grond. III. De ontwikkeling van bio-assays. RIVM-rapportnr. 216402003.
- Keddy, C., J.C. Greene & M.A. Bonnell, 1992. A review of whole organism bio-assays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada. The National Contaminated Sites Remediation Program, Environment Canada, Ottawa.
- Lee, Q & P. Widden, 1996. *Folsomia candida*, a 'fungivorous' collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. Soil Biol. Biochem. 28, 689-690.
- Ma, W.-C., 1982a. Regenwormen als bio-indicatoren van bodemverontreiniging. Bodembescherming 15.
- Ma, W.-C., 1982b. The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms. Pedobiologia 24, 109-119.
- Ma, W.-C., 1987. Heavy metal accumulation in the mole, *Talpa europea*, and earthworms as an indicator of metal bioavailability in terrestrial environments. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 39, 933-938.
- Michel, P.H. & J. Bloem, 1993. Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. Soil Biol. Biochem. 25, 943-950.
- Moriarty, D.J.W., 1986. Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. Adv. Microb. Ecol. 9, 245-292.
- Neuhauser, E.F., R.C. Loehr, D.L. Milligan & M.R. Malecki, 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. Biol. Fert. Soil., 1, 149-152.
- OECD, 1984. Guideline for testing of chemicals no 207. Earthworm acute toxicity tests. Adopted 4 april 1984.
- Pankakoski, E., 1993. Accumulation of heavy metals in the mole in Finland. Environ. Pollut. 80, 9-16.
- Posthuma, L., L. Weltje & F.A. Antun-Sánchez, 1996. Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia andrei*. RIVM-rapportnr. 607506001.
- Remde, A. & K. Hund, 1994. Response of soil autotrophic nitrification and soil respiration to chemical pollution in long-term experiments. Chemosphere, 29, 391-404.
- Smit, E., 1997. Field relevance of the *Folsomia candida* soil toxicity test. Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Smit, C.E. & C.A.M. Van Gestel, 1996. Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. Appl. Soil Ecol. 3, 127-136.

Spurgeon, D.J., S.P. Hopkin & D.T. Jones, 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84, 123-130.

Spurgeon, D.J. & S.P. Hopkin, 1995. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology* 4, 190-205.

Spurgeon, D.J. & S.P. Hopkin, 1996. Effects of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* 40, 80-96.

Van de Guchte, C., 1992. The sediment quality triad: an integrated approach to assess contaminated sediments. In: P.J. Newman, M.A. Piavaux & R.A. Sweeting (Eds.): *River water quality, ecological assessment and control*. ECSC-EEC-EAEC, Brussels-Luxembourg, pp. 425-431.

Van de Guchte, C., H. Eijsackers, P.J. Den Besten, C.A.M. Van Gestel, T. Aldenberg, T.P. Traas & P.C. De Ruiter, 1996. *Ecotoxicologische risicobeoordeling van verontreinigde (water)bodems. Hoe verder? Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek Deel 2*. Wageningen: Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek

Van den Munckhof, G.P.M & M.F.X.W. Veul, 1994. Milieuhygiënische beoordeling van het biologische reinigingsproces van met olieproducten verontreinigde grond door middel van uitloogproeven en bio-assays. *Samenvattingen Nationaal Symposium Bodem Breed*, 6 en 7 december 1994. De Blije Wereld, Lunteren. p 142-144.

Van Gestel, C.A.M., 1991. *Earthworms in ecotoxicology*. Proefschrift Rijksuniversiteit Utrecht.

Van Gestel, C.A.M., E.M. Dirven-Van Breemen & J.W. Kamerman, 1992a. Beoordeling van gereinigde grond. IV. Toepassing van bio-assays met planten en regenwormen op referentiegronden. RIVM-rapportnr. 216402004.

Van Gestel, C.A.M., E.M. Dirven-Van Breemen & J.W. Kamerman, 1992b. Beoordeling van gereinigde grond. V. Toepassing van bio-assays met planten en regenwormen op verontreinigde en gereinigde gronden. RIVM-rapportnr. 216402005.

Van Gestel, C.A.M., E.M. Dirven-Van Breemen & R. Baerselman, 1993. Accumulation and elimination of cadmium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ. Supplement*, 585-597.

Van Gestel, C.A.M., 1997. Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bio-assays. In: N.M. Van Straalen and H. Løkke (Eds.): *Ecological risk assessment of contaminants in soil*. London: Chapman & Hall. pp. 25-50.

Vanhala, P.T. & J.H. Ahtiainen, 1994. Soil respiration, ATP content, and *Photobacterium* toxicity test as indicators of metal pollution in soil. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9, 115-121.

Van Straalen, N.M. & C.A.J. Denneman, 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 18, 241-251.

BIJLAGE I Overzicht gebruikte bio-assays bij de beoordeling van verontreinigde (water)bodems in Nederland en/of het buitenland

Tabel : Voorbeelden van bioassays in Nederland en/of buitenland gebruikt voor de beoordeling van verontreinigde (water)bodems

Testorganisme - soort test	Belangrijkste kenmerken, effect-parameters	Status BL = reeds toegepast in buitenland NL = reeds toegepast in Nederland 1,2,3 = status toetsontwikkeling*
Waterbodem - screeningstesten		
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (Luminescerende bacterie; Microtox, Lumistox)	Testduur max. 30 min. in poriewater/elutriaat verdunningsreeks; parameter remming van de luminescentie	BL/NL/1 (Maas <i>et al.</i> , 1993)
<i>Brachionus calyciflorus</i> (Rotifeer)	Testduur 48 h in poriewater/elutriaat verdunningsreeks; parameter overleving	BL/1 (Burton <i>et al.</i> , 1990; Persoone <i>et al.</i> , 1993)
<i>Thamnocephalus platyurusus</i> (Zoetwatercrustacee)	Testduur 48 h in poriewater/elutriaat verdunningsreeks; parameter overleving	BL/3 (Centeno <i>et al.</i> , 1995)
<i>Daphnia magna</i> fluorescentietest (Watervlo)	Testduur ca. 1 h in poriewater/elutriaat verdunningsreeks; parameter enzymactiviteit/ fluorescentie	BL/1 (Janssen & Persoone, 1993; Hayes <i>et al.</i> , 1993)
Waterbodem - chronische testen		
<i>Lemna minor</i> (Kroos)	Testduur 14 dagen in elutriaat-verdunningsreeks; parameters groei/bedekkingsgraad	3 (Jenner & Janssen-Mommen, 1989, 1993)
<i>Selenastrum capricornutum</i> (Alg)	Testduur 3 dagen in poriewater/elutriaat-verdunnings-reeks; parameters groei/celdichtheid	BL/NL/2 (Ahlf, 1985)
<i>Panagrellus redivivus</i> (Nematode)	Testduur 4 dagen in poriewater/elutriaat-verdunnings-reeks; parameters overleving, groei en ontwikkeling	BL/3 (Ross <i>et al.</i> , 1989)
<i>Daphnia magna</i> (Watervlo)	Testduur 16-21 dagen in poriewater/elutriaat-verdunnings-reeks; parameters overleving en reproductie	BL/NL/1 (Maas <i>et al.</i> , 1993)
<i>Hyalella azteca</i> (Vlokreeltje)	Testduur 7-29 dagen in sediment-watersysteem; parameters overleving, groei, ontwikkeling en reproductie	BL/1 (Burton <i>et al.</i> , 1990)
<i>Chironomus riparius</i> (Muggelarf)	Testduur 28 dagen in sediment-watersysteem; parameters overleving, larvale ontwikkeling	BL/NL/1 (Maas <i>et al.</i> , 1993; Van de Guchte <i>et al.</i> , 1995)
<i>Xenopus laevis</i> (Pad)	Testduur 4 dagen in poriewater/elutriaat; parameter teratogeniteit/misvormingen	BL/1 (Dawson <i>et al.</i> , 1988)
Early life stage test met <i>Brachydanio rerio</i> (Zebra vis)	Testduur 7 dagen in poriewater/elutriaat-verdunningsreeks of sediment-watersysteem; parameters overleving en misvormingen tijdens larvale ontwikkeling	BL/NL/1 (Maas & Van de Guchte, 1990)
Landbodem - screeningstesten		
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (Luminescerende bacterie; Microtox, Lumistox)	Testduur max. 30 min. in poriewater/elutriaat verdunningsreeks; parameter remming van de luminescentie	BL/NL/1 (DECHEMA, 1995)
Landbodem - chronische testen		
<i>Lactuca sativa</i> (Sla) en andere planten	Testduur 4 dagen in eluaat, 2-4 weken in bodem; parameters wortel- en spruitgroei	NL/3 (Kammerman & Van Gestel, 1991)
<i>Colpoda steinii</i> (Protozo)	Testduur 1-2 weken in bodem; parameters overleving/reproductie	BL/3 (Forge <i>et al.</i> , 1993a,b)
<i>Folsomia candida</i> (Springstaart)	Testduur 4 weken in bodem; parameters overleving en reproductie	BL/NL/1 (DECHEMA, 1995)
<i>Eisenia fetida</i> (Regenworm)	Testduur 4 weken in bodem; parameters overleving, groei en reproductie	BL/NL/1 (Van Gestel <i>et al.</i> , 1992a,b)

* 1 = toets beschreven in internationale (concept) richtlijn
2 = toets beschreven in nationale (concept) richtlijn
3 = toets (al dan niet volledig) beschreven in literatuur

BIJLAGE II Analyseresultaten grondmonsters (laboratoriumstaten)

Analyserapport : 167964
Blad : 2 van 2 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG26.1 PGB0/BIOASSAYS
Datum aangeleverd: 31 mei 1996
Analyses gereed : 13 juni 1996
Controlegetal : 960613-133651-7985

Monsteromschrijving / Barcode:
4.: 960537393 Grond; G0 / metaal 1
P0693402
5.: 960537394 Grond; G1 / metaal 3
P0693422
6.: 960537395 Grond; G2 / metaal 4
P0693410

			4.	5.	6.
Droge stof	(NEN 5747)	(%)	Q 88,8	73,5	78,6
Organisch stof	(NEN 5754)	(% op ds)	Q 2,9	4,5	3,9
(gecorrigeerd voor aan lutum gebonden vocht; indien geen lutum aangevraagd: lutum = 25 % op ds als stand. bodem)					
pH-KCl	(NEN 5750)		Q 5,9	5,7	6,0
Meettemperatuur	pH-meting	(gr.C)	Q 22,4	22,1	22,4
Zeefkromme analoog SCG (% op min. deel)					
> 2000 um		(% **)	Q 3,0	< 2,0	3,1
< 2000 um		(% **)	Q 100	100	100
< 1000 um		(% **)	Q 99	99	99
< 500 um		(% **)	Q 97	98	97
< 250 um		(% **)	Q 80	83	82
< 125 um		(% **)	Q 23	25	27
< 63 um		(% **)	Q 7,1	7,3	8,0
< 50 um		(% **)	Q 6,9	6,5	8,0
< 32 um		(% **)	Q 5,8	4,8	8,0
< 16 um		(% **)	Q 5,2	4,0	8,0
< 2 um		(% **)	Q 3,7	2,5	8,0
*) op totale monster					
**) op totaal fractie 0-2000 um					
Chroom	(ICP, NEN 6426)	(mg/kg ds)	Q < 10	1.300	430
Nikkel	(ICP, NEN 6426)	(mg/kg ds)	Q < 5,0	930	2.800

Opmerkingen :

chj Zie voor het gaschromatogram de bijlage.

chn Van dit monster is geen gaschromatogram bijgeleverd, omdat het totale minerale oliegehalte beneden de detectiegrens ligt.

die Olie-indicatie: Diesel.



Analyserapport : 167964
Blad : 1 van 2 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG26.1 PGB0/BIOASSAYS
Datum aangeleverd: 31 mei 1996
Analyses gereed : 13 juni 1996
Controlegetal : 960613-133651-7985

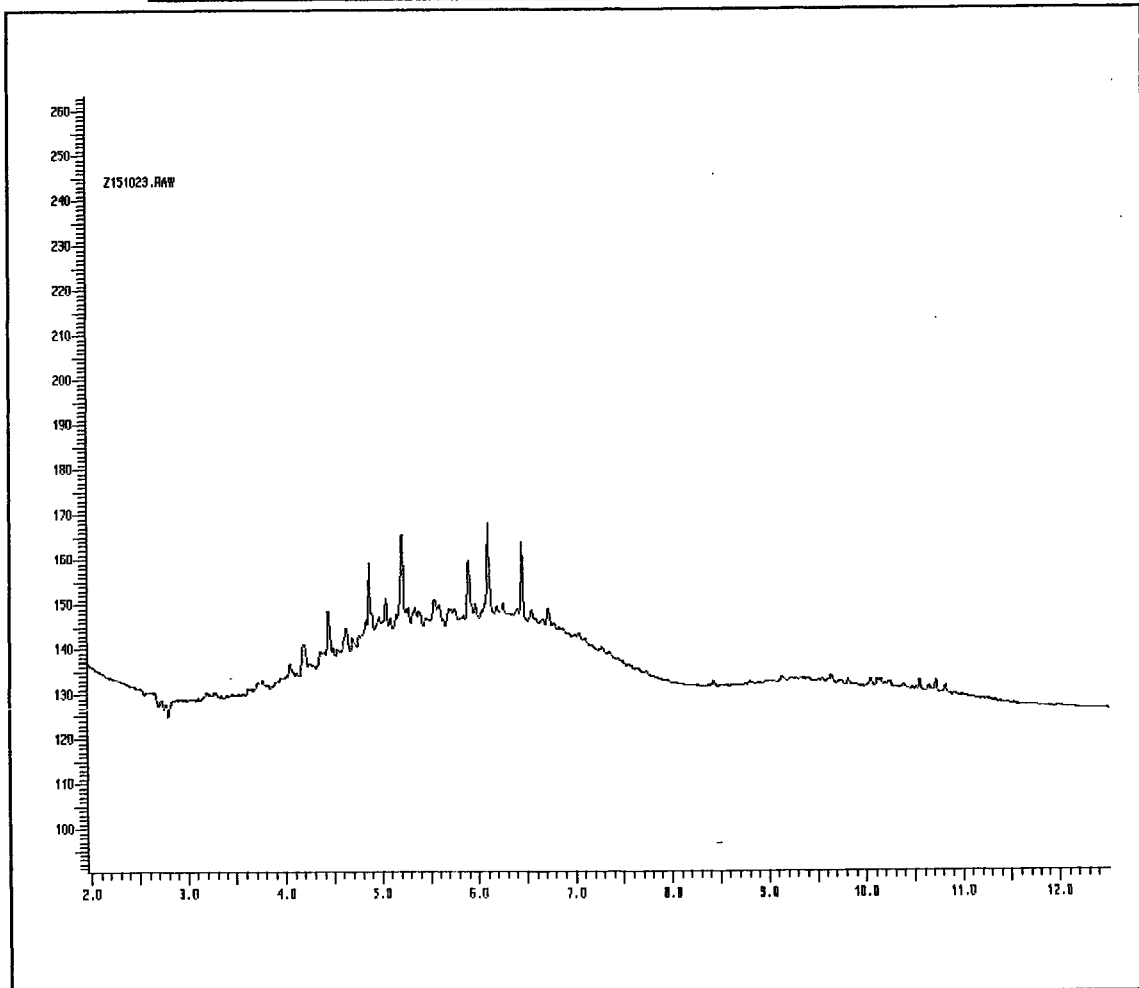
Monsteromschrijving / Barcode:
1.: 960537390 Grond; B0 / olie 1
P0693409
2.: 960537391 Grond; B5 / olie 2
P0693406
3.: 960537392 Grond; B6 / olie 4
P0693417

			1.	2.	3.
Droge stof	(NEN 5747)	(%)	Q 87,1	86,9	88,7
Organisch stof	(NEN 5754)	(% op ds)	Q < 1,0	2,4	< 1,0
(gecorrigeerd voor aan lutum gebonden vocht; indien geen lutum aangevraagd: lutum = 25 % op ds als stand. bodem)					
pH-KCl	(NEN 5750)		Q 5,5	4,5	6,3
Meettemperatuur	pH-meting	(gr.C)	Q 22,3	22,1	22,5
Zeeffronde analoog SCG (% op min. deel)					
> 2000 um		(% **)	Q < 2,0	< 2,0	< 2,0
< 2000 um		(% **)	Q 100	100	100
< 1000 um		(% **)	Q 98	98	98
< 500 um		(% **)	Q 95	95	95
< 250 um		(% **)	Q 85	84	83
< 125 um		(% **)	Q 34	35	33
< 63 um		(% **)	Q 7,4	7,9	6,6
< 50 um		(% **)	Q 6,8	7,2	5,9
< 32 um		(% **)	Q 5,6	5,3	4,2
< 16 um		(% **)	Q 5,0	4,5	3,6
< 2 um		(% **)	Q 4,4	3,4	3,0
*) op totale monster					
**) op totaal fractie 0-2000 um					
Minerale Olie GC (VPR C85-19)					
Fractie C10 - C12		(mg/kg ds)	Q < 20	< 20	24
Fractie C12 - C22		(mg/kg ds)	Q < 20	< 20	250
Fractie C22 - C30		(mg/kg ds)	Q < 20	< 20	54
Fractie C30 - C40		(mg/kg ds)	Q < 20	< 20	44
Totaal Minerale Olie C10-C40		(mg/kg ds)	Q < 50	< 50	370 (die)
Silicagel (per gram monster)		(gram)	Q 0,3	0,3	0,2
Chromatogram Minerale Olie GC			Q 0 (chn)	0 (chn)	0 (chj)

(De tussen haakjes vermelde lettercode geven aan dat de analyse van commentaar is voorzien.)



GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE VAN MINERALE OLIE



GEGEVENS:

Monsternummer : 960537392 / olie 4
Monster : Grond

Retentie-tijden (horizontale as) van referentie-alkanen in minuten :

C-10 : ± 3
C-12 : ± 4
C-22 : ± 8
C-30 : ± 10
C-40 : ± 12



Biochem Laboratorium BV is ingeschreven in het Sterlab register onder nr. 6 voor gebieden zoals nader omschreven in de erkenning en is tevens erkend door Lloyd's Register Quality Assurance voor ISO-9002.



Alle opdrachten worden aanvaard en uitgevoerd overeenkomstig onze leveringsvoorwaarden, gedeponeerd bij de Kamers van Koophandel en fabrieken.

Analyserapport : 168981
Blad : 1 van 2 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG26.1 PGB0/Bioassays
Datum aangeleverd: 10 juni 1996
Analyses gereed : 17 juni 1996
Controlegetal : 960617-122508-63436

Monsteromschrijving / Barcode:

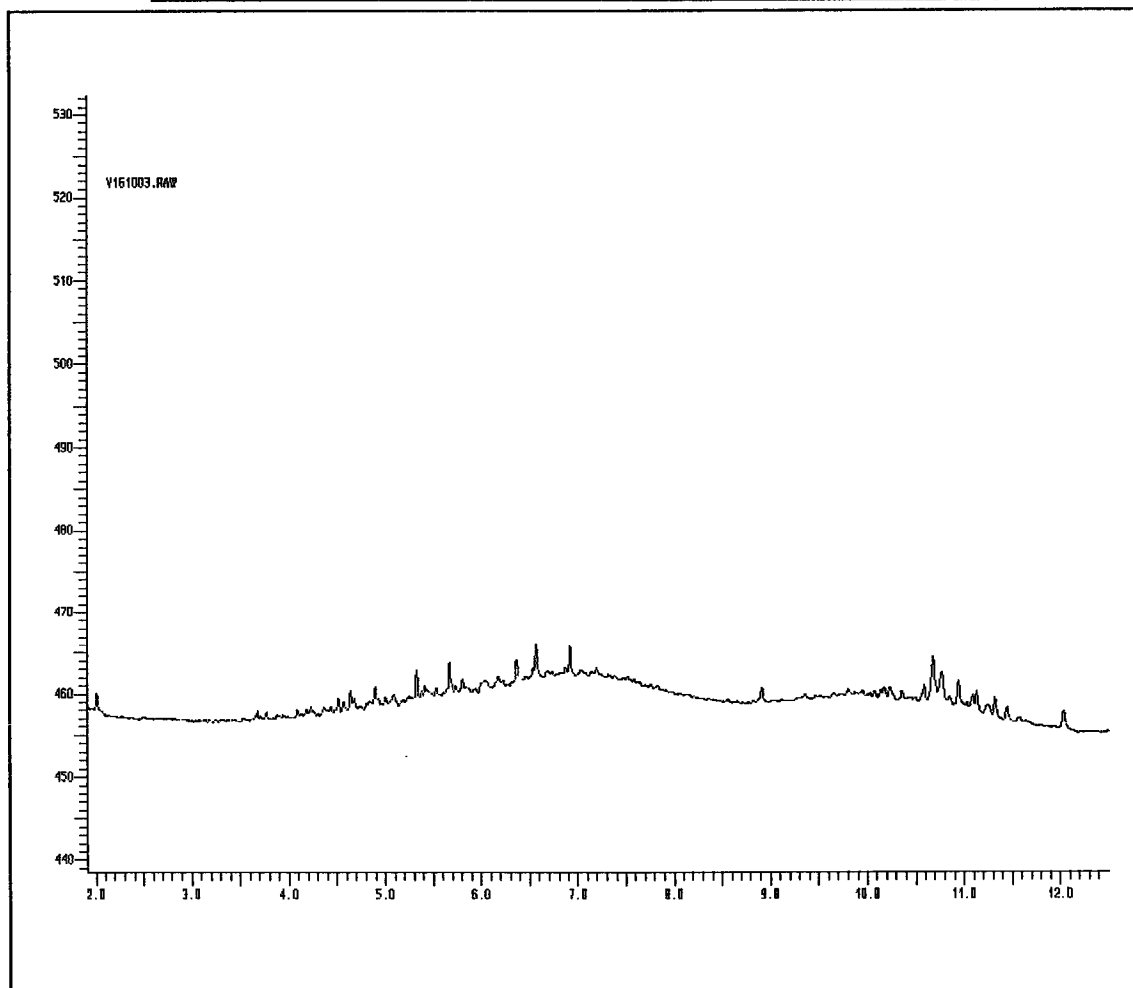
1.: 960640694 Grond; B7 / olie 3
P0747479
2.: 960640695 Grond; G3 / metaal 2
P0747482

			1.	2.
Drage stof	(NEN 5747)	(%)	Q 88,5	81,8
Organisch stof	(NEN 5754)	(% op ds)	Q < 1,0	5,9
(gecorrigeerd voor aan lutum gebonden vocht; indien geen lutum aangevraagd: lutum = 25 % op ds als stand. bodem)				
pH-KCl	(NEN 5750)		Q 5,3	6,0
Meettemperatuur pH-meting		(gr.C)	Q 20,2	20,1
Zeefkromme analoog SCG (% op min. deel)				
> 2000 um		(% *)	Q < 2,0	2,0
< 2000 um		(% **)	Q 100	100
< 1000 um		(% **)	Q 99	100
< 500 um		(% **)	Q 96	98
< 250 um		(% **)	Q 84	82
< 125 um		(% **)	Q 36	25
< 63 um		(% **)	Q 10,0	8,6
< 50 um		(% **)	Q 8,3	7,7
< 32 um		(% **)	Q 5,6	5,6
< 16 um		(% **)	Q 4,5	4,4
< 2 um		(% **)	Q 3,6	2,6
*) op totale monster				
**) op totaal fractie 0-2000 um				
Chroom	(ICP, NEN 6426)	(mg/kg ds)	Q	550
Nikkel	(ICP, NEN 6426)	(mg/kg ds)	Q	350
Cadmium	(ICP, NEN 6426)	(mg/kg ds)	Q	0,3
Minerale Olie GC (VPR C85-19)				
Fractie C10 - C12		(mg/kg ds)	Q < 20	
Fractie C12 - C22		(mg/kg ds)	Q 53	
Fractie C22 - C30		(mg/kg ds)	Q < 20	
Fractie C30 - C40		(mg/kg ds)	Q < 20	
Totaal Minerale Olie C10-C40		(mg/kg ds)	Q 53	(onb)
Silicagel (per gram monster)		(gram)	Q 0,3	
Chromatogram Minerale Olie GC			Q 0	(chj)

(De tussen haakjes vermelde lettercode geven aan dat de analyse van commentaar is voorzien.)



GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE VAN MINERALE OLIE



GEGEVENS:

Monsternummer : 960640694 / olie 3
Monster : Grond

Retentie-tijden (horizontale as) van referentie-alkanen in minuten :

C-10 : ± 3
C-12 : ± 4
C-22 : ± 8
C-30 : ± 10
C-40 : ± 12



Biochem Laboratorium BV is ingeschreven in het Sterlab register onder nr. 6 voor gebieden zoals nader omschreven in de erkenning en is tevens erkend door Lloyd's Register Quality Assurance voor ISO-9002.



Analyserapport : 168981
Blad : 2 van 2 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG26.1 PGB0/Bioassays
Datum aangeleverd: 10 juni 1996
Analyses gereed : 17 juni 1996
Controlegetal : 960617-122508-63436

Opmerkingen :

chj Zie voor het gaschromatogram de bijlage.
onb Olie-indicatie: Een onbekende oliesoort.



Biochem Laboratorium BV is ingeschreven in het Sterlab register onder nr. 6 voor gebieden zoals nader omschreven in de erkenning en is tevens erkend door Lloyd's Register Quality Assurance voor ISO-9002.



Alle opdrachten worden aanvaard en uitgevoerd overeenkomstig onze leveringsvoorwaarden, gedeponeed bij de Kamers van Koophandel en fabrieken.

Analyserapport : 173219
Blad : 4 van 4 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG 26.1 P.G.B.O. Slibonderzoek
Datum aangeleverd: 18 juli 1996
Analyses gereed : 23 juli 1996
Controlegetal : 960723-172612-52609

Monsteromschrijving / Barcode:
4.: 960754445 Waterbodem; monster 4 / bagger 3
P0765607
5.: 960754446 Waterbodem; monster 5 / bagger 1
P0765225

		4.	5.
PAK (Aceton/Hexaan Extractie, GCMS)			
Naftaleen	(mg/kg ds)	Q < 0,02	< 0,02
Acenaftyleen	(mg/kg ds)	Q < 0,02	< 0,02
Acenaften	(mg/kg ds)	Q < 0,02	< 0,02
Fluoreen	(mg/kg ds)	Q 0,03	< 0,02
Fenanthreen	(mg/kg ds)	Q 0,04	< 0,02
Anthraceen	(mg/kg ds)	Q 0,04	< 0,02
Fluorantheen	(mg/kg ds)	Q 0,25	0,03
Pyreen	(mg/kg ds)	Q 0,19	0,02
Benzo(a)anthraceen	(mg/kg ds)	Q 0,11	< 0,02
Chryseen	(mg/kg ds)	Q 0,10	< 0,02
Benzo(b)fluorantheen	(mg/kg ds)	Q 0,06	< 0,02
Benzo(k)fluorantheen	(mg/kg ds)	Q 0,03	< 0,02
Benzo(a)pyreen	(mg/kg ds)	Q 0,05	< 0,02
Indeno(1,2,3-c,d)pyreen	(mg/kg ds)	Q 0,04	< 0,02
Dibenz(a,h)anthraceen	(mg/kg ds)	Q < 0,02	< 0,02
Benzo(g,h,i)peryleen	(mg/kg ds)	Q 0,06	< 0,02
Totaal PAK's EPA	(mg/kg ds)	Q 1,0	< 0,3
Totaal PAK's VROM	(mg/kg ds)	Q 0,7	< 0,2
Totaal PAK's Borneff	(mg/kg ds)	Q 0,5	< 0,2
E.O.X. (o-NEN 5777)	(mg/kg ds)	Q < 0,1	< 0,1
Minerale Olie GC (VPR C85-19)			
Fractie C10 - C12	(mg/kg ds)	Q < 20	< 20
Fractie C12 - C22	(mg/kg ds)	Q 20	< 20
Fractie C22 - C30	(mg/kg ds)	Q 28	< 20
Fractie C30 - C40	(mg/kg ds)	Q 48	< 20
Totaal Minerale Olie C10-C40	(mg/kg ds)	Q 96 (onb)	< 50
Silicagel (per gram monster)	(gram)	Q 0,4	0,3

(De tussen haakjes vermelde lettercode geven aan dat de analyse van commentaar is voorzien.)

Opmerkingen :

onb Olie-indicatie: Een onbekende oliesoort.



Analyserapport : 173219
Blad : 3 van 4 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG 26.1 P.G.B.O. Slibonderzoek
Datum aangeleverd: 18 juli 1996
Analyses gereed : 23 juli 1996
Controlegetal : 960723-172612-52609

Monsteromschrijving / Barcode:

4.: 960754445 Waterbodem; monster 4
P0765607

5.: 960754446 Waterbodem; monster 5
P0765225

/ bagger 3
/ bagger 1

				4.	5.
Droge stof	(NEN 5747)	(%)	Q	55,5	66,9
Organisch stof		(% op ds)	Q	5,4	3,2
pH-CaCl ₂	(NEN 5750)		Q	8,3	7,9
Meettemperatuur pH-meting		(gr.C)	Q	18,5	18,4
Zeefkromme analoog SCG (% op min. deel)					
> 2000 um		(% *)	Q	3,5	< 2,0
< 2000 um		(% **)	Q	100	100
< 1000 um		(% **)	Q	99	100
< 500 um		(% **)	Q	98	100
< 250 um		(% **)	Q	97	100
< 125 um		(% **)	Q	94	99
< 63 um		(% **)	Q	40	51
< 50 um		(% **)	Q	39	48
< 32 um		(% **)	Q	35	41
< 16 um		(% **)	Q	32	34
< 2 um		(% **)	Q	25	26
*) op totale monster					
**) op totaal fractie 0-2000 um					
Metalen (ICP, NEN 6426)					
Chroom		(mg/kg ds)	Q	16	33
Nikkel		(mg/kg ds)	Q	6,9	14,5
Koper		(mg/kg ds)	Q	10,0	8,2
Zink		(mg/kg ds)	Q	61	60
Cadmium		(mg/kg ds)	Q	< 0,2	0,2
Lood		(mg/kg ds)	Q	26	17
Arseen		(mg/kg ds)	Q	7,3	13,5
Kwik	(NEN 5764)	(mg/kg ds)	Q	< 0,1	< 0,1



Analyserapport : 173219
Blad : 2 van 4 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG 26.1 P.G.B.O. Slibonderzoek
Datum aangeleverd: 18 juli 1996
Analyses gereed : 23 juli 1996
Controlegetal : 960723-172612-52609

Monsteromschrijving / Barcode:

1.: 960754442 Waterbodem; monster 1 / bagger 5
P0765598
2.: 960754443 Waterbodem; monster 2 / bagger 2
P0765226
3.: 960754444 Waterbodem; monster 3 / bagger 4
P0765229

			1.	2.	3.
PAK (Aceton/Hexaan Extractie, GCMS)					
Naftaleen	(mg/kg ds)	Q	< 0,02	< 0,02	0,17
Acenaftyleen	(mg/kg ds)	Q	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Acenafteen	(mg/kg ds)	Q	0,08	0,09	0,26
Fluoreen	(mg/kg ds)	Q	0,21	< 0,02	0,08
Fenanthreen	(mg/kg ds)	Q	0,81	0,05	0,34
Anthraceen	(mg/kg ds)	Q	0,13	< 0,02	0,04
Fluorantheen	(mg/kg ds)	Q	2,7	0,24	0,43
Pyreen	(mg/kg ds)	Q	1,65	0,17	0,27
Benzo(a)anthraceen	(mg/kg ds)	Q	0,36	0,12	0,11
Chryseen	(mg/kg ds)	Q	0,48	0,09	0,14
Benzo(b)fluorantheen	(mg/kg ds)	Q	0,31	0,10	0,11
Benzo(k)fluorantheen	(mg/kg ds)	Q	0,14	0,04	0,05
Benzo(a)pyreen	(mg/kg ds)	Q	0,16	0,03	0,05
Indeno(1,2,3-c,d)pyreen	(mg/kg ds)	Q	0,10	0,03	0,03
Dibenz(a,h)anthraceen	(mg/kg ds)	Q	0,05	< 0,02	< 0,02
Benzo(g,h,i)peryleen	(mg/kg ds)	Q	0,12	0,04	0,04
Totaal PAK's EPA	(mg/kg ds)	Q	7,3	1,0	2,1
Totaal PAK's VROM	(mg/kg ds)	Q	5,0	0,6	1,4
Totaal PAK's Borneff	(mg/kg ds)	Q	3,5	0,5	0,7
E.O.X. (o-NEN 5777)	(mg/kg ds)	Q	0,5	< 0,1	< 0,1
Minerale Olie GC (VPR C85-19)					
Fractie C10 - C12	(mg/kg ds)	Q	< 20	< 20	< 20
Fractie C12 - C22	(mg/kg ds)	Q	51	< 20	< 20
Fractie C22 - C30	(mg/kg ds)	Q	86	< 20	< 20
Fractie C30 - C40	(mg/kg ds)	Q	54	< 20	< 20
Totaal Minerale Olie C10-C40	(mg/kg ds)	Q	190 (onb)	< 50	< 50
Silicagel (per gram monster)	(gram)	Q	0,4	0,4	0,3

(De tussen haakjes vermelde lettercode geven aan dat de analyse van commentaar is voorzien.)



Analyserapport : 173219
Blad : 1 van 4 (excl. voorblad)
Opdrachtgever : Witteveen + Bos B.V.
Project : WAG 26.1 P.G.B.O. Slibonderzoek
Datum aangeleverd: 18 juli 1996
Analyses gereed : 23 juli 1996
Controlegetal : 960723-172612-52609

Monsteromschrijving / Barcode:

1.: 960754442 Waterbodem; monster 1 / bagger 5
P0765598
2.: 960754443 Waterbodem; monster 2 / bagger 2
P0765226
3.: 960754444 Waterbodem; monster 3 / bagger 4
P0765229

				1.	2.	3.
Droge stof	(NEN 5747)	(%)	Q	66,1	67,4	73,0
Organisch stof		(% op ds)	Q	2,8	2,4	1,3
pH-CaCl ₂	(NEN 5750)		Q	7,8	7,5	8,0
Meettemperatuur pH-meting		(gr.C)	Q	18,4	18,5	18,7
Zeefkromme analoog SCG (% op min. deel)						
> 2000 um		(% **)	Q	< 2,0	< 2,0	< 2,0
< 2000 um		(% ***)	Q	100	100	100
< 1000 um		(% ***)	Q	100	100	100
< 500 um		(% ***)	Q	100	100	100
< 250 um		(% ***)	Q	98	99	100
< 125 um		(% ***)	Q	92	93	77
< 63 um		(% ***)	Q	27	18,0	8,5
< 50 um		(% ***)	Q	25	17,5	8,0
< 32 um		(% ***)	Q	20,0	15,5	7,0
< 16 um		(% ***)	Q	16,0	13,5	6,0
< 2 um		(% ***)	Q	11,0	9,4	4,0
*) op totale monster						
**) op totaal fractie 0-2000 um						
Metalen (ICP, NEN 6426)						
Chroom		(mg/kg ds)	Q	20	17	< 10
Nikkel		(mg/kg ds)	Q	8,4	6,4	< 5,0
Koper		(mg/kg ds)	Q	13,5	5,7	< 5,0
Zink		(mg/kg ds)	Q	63	34	14
Cadmium		(mg/kg ds)	Q	0,7	< 0,2	< 0,2
Lood		(mg/kg ds)	Q	25	11	15
Arseen		(mg/kg ds)	Q	9,0	8,5	< 5,0
Kwik	(NEN 5764)	(mg/kg ds)	Q	< 0,1	< 0,1	< 0,1



BIJLAGE III Data bio-assays *Eisenia fetida* en *Folsomia candida*

DATA.XLS

	grafiek no		groei (%)	SD	overleving (%)	SD
eisenia	1	metaal 1	25,26	6,126	100	0
		metaal 2	15,77	9,399	98	4
		metaal 3	11,48	9,487	100	0
		metaal 4		6,043	2	4
13	bagger 1	27,5	4,5	100		
	bagger 2	42,3	0,8	100		
	bagger 3	37	9	100		
	bagger 4	33,6	15,2	94		
	bagger 5			0		
7	olie 1	14,68	4,59	100	0	
	olie 2	11,18	4,67	100	0	
	olie 3	9,73	5,79	98	4	
	olie 4	1,49	2,14	96	8	
			gewicht (mg)	SD		
Folsomia gewicht	2	metaal 1	0,2354	0,0515		
		metaal 2	0,2918	0,0564		
		metaal 3	0,2428	0,0587		
		metaal 4	0,049	0,0177		
8	olie 1	0,2458	0,062			
	olie 2	0,3039	0,0379			
	olie 3	0,2549	0,0844			
	olie 4	0,3262	0,0457			
14	bagger 1	0,2377	0,0736			
	bagger 2	0,2264	0,0502			
	bagger 3	0,2598	0,0907			
	bagger 4	0,2252	0,0488			
	bagger 5	0,118	0,0137			
			overleving	SD	juvenielen	SD
Folsomia	3	metaal 1	5,4	3,1	144,9	110,1
		metaal 2	5,1	4,1	155	140,8
		metaal 3	6,1	3,8	176,3	144,6
		metaal 4	6,1	4,6	58,3	72,2
9	olie 1	4,4	3,5	305,1	132,1	
	olie 2	4,5	2,5	129,9	89,5	
	olie 3	4,1	3,1	106,5	77,7	
	olie 4	3,7	2	117,1	52,5	
15	bagger 1	2,7	0,8	37,9	8,9	
	bagger 2	3,8	0,8	102,9	42,8	
	bagger 3	3,6	0,5	84,4	34,9	
	bagger 4	3,5	1,5	69,9	28,1	
	bagger 5		1,6	6,4	3,6	