

NOBIS 96-1-13

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie

Fase 1, deelresultaat 1: Inventarisatie en selectie van bioassays en extractiemethoden voor grond verontreinigd met minerale olie

Nederlands Onderzoeksprogramma
Biotechnologische In-situ Sanering

NOBIS 96-1-13

**EFFECTIVITEIT VAN BIOASSAYS BIJ HET
MONITOREN EN BEOORDELEN VAN HET
MILIEURENDEMENT VAN IN-SITUBIORESTAURATIE**

Fase 1, deelresultaat 1:
Inventarisatie en selectie van bioassays en
extractiemethoden voor grond verontreinigd met
minerale olie

drs. J.J. van der Waarde (Bioclear b.v.)
drs. J. Brils (AquaSense b.v.)
ir. J.G.M. Derksen (AquaSense b.v.)
dr. E.E. van der Hoek (KEMA Nederland b.v.)
drs. M.F.X.W. Veul (Witteveen en Bos b.v.)
dr. ir. C.A.M. van Gestel (Vrije Universiteit Amsterdam)

oktober 1998

Gouda, CUR/NOBIS

Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering

Auteursrechten

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of op enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van CUR/NOBIS. Het is toegestaan overeenkomstig artikel 15a Auteurswet 1912 gegevens uit deze uitgave te citeren in artikelen, scripties en boeken, mits de bron op duidelijke wijze wordt vermeld, alsmede de aanduiding van de maker, indien deze in de bron voorkomt, "©" Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie - Fase 1, deelresultaat 1: Inventarisatie en selectie van bioassays en extractiemethoden voor grond verontreinigd met minerale olie", oktober 1998, CUR/NOBIS, Gouda."

Aansprakelijkheid

CUR/NOBIS en degenen die aan deze publicatie hebben meegewerkt, hebben een zo groot mogelijke zorgvuldigheid betracht bij het samenstellen van deze uitgave. Nochtans moet de mogelijkheid niet worden uitgesloten dat er toch fouten en onvolledigheden in deze uitgave voorkomen. Ieder gebruik van deze uitgave en gegevens daaruit is geheel voor eigen risico van de gebruiker en CUR/NOBIS sluit, mede ten behoeve van al degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt, iedere aansprakelijkheid uit voor schade die mocht voortvloeien uit het gebruik van deze uitgave en de daarin opgenomen gegevens, tenzij de schade mocht voortvloeien uit opzet of grove schuld zijdens CUR/NOBIS en/of degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt.

Copyrights

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording and/or otherwise, without the prior written permission of CUR/NOBIS. It is allowed, in accordance with article 15a Netherlands Copyright Act 1912, to quote data from this publication in order to be used in articles, essays and books, on condition that the source of the quotation, and, insofar as this has been published, the name of the author, are clearly mentioned, "©" Effectivity of bioassays for monitoring and evaluation of environmental efficiency of in situ biorestoration - Phase 1, report 1: Inventarization and selection of bioassays and extraction methods for soil polluted with mineral oil", October 1998, CUR/NOBIS, Gouda The Netherlands."

Liability

CUR/NOBIS and all contributors to this publication have taken every possible care during the preparation of this publication. However, it can not be guaranteed that this publication is complete and/or free of faults. The use of this publication and data from this publication is entirely for the user's own risk and CUR/NOBIS hereby excludes any and all liability for any and all damage which may result from the use of this publication or data from this publication, except in so far as this damage is a result of intentional fault or gross negligence of CUR/NOBIS and/or the contributors.

Titel rapport

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie

Fase 1, deelresultaat 1: Inventarisatie en selectie van bioassays en extractiemethoden voor grond verontreinigd met minerale olie

CUR/NOBIS-rapportnummer

96-1-13

Projectrapportnummer

96.618-1

Auteurs

drs. J.J. van der Waarde

drs. J. Brils

ir. J.G.M. Derksen

dr. E.E. van der Hoek

drs. M.F.X.W. Veul

dr. ir. C.A.M. van Gestel

Aantal bladzijden

Rapport: 59

Bijlagen: 0

Uitvoerende organisaties (consortium)

Bioclear b.v.

AquaSense b.v.

KEMA Nederland b.v.

Witteveen en Bos b.v.

Vrije Universiteit Amsterdam

Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam b.v.

Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen

Uitgever

CUR/NOBIS, Gouda

Samenvatting

In het kader van NOBIS wordt een haalbaarheidsstudie uitgevoerd naar de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie. Na toetsing van de beschreven bioassays aan een reeks projectspecifieke selectiecriteria zijn de volgende testen geselecteerd om toxiciteit van met minerale olie verontreinigde grond te bepalen:

- **Acute-testbatterij**
 - de ECHA-test met de bacterie *Bacillus* sp.
 - een aquatische algentest
 - een wortelgroeiremmingtest met planten
 - een immobiliteitstest met de nematode *Plectus acuminatus*
 - een immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida*
 - een immobiliteitstest met de watervlo *Daphnia magna*
 - de Microtox-test
- **Chronische-testbatterij**
 - een chronische test met sla
 - een chronische test met springstaarten
 - een chronische test met regenwormen

Op basis van literatuuronderzoek is een nieuwe extractiemethode van grond voor acute bioassays opgesteld, gebaseerd op extractie met demiwater met 0,001 M Ca(NO₃)₂.

Trefwoorden**Gecontroleerde termen:****Vrije trefwoorden:**

bioassays, ecotoxicologie, minerale olie, biodegradatie, risico

Titel project

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie

Projectleiding

de heer drs. J.J. van der Waarde

Dit rapport is verkrijgbaar bij:
CUR/NOBIS, Postbus 420, 2800 AK Gouda

Report title

Effectivity of bioassays for monitoring and evaluation of environmental efficiency of in situ biorestauration

Phase 1, report 1: Inventarization and selection of bioassays and extraction methods for soil polluted with mineral oil

CUR/NOBIS report number

96-1-13

Project report number

96.618-1

Authors

drs. J.J. van der Waarde

drs. J. Brils

ir. J.G.M. Derksen

dr. E.E. van der Hoek

drs. M.F.X.W. Veul

dr. ir. C.A.M. van Gestel

Number of pages

Report: 59

Appendices: 0

Executive organizations (consortium)

Bioclear Environmental Biotechnology

AquaSense b.v.

KEMA Nederland b.v.

Witteveen en Bos b.v.

Vrije Universiteit Amsterdam

Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam b.v.

Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen

Publisher

CUR/NOBIS, Gouda

Abstract

In the framework of NOBIS a feasibility study is performed on the effectivity of bioassays in monitoring and assessment of the environmental efficiency of in situ biorestauration. The reviewed bioassays were checked against a set of project-specific criteria and the following tests were selected for screening of toxicity of soil contaminated with mineral oil:

- *Acute bioassays:*
 - the ECHA test with the bacterium *Bacillus* sp.
 - an aquatic algae test
 - the rootgrowth inhibition test with lettuce
 - the immobility test with the nematode *Plectus acuminatus*
 - the immobility test with the springtail *Folsomia candida*
 - the immobility test with *Daphnia magna*
 - the Microtox test
- *Chronic bioassays*
 - a growth test with lettuce
 - a growth test with the springtail *Folsomia candida*
 - a growth test with the earthworm *Eisenia*

An extraction procedure with 0.001 M Ca(NO₃)₂ in demineralised water was selected to produce soil extracts for the acute bioassays.

Keywords**Controlled terms:****Uncontrolled terms:**

bioassays, ecotoxicology, mineral oil, biodegradation, risks

Project title

Effectivity of bioassays for monitoring and evaluation of environmental efficiency of in situ biorestauration

Project management

Mr. drs. J.J. van der Waarde

This report can be obtained at:

CUR/NOBIS, P.O. box 420, 2800 AK Gouda, The Netherlands

Dutch Research Programme In-Situ Bioremediation (NOBIS)

VOORWOORD

In het kader van NOBIS wordt op de locatie Petroleumhavenweg te Amsterdam een haalbaarheidsstudie uitgevoerd naar de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie. Bij bodemsanering ontstaat steeds meer behoefte aan locatiegerichte prognoses van actuele risico's die voortvloeien uit de aanwezigheid van verontreinigende stoffen in de bodem. Chemische analyses geven op indirecte wijze inzicht in de (potentiële) risico's. Als zodanig vormen chemische analyses een eerstelijnsbenadering. Met biologische analyses (bioassays) kunnen wél directe waarnemingen van actuele risico's worden verkregen. Met name bij biologische in-situbodemsanering zijn biologische analyses het gereedschap om de effectiviteit van het proces en het restrisico van het eindproduct te beoordelen.

Dit onderzoek sluit aan bij de NOBIS-doelstelling om een betere onderbouwing te geven aan het bepalen van risico's van bodemverontreiniging.

In dit rapport staat een literatuuroverzicht van verschillende bioassays en extractiemethoden die zijn gebruikt bij de beoordeling van de toxiciteit van verontreinigde grond. Het document kan worden gebruikt bij de selectie van methoden en technieken bij het beoordelen van toxische effecten van bodemverontreinigingen.

INHOUD

		SAMENVATTING	ix
		SUMMARY	xi
		NOTATIES	xiii
		BEGRIPPENLIJST	xv
Hoofdstuk	1	INLEIDING	1
Hoofdstuk	2	INVENTARISATIE EN VOORSTEL VOOR SELECTIE VAN BIOASSAYS	3
	2.1	Inleiding	3
	2.1.1	Geraadpleegde bronnen	3
	2.2	Bioassays	4
	2.2.1	Beoordeling actuele risico's	4
	2.2.2	Het nut van bioassays	5
	2.2.3	Aspecten van bioassays	7
	2.2.4	Testbatterij bioassays	10
	2.3	Inventarisatie van bioassays	11
	2.3.1	Afbakening	11
	2.4	Resultaten	12
	2.4.1	Algemeen	12
	2.4.2	Ervaringen per stofgroep	13
	2.4.3	Conclusies	22
	2.5	Voorstel selectie	23
	2.5.1	Selectiecriteria	23
	2.5.2	Acute bioassays	26
	2.5.3	Chronische bioassays	28
Hoofdstuk	3 SELECTIE VAN EEN EXTRACTIEMETHODE VOOR DE EERSTE STAP VAN ACUTE BIOASSAYS OP VERONTREINIGDE BODEM	31
	3.1	Inleiding	31
	3.2	Ervaring met extracties	31
	3.2.1	Ervaringen met extracties voor bioassays	31
	3.2.2	Testcondities	33
	3.2.3	Literatuuroverzicht van genormaliseerde uitloogtoetsen	34
	3.2.4	Discussie en conclusie	37
	3.3	Selectie van een extractiemethode	38
	3.3.1	Selectiecriteria	38
	3.3.2	Geselecteerde extractiemethode	39
	3.3.3	Extractieprocedure	41
Hoofdstuk	4	KARAKTERISERING EN SELECTIE DEELLOCATIES	43
	4.1	Inleiding	43
	4.1.1	Algemeen	43
	4.1.2	Doelstelling	43
	4.1.3	Gebruikte informatie	43
	4.2	Locatiebeschrijving	43
	4.2.1	Bodemopbouw	43
	4.2.2	Verontreinigings situatie	44
	4.2.3	Selectie criteria	46
	4.3	Selectie deellocaties	46
	4.4	Selectie monsternamepunten	47

	4.5	Selectie pilot	48
Hoofdstuk 5		CONCLUSIES EN AANPAK.....	49
	5.1	Extractiemethoden	49
	5.2	Bioassays	49
		LITERATUUR.....	51

SAMENVATTING

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie

In het kader van NOBIS wordt op de locatie Petroleumhavenweg te Amsterdam een haalbaarheidsstudie uitgevoerd naar de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbiorestauratie. Deze studie dient inzicht te geven in het ecotoxicologisch risico van met olie verontreinigde grond voor, tijdens en na een biologische in-situsanering. Na toetsing van de beschreven bioassays aan een reeks projectspecifieke selectiecriteria zijn de volgende testen geselecteerd voor het bepalen van toxiciteit van met minerale olie verontreinigde grond:

- **Acute-testbatterij**
 - de ECHA-test met de bacterie *Bacillus* sp.;
 - een aquatische algentest;
 - een wortelgroeiremmingtest met planten;
 - een immobiliteitstest met de nematode *Plectus acuminatus*;
 - een immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida*;
 - een immobiliteitstest met de watervlo *Daphnia magna*;
 - de Microtox-test.
- **Chronische-testbatterij**
 - een chronische test met sla;
 - een chronische test met springstaarten;
 - een chronische test met regenwormen.

Op basis van literatuuronderzoek is een nieuwe extractiemethode van grond voor acute bioassays opgesteld. De geselecteerde methode maakt gebruik van extractie met demiwater met 0,001 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Grondmonsters worden in een tweetrapsschudtest van in totaal 24 uur geëxtraheerd bij een vloeistof-vastestofverhouding van 1. Deze procedure loopt zo veel mogelijk parallel aan de meest relevante huidige Europese norm voor uitloging van verontreinigingen.

SUMMARY

Effectivity of bioassays for monitoring and evaluation of environmental efficiency of in situ biorestauration

In the framework of NOBIS a feasibility study is performed on the effectivity of bioassays in monitoring and assessment of the environmental efficiency of in situ biorestauration. The project is based on an oil contamination at the location Petroleumharbor in Amsterdam. This study should give insight into the ecotoxicological risks of oil contamination preceding, during and after in situ soil bioremediation. The reviewed bioassays were checked against a set of project-specific criteria and the following tests were selected for screening of toxicity of soil contaminated with mineral oil:

- **Acute bioassays:**
 - the ECHA test with the bacterium *Bacillus* sp.;
 - an aquatic algae test;
 - the rootgrowth inhibition test with lettuce;
 - the immobility test with the nematode *Plectus acuminatus*;
 - the immobility test with the springtail *Folsomia candida*;
 - the immobility test with *Daphnia magna*;
 - the Microtox test.
- **Chronic bioassays**
 - a growth test with lettuce;
 - a growth test with the springtail *Folsomia candida*;
 - a growth test with the earthworm *Eisenia*.

An extraction procedure with 0.001 M Ca(NO₃)₂ in demineralised water was selected to produce soil extracts for the acute bioassays. The extraction is performed during 24 hours in two steps with a liquid/solid ratio of 1. This procedure is in line with the existing relevant European guidelines for leaching of contaminants. The extraction in water as solvent seems the best alternative with respect to the requirements set by bioassays.

NOTATIES

NOEC	no observed effect concentration
LOEC	lowest observed effect concentration
ISO	international standard organisation
PCP	pentachloorfenol
PAK	polyaromatische koolwaterstof
PCB	polychloorbifenyyl
OECD	organisation for economic cooperation and development
DOC	dissolved organic carbon

BEGRIPPENLIJST

<i>Bioassay</i>	Experiment waarbij een testorganisme wordt blootgesteld aan een (extract van een) milieumonster om potentiële aanwezigheid vast te stellen van stoffen die een negatief effect hebben op dit testorganisme.
<i>Acuut</i>	Relatief simpele en kortdurende bioassays die effectparameters als mobiliteit, sterfte en enzymactiviteit meten. In dit rapport is een arbitraire grens van een maximale testduur van vijf dagen gelegd voor acute bioassays.
<i>Chronisch</i>	Relatief langdurige bioassays die effectparameters als groei en reproductie meten. In dit rapport is een arbitraire grens van een minimale testduur van vijf dagen gelegd voor chronische bioassays.
<i>Aquatische bioassay</i>	Bioassay die wordt uitgevoerd met water en met een organisme dat van nature voorkomt in water.
<i>(Im)mobiliteitstest</i>	Test waarbij wordt gescoord of het testorganisme ophoudt met bewegen.
<i>Ecotoxicologie</i>	Toxicologie van (onderdelen van) een ecosysteem (in tegenstelling tot humane toxicologie, die uitsluitend is gericht op effecten op de mens).
<i>HC50</i>	Concentratie waarbij 50% van de potentieel aanwezige soorten in een ecosysteem negatieve effecten kan ondervinden.
<i>Consument</i>	Organisme dat zich voedt met afvalstoffen. In dit rapport zijn dat bacteriën.
<i>Predator</i>	Organisme dat zich voedt met andere organismen.
<i>Producent</i>	Plant of ander organisme dat biomassa produceert met behulp van licht.
<i>Mutagene stof</i>	Stof die veranderingen in het erfelijk materiaal van een organisme veroorzaakt.
<i>Bioaccumulatie</i>	Ophoping van een stof in (weefsel van) een organisme tot verhoogde concentraties.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

Bij bodemsanering ontstaat steeds meer behoefte aan locatiegerichte prognoses van actuele risico's die voortvloeien uit de aanwezigheid van verontreinigende stoffen in de bodem. Chemische analyses geven op indirecte wijze inzicht in de (potentiële) risico's. Als zodanig zijn chemische analyses een eerstelijnsbenadering. Met biologische analyses (bijvoorbeeld bioassays) kunnen wél directe waarnemingen van actuele ecotoxicologische risico's worden verkregen. Bioassays zijn gestandaardiseerde laboratoriumexperimenten waarin levende testorganismen worden blootgesteld aan een milieumonster om vast te stellen of de aanwezige verontreinigingen negatieve effecten hebben op deze organismen. Met name bij biologische in-situbodemsanering zijn biologische analyses het gereedschap om de effectiviteit van het proces en het restrisico van het eindproduct te beoordelen.

Het Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS) heeft aan het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam, Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen, AquaSense, Bioclear, KEMA, Witteveen en Bos en de Vrije Universiteit Amsterdam opdracht verleend om de haalbaarheid te onderzoeken van het gebruik van bioassays om actuele ecotoxicologische risico's van verontreinigde grond te bepalen voor, tijdens en na biologische in-situsanering. Het belang van dit onderzoek is dat de risicoanalyse, gebaseerd op chemische analyse van de verontreinigingen, wordt ondersteund met informatie uit bioassays.

De doelstelling van het hier voorgestelde onderzoek is aan te tonen dat bioassays kunnen worden gebruikt om actuele ecotoxiciteit van verontreinigde grond te bepalen. Het belang van deze ontwikkeling is dat de risicoanalyse van verontreinigingen wordt ondersteund met aanvullende en meetbare informatie uit bioassays. Bepaling van de risico's van een restfractie na sanering dient een belangrijk element in dit onderzoek te zijn. De bioassays dienen bij gebleken haalbaarheid van de toepassing als complementair instrument bij de risicobeoordeling van bodemverontreiniging te kunnen worden toegepast.

Daarnaast dient in dit onderzoek duidelijk te worden wat de correlatie is tussen de uitkomst van de bioassays en de standaard voorgeschreven chemische analyses op verontreinigingsniveau.

Voor het onderzoek als geheel zijn de volgende onderzoeksvragen opgesteld:

1. Wat is het ecotoxicologische risico van verontreinigde grond voorafgaand aan een sanering?
2. Kan het risico van blootstelling als gevolg van verspreiding tijdens een sanering mede worden gebaseerd op een meetbare toxiciteit?
3. Wat is het ecotoxicologische eindresultaat van een (in-situ)sanering?

Het onderzoek wordt gekoppeld aan een biologische sanering van een met minerale oliën verontreinigde locatie aan de Petroleumhavenweg in Amsterdam, die onder de verantwoordelijkheid valt van het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam. Op deze locatie is behoefte aan aanvullende geplande informatie over de actuele milieurisico's van de verontreiniging en van de restverontreiniging na een beperkte extensieve biologische sanering. Door op- en overslagactiviteiten over een periode van meer dan honderd jaar is deze locatie verontreinigd met diverse minerale oliën tot een diepte van circa 4 m-mv en met concentraties van gemiddeld enkele honderden tot enkele duizenden mg olie per kg ds.

Omdat in het havengebied van Amsterdam veel van dergelijke verontreinigde locaties voorkomen, gaat de voorkeur uit naar biologische in-situtechnieken. De Petroleumhavenweg-locatie kan daarbij als voorbeeld dienen.

Het haalbaarheidsonderzoek is als volgt gefaseerd:

- fase 1: vooronderzoek;
- fase 2: veldmonitoring.

Fase 1 omvat het vooronderzoek voor de te gebruiken methoden en technieken, de karakterisering van de locatie en het haalbaarheidsonderzoek op het laboratorium. De subdoelen van fase 1 zijn:

1. geschikte, routinematig toepasbare acute en chronische bioassays identificeren;
2. geschikte extractieprocedures identificeren voor toepassing bij acute bioassays;
3. geschikte deellocaties identificeren en karakteriseren waar het (vervolg)onderzoek zal worden uitgevoerd;
4. een toxisch signaal aantonen met behulp van een of enkele bioassays op deze locaties;
5. aantonen van een respons van bioassays op biologische activiteit en verlaagde concentratieniveaus als gevolg van biologische sanering op laboratoriumschaal.

Dit rapport is de eerste tussenrapportage van fase 1 in het project *Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situbio restauratie* en bevat deelresultaat 1 zoals omschreven in het basisprojectplan van mei 1997 [Bioclear e.a., 1997].

Dit rapport bevat de volgende onderdelen uit het basisprojectplan:

1. identificeren van geschikte, routinematig toepasbare bioassays;
2. identificeren van geschikte extractieprocedures voor toepassing bij bioassays;
3. geschikte deellocaties identificeren en karakteriseren waar het (vervolg)onderzoek zal worden uitgevoerd.

Onderdeel 1, dat is uitgevoerd door AquaSense met medewerking van Witteveen en Bos en de Vrije Universiteit van Amsterdam, staat beschreven in hoofdstuk 2. Daarbij wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven bioassays voor het monitoren van verontreinigde grond. De ervaringen met de verschillende bioassays en de geschiktheid ervan voor monitoring en beoordeling van verontreinigde grond worden besproken. De bioassays worden getoetst aan een reeks selectiecriteria, waarna een set van bioassays wordt voorgesteld voor verdere toepassing.

Onderdeel 2, dat is uitgevoerd door KEMA, wordt beschreven in hoofdstuk 3. In dit hoofdstuk wordt dieper ingegaan op de verschillende methoden om verontreinigingen te extraheren uit bodemmateriaal. De principes van deze methoden worden besproken. Daarnaast wordt de relevantie van deze methoden voor het gebruik bij bioassays toegelicht. De methoden worden getoetst aan een reeks selectiecriteria, waarna een methode wordt voorgesteld voor toepassing binnen dit onderzoek.

Onderdeel 3, uitgevoerd door Bioclear met medewerking van Witteveen en Bos, komt in hoofdstuk 4 aan de orde. In dit hoofdstuk staat een locatiebeschrijving en wordt aangegeven op welke plaatsen van de locatie de monsternamen moet plaatsvinden en welke plaats geschikt is voor de uitvoering van een pilot in fase 2.

In hoofdstuk 5 worden de conclusies van deze deelonderzoeken samengevat en wordt een overzicht gegeven van te ondernemen acties.

HOOFDSTUK 2

INVENTARISATIE EN VOORSTEL VOOR SELECTIE VAN BIOASSAYS

2.1 Inleiding

Risicobeoordeling, saneringscriteria en beoordeling van het rendement van in-situbiorestauratie worden op dit ogenblik voornamelijk uitgevoerd aan de hand van chemische analyses van de verontreiniging. Het is onduidelijk in hoeverre deze chemische beoordelingen aansluiten bij de actuele toxiciteitsrisico's en wanneer de verontreinigde grond na reiniging weer als biologisch gezond kan worden beschouwd. Een van de knelpunten is het toxiciteitsrisico van een restfractie na een biologische bodemsanering. In aanvulling op chemische analyses is er daarom behoefte aan biologische parameters die kwantificeerbare informatie opleveren over de toxiciteit van grond voor, tijdens en na sanering.

Er zijn diverse bioassays bekend, maar er is weinig ervaring met de toepassing van deze bioassays bij bodemsanering. Dit betekent dat er geschikte bioassays moeten worden geïdentificeerd, waarna in de praktijk kan worden onderzocht in hoeverre deze bioassays kunnen worden gebruikt om de saneringsvoortgang en de resterende ecotoxiciteit te monitoren.

Bij gebleken haalbaarheid van de toepassing moeten de bioassays kunnen worden toegepast als complementair instrument bij de risicobeoordeling van (restfracties van) bodemverontreiniging. Ook dient in dit onderzoek duidelijk te worden wat de correlatie is tussen de uitkomst van de bioassays en de standaard toegepaste chemische analyses op verontreinigingniveau.

Het doel van deze literatuurstudie is geschikte, routinematig toepasbare bioassays te identificeren. Criteria hierbij zijn:

- gevoeligheid, met name voor minerale olie;
- ontwikkelingsstatus van de methode;
- referentie-informatie;
- eenvoud;
- type organismen;
- toepasbaarheid voor bodem.

De studie is breed opgezet en is erop gericht om verontreinigde grond te beoordelen met zowel acute als chronische bioassays. Door deze brede opzet kan dit rapport dienen als referentiedocument. De volgende stofgroepen komen aan de orde: minerale olie, PAK's, zware metalen, bestrijdingsmiddelen en mengsels van verontreinigingen. De nadruk bij de selectie van bioassays is echter gelegd op toepassing van bioassays bij het monitoren van bodems die zijn verontreinigd met organische verontreinigingen (minerale olie en PAK's) voor, tijdens en na sanering.

2.1.1. Geraadpleegde bronnen

Er zijn al verschillende studies uitgevoerd waarin is beschreven of geïnventariseerd welke testen er beschikbaar zijn voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Voor de inventarisatie is een aantal goed beschikbare bronnen geraadpleegd om daaruit geschikte testen te kunnen selecteren.

Deze bronnen zijn:

- rapporten van onder andere het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM), United States Environmental Protection Agency (EPA), Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA) en de Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO);
- OECD- en ISO-richtlijnen;
- de eindrapporten van het *SECOFASE*-project [Løkke en Van Gestel, 1998] en het *National Contaminated Sites Remediation Program* (NCSRP; Keddy e.a., 1994);
- het tijdschrift *Environmental Toxicology and Chemistry* (1994 tot begin 1997);
- diverse handouts, onder andere uitgereikt tijdens het *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*-symposium (SETAC) in Amsterdam (april 1997) en het Duitstalige SETAC-symposium in Aken (februari 1997);
- diverse artikelen die beschikbaar zijn bij AquaSense of zijn aangereikt door de overige leden van het consortium.

Met nadruk wordt gesteld dat er géén uitgebreide (on-line)literatuurresearch is uitgevoerd met als doel alle beschikbare bioassays te inventariseren die voldoen aan de gehanteerde voorselectiecriteria. Dit was ook geen doel van dit onderzoek. De inventarisatie op basis van bovenstaande bronnen geeft echter wel een goed en betrouwbaar overzicht van de huidige stand van zaken op dit gebied (eind 1997).

Dit hoofdstuk is als volgt opgebouwd. In paragraaf 2 wordt nader ingegaan op wat bioassays zijn en waarvoor ze kunnen worden gebruikt. In paragraaf 3 wordt aangegeven hoe er is gekomen tot een inventarisatie van de beschikbare bioassays. De resultaten van deze inventarisatie worden in paragraaf 4 weergegeven en kort besproken. Ten slotte wordt in paragraaf 5 een voorzet gegeven om te komen tot selectie van een testbatterij bioassays.

2.2 Bioassays

In deze paragraaf wordt allereerst kort ingegaan op de huidige methode ter beoordeling van het actuele ecotoxicologische risico van bodemverontreiniging en op de tekortkomingen van deze methode (paragraaf 2.2.1). Vervolgens wordt in paragraaf 2.2.2 aangegeven hoe bioassays een rol kunnen spelen in deze risicobeoordeling. In paragraaf 2.2.3 wordt nader ingegaan op de typen bioassays die er zijn en op de aspecten waarmee rekening moet worden gehouden bij de uitvoering van bioassays. In paragraaf 2.2.4 wordt aangegeven waarom het noodzakelijk is om meerdere verschillende bioassays tegelijkertijd in te zetten (testbatterij).

2.2.1 Beoordeling actuele risico's

Om te bepalen hoe urgent een sanering is, worden de potentiële en actuele risico's bepaald. Deze risico's kunnen bestaan uit humane risico's, ecologische risico's en verspreidingsrisico's. Een sanering van een minerale-olieverontreiniging op basis van humane risico's is urgent als de interventiewaarde is overschreden (5000 mg/kg ds voor een standaard bodem), als er meer dan 25 m³ grond/bodem of meer dan 100 m³ grondwater is verontreinigd en als er een bepaalde mate van blootstelling mogelijk is.

Een actueel ecologisch risico bestaat als de verontreiniging zich bevindt boven de Gemiddelde Hoogste Grondwaterstand (GHG) of in de bovenste 1,5 m beneden maaiveld. Een sanering op ecologische gronden is urgent als de HC50 (de concentratie waarbij 50% van de potentieel aanwezige soorten in een ecosysteem negatieve effecten kunnen ondervinden) wordt overschreden. Voor minerale olie is geen HC50 vastgesteld.

Actuele verspreidingsrisico's worden vooral bepaald door de aanwezigheid van drijfvlagen, dichtheidstroming of transport in de onverzadigde zone. Als meer dan 100 m³ grondwater boven de interventiewaarde is verontreinigd of per jaar verontreinigd dreigt te worden, is er sprake van een actueel risico.

Het actuele risico van verontreinigde bodems kan dus behalve op humane en verspreidingsrisico's worden gebaseerd op actuele ecologische risico's. Het actuele ecologische risico wordt hierbij tot nu toe hoofdzakelijk gebaseerd op chemische informatie. Deze normen (HC50-waarden) worden afgeleid van de resultaten van stoffesten, eventueel na toepassing van veiligheidsfactoren bij gebrek aan data. Bij het vaststellen van deze grenzen wordt geprobeerd om in te schatten aan welke fractie de organismen daadwerkelijk worden blootgesteld. Bij deze inschatting wordt uitgegaan van een generieke (algemeen geldende) situatie.

Deze prognostische benadering is vooral beleidsmatig bruikbaar om normen te kunnen stellen aan de gehalten/concentraties waarin verontreinigingen mogen voorkomen in water, (water)bodem en lucht. Bij overschrijding van de gestelde norm bestaat de mogelijkheid dat er negatieve effecten optreden. De prognostische benadering leidt dus tot de vaststelling van potentiële risico's. Zoals al is vermeld, ontbreekt de HC50-norm voor minerale olie.

Om de daadwerkelijke ecologische risico's op een bepaalde locatie te kunnen beoordelen, schiet een dergelijke risicobeoordeling op een aantal punten tekort:

- Bij een chemische analyse wordt slechts een beperkt deel van de in het milieu aanwezige toxicanten onderzocht, zodat het niet mogelijk is om te komen tot een totaalbeeld van de verontreiniging en de risico's.
- Als er sprake is van een mengsel van toxicanten, kunnen er moeilijk te voorspellen combinatiewerkingen optreden.
- In het milieu gebrachte stoffen kunnen worden afgebroken tot een scala van afbraakproducten (metabolieten) die minder toxisch, even toxisch of toxischer kunnen zijn dan de uitgangsstof.
- Voor een deel van deze stoffen en/of hun metabolieten zijn (nog) geen analysetechnieken beschikbaar.
- De verdeling van toxicanten tussen de vaste fase van de bodem en het poriewater wordt bepaald door locatiespecifieke omstandigheden. Alleen de opgeloste of snel uitwisselbare fractie toxicanten wordt voor organismen als toxisch beschouwd.

In de praktijk blijkt het daarom moeilijk te zijn om de milieurisico's te voorspellen op basis van chemische en fysische parameters [Brils en Den Besten, 1995].

2.2.2 *Het nut van bioassays*

Een antwoord (vanuit de ecotoxicologie) op de in paragraaf 2.1 geschetste problematiek is de bioassay. In een bioassay worden alle gecombineerde effecten gemeten in een somparameter: toxiciteit. De onzekerheden bij chemische analyses spelen hier geen rol. Meting van toxiciteit aan de hand van waar te nemen effecten bij levend materiaal is daarom de meest realistische benadering om risico's van verontreinigingen te onderzoeken [De Pauw e.a., 1992].

Bioassays kunnen als volgt worden gedefinieerd (gemodificeerd naar Hill e.a., 1993): 'Een bioassay is een experiment waarin één soort testorganisme (plant of dier) in het laboratorium of in het veld wordt blootgesteld aan een (extract van een) milieumonster (oppervlaktegrondwater of -afvalwater, waterbodem, grond enzovoort). Het doel van deze bioassay is te meten of de potentiële aanwezigheid van een of meer verontreinigingen in dit monster negatieve effecten veroorzaakt bij dit organisme.'

Wie effecten wil voorspellen op basis van (een beperkte set) chemische analyses, begeeft zich in een grijs gebied omgeven met onzekerheden. Het is namelijk lastig om met grote zekerheid uit te maken of en in welke mate de gemeten stoffen een effect veroorzaken. Behalve de gemeten stoffen zijn er namelijk diverse andere (abiotische en biotische) factoren die een rol spelen bij het veroorzaken van een effect bij organismen. Bovendien blijven voorspellingen gebaseerd op chemische analyses beperkt tot de chemisch (en fysisch) gemeten en meetbare factoren.

Bioassays geven een indruk van het daadwerkelijk aanwezige toxische effect van een monster. Anderzijds geeft een gemeten effect in een bioassays slechts een indicatie van de stoffen die (mede)verantwoordelijk zijn voor dit effect. Om de oorzaak van een gemeten effect te analyseren, zijn (uitvoerige) chemische analyse van en inzicht in de specifieke toxiciteit van de individuele stoffen voor de betreffende organismen noodzakelijk. Bioassays en chemische analyses hebben dus ieder hun eigen specifieke waarde voor de milieuhygiënische beoordeling van verontreinigde grond- en watermonsters: ze geven complementaire informatie [Brils en Den Besten, 1995].

Bioassays worden in Nederland op vele manieren gebruikt, onder andere:

- voor algemeen onderzoek om de toestand van het milieu te beschrijven (monitoringprogramma's);
- voor onderzoek naar de saneringsurgentie en/of saneringsprioriteit van gevallen van ernstige (water)bodemverontreiniging;
- bij beoordeling van de toelaatbaarheid van baggerspecieverspreiding in oppervlaktewateren;
- bij stofbeoordeling (bioassays worden voor dit doel aangeduid als 'toxiciteitstesten');
- bij afvalwaterbeoordeling in het kader van de verlening van lozingsvergunningen en de effectiviteitbeoordeling van zuiveringstechnieken;
- bij de beoordeling van de effecten van een bepaalde baggerspecieverwerkingstechnieken en bij de milieuhygiënische beoordeling van verwerkte sedimentmonsters.

Binnen de urgentiesystematiek voor sanering van landbodems wordt wel melding gemaakt van mogelijk gebruik van bioassays. Als er geen actuele risico's zijn, kan het bevoegd gezag toch besluiten dat een geval van bodemverontreiniging urgent is als uit veldonderzoek of bioassays blijkt dat er negatieve effecten optreden voor het ecosysteem.

In dit onderzoek wordt een aantal bioassays geselecteerd en toegepast bij een (aantal) bodemsaneringgeval(len). De te selecteren bioassays dienen op de volgende wijze te kunnen worden toegepast:

- bij de beoordeling van verontreinigde grond voorafgaande aan een sanering (op deze wijze kan de risicobeoordeling mede worden gebaseerd op ecotoxiciteit);
- bij het monitoren van het verloop van een (in-situ)sanering, zodat het rendement van de sanering mede kan worden gebaseerd op een meetbare en kwantificeerbare toxiciteit;
- bij de beoordeling van het eindresultaat van een (in-situ)sanering, zodat naast een chemische analyse van het gehalte van een eventuele restfractie eveneens inzicht wordt verkregen in het actuele risico (toxiciteit) van deze restfractie en/of de nog aanwezige niet geïdentificeerde stoffen.

2.2.3 Aspecten van bioassays

Bioassays zijn onder te verdelen in een aantal typen. Daarnaast is er op het gebied van bioassays een aantal aspecten die nadere toelichting verdienen. Achtereenvolgens worden besproken:

- lab- en veldbioassays;
- single-species- en multi-speciesbioassays;
- parameters;
- geteste medium;
- acute en chronische bioassays;
- screeningstesten en het testen van een verdunningsreeks;
- biologische beschikbaarheid;
- randvoorwaarden;
- geldigheidscriteria.

Lab- en veldbioassays

Bioassays die worden gebruikt voor bodembeoordeling, kunnen worden onderverdeeld in laboratoriumbioassays (ofwel labbioassays) en veldbioassays. Lab- en veldbioassays zijn experimenten waarin bepaalde organismen in het lab of in het veld worden blootgesteld aan een (extract van een) te beoordelen bodem(monster) met als doel te beoordelen of de verontreinigingen in de bodem in die mate aanwezig zijn dat ze negatieve effecten veroorzaken bij deze testorganismen (zie 2.2).

Bij labbioassays wordt de actuele bodemkwaliteit op één bepaald tijdstip beoordeeld, namelijk op het tijdstip van de bemonstering. Labbioassays worden uitgevoerd aan de hand van standaardprotocollen die behalve de wijze van uitvoering ook zaken beschrijven als: de monstername- en behandeling, randvoorwaarden voor uitvoering, geldigheid van de testresultaten en statistische verwerking van de testresultaten. De opzet van de bioassay en de mate van standaardisering van uitvoering bepalen uiteindelijk hoe betrouwbaar het resultaat van de bioassay is.

Bij veldbioassays worden organismen gedurende een bepaalde tijd in een experimentele veldopstelling blootgesteld, bijvoorbeeld in een *enclosure* (bijvoorbeeld een plastic buis die in de grond wordt geslagen). Het resultaat van een veldbioassay zegt iets over de gemiddelde kwaliteit van de bodem tijdens de blootstellingperiode.

Single-species- en multi-speciesbioassays

Bij bioassays kan gebruik worden gemaakt van één organisme per testvat (*single species*) of van meerdere soorten organismen per testvat (*multi species*). Door gebruik te maken van één soort testorganisme per testvat (single-speciestest) en door te streven naar een zo hoog mogelijke graad van standaardisering (organismen afkomstig van een gestandaardiseerde kweek en dezelfde leeftijd bij aanvang van de bioassay), kan variatie in de bioassay-uitkomsten zo veel mogelijk worden onderdrukt. Bioassays waarin gebruik wordt gemaakt van meer dan één soort testorganisme per testvat (multi-speciestest), zijn realistischer op het punt van vergelijkbaarheid met de veldsituatie. In de veldsituatie worden namelijk ook alle aanwezige organismen in één systeem blootgesteld aan de verontreiniging.

Behalve de verontreiniging kan ook de interactie tussen de soorten onderling een bijdrage leveren aan de mate van effect. Als organismen er bijvoorbeeld ook nog energie in moeten steken om hun predatoren te ontwijken, houden ze minder energie over om het hoofd te bieden aan verontreinigingen. Daardoor worden ze in theorie gevoeliger. Multi-speciestesten zijn echter veel lastiger uit te voeren (en dus moeilijker te standaardiseren) en daardoor vele malen duurder. Deze testen worden dan ook slechts af en toe ingezet voor de beoordeling van de (water)bodemkwaliteit.

Parameters

In labbioassays kunnen drie parameters worden gemeten:

- toxiciteit: het meten/detecteren van de directe (biologische) respons van individuen op toxicanten (effectparameters voor de meting van toxiciteit betreffen onder andere sterfte, mobiliteit, groei, reproductie, populatiegroei enzymactiviteit en dergelijke);
- bioaccumulatie: het meten/detecteren van opgenomen chemische stoffen in (delen van) testorganismen;
- mutageniteit: het beoordelen van de bodem op de aanwezigheid van mutageniteit of genotoxiciteit (duidend op de aanwezigheid van genotoxische stoffen).

Testmedium (matrix)

Er kunnen testen worden uitgevoerd die zijn gericht op de beoordeling van de verontreinigde bodem als geheel, maar het is ook mogelijk om een waterige fractie uit de bodem te winnen (poriewater) of te bereiden (elutriaat) en om daar vervolgens de bioassays mee uit te voeren. Uit diverse onderzoeken is gebleken dat de verontreiniging in een bodem voor het grootste deel via de waterige fractie (poriewater of grondwater) beschikbaar is voor bodemorganismen. De voornaamste opname vindt dus plaats via het bodemvocht [Forge e.a., 1993; Giesy e.a., 1990; Green e.a., 1993; Guchte e.a., 1996; Van Gestel, 1997]. Dit wordt gezien als een belangrijke motivatie om bij de beoordeling van verontreinigde grondmonsters uit te gaan van blootstelling van organismen aan de waterige fractie uit deze bodem.

Daarnaast is lastiger om te werken met een volledig grondmonster doordat de testdieren zich kunnen verstoppen. Bij acute testen waarin bijvoorbeeld wordt beoordeeld op de parameter 'sterfte', is het lastig om overleden dieren terug te vinden. Bij chronische testen is dit minder een probleem omdat dode bodemdieren relatief snel worden afgebroken, zoals bijvoorbeeld het geval is bij chronische testen met regenwormen en springstaarten. Hier wordt dan gesteld dat dieren die niet meer worden teruggevonden, dood zijn.

Verder moet bij het testen van volledige grondmonsters rekening worden gehouden met bepaalde eigenschappen, zoals korrelgrootteverdeling en organische-stofgehalte van die grond, omdat algemeen bekend is dat deze eigenschappen veel invloed kunnen hebben op de toxiciteit. Als er echter wordt getest met de waterige fractie van een grondmonster, kunnen bepaalde bodemeigenschappen minder invloed uitoefenen. Dit maakt het beter mogelijk om de resultaten te vergelijken van testen die zijn uitgevoerd met een waterige fractie.

Door de waterige fractie van de grond te gebruiken, wordt het mogelijk om ook aquatische testen in te zetten voor de beoordeling van terrestrische bodems. Aquatische testen worden al langere tijd toegepast voor de beoordeling van oppervlaktewater, effluent en waterbodem. Er is dus meer ervaring met deze testen, en de testmethoden zijn veelal (internationaal) gevalideerd. Daarnaast zijn voor aquatische testen voor veel stoffen toxiciteitgegevens beschikbaar in de literatuur.

De relevantie van aquatische testen om het actuele ecotoxicologische risico in de bodem te bepalen, is echter laag. Testen met terrestrische organismen verdienen daarom de voorkeur. Zolang geschikte terrestrische testen nog niet voorhanden zijn, kunnen aquatische testen eventueel als tussenoplossing worden gebruikt. Zie hoofdstuk 3 voor meer details over de bereiding van waterige testmedia.

Acute en chronische bioassays

Labbioassays waarin toxiciteit wordt gemeten, zijn acuut of chronisch. Dit kan af van de blootstellingduur en de levenscyclus van het organisme. Acute testen duren enkele minuten tot enkele dagen, waarbij meestal uitsluitend naar sterfte wordt gekeken. Chronische testen daarentegen duren dagen tot weken, waarbij de testduur een belangrijk deel van de levensduur van het organisme beslaat. In dit type bioassay worden meestal subletale (niet-dodelijke) effecten gemeten, zoals reproductie, ontwikkeling en groei. Chronische testen leveren meestal gevoeligere testresultaten op dan acute testen vanwege de langere blootstellingduur en de gevoeligere effectparameters.

Omdat elk organisme een andere levenscyclus heeft, zou per organisme de grens tussen acuut en chronisch moeten worden vastgesteld. Omwille van de eenduidigheid is in deze studie - hoewel dit wetenschappelijk gezien niet geheel juist is - de grens tussen acuut en chronisch arbitrair op vijf dagen gesteld. Deze grens is mede ingegeven door praktische argumenten (testresultaat binnen een week).

De huidige bodemnormen zijn voorzover beschikbaar gebaseerd op subletale toxiciteitgegevens (NOEC-waarden, zie hieronder) die zijn verkregen uit chronische toxiciteitstesten. Dat betekent dat acute effecten pas mogen worden verwacht bij flinke normoverschrijdingen, tenzij er sprake is van bijvoorbeeld combinatiewerking of aanwezigheid van verontreinigingen die niet zijn geanalyseerd.

Screening/verduunningreeks

Bioassays kunnen in twee stappen worden uitgevoerd. In de eerste stap, die vaak wordt overgeslagen, wordt er gekeken of blootstelling aan het onverdunde milieumonster (bodem, elutriaat of poriewater) een significant negatief effect oplevert (de screening). Als de blootstelling aan een onverdund monster meer dan 50% effect veroorzaakt, is vervolgonderzoek zinvol (de tweede stap). In dit vervolgonderzoek wordt het monster in een aantal stappen bijvoorbeeld steeds 50% verdund: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% van het oorspronkelijke monster (andere en/of meer of minder stappen zijn ook mogelijk).

Na deze procedure kunnen diverse effectparameters worden berekend, zoals:

- *EC50*. 'EC' staat voor 'effectconcentratie'. De EC50 is de geschatte concentratie toxicant of monster (grond, extract) waarbij de helft van de testorganismen een bepaald effect laat zien (bijvoorbeeld immobiliteit) na een bepaalde blootstellingduur.
- *NOEC*. 'NOEC' betekent 'no observed effect concentration'. Dit is de testconcentratie met de grootste hoeveelheid toxicant of monster (grond, extract) waarbij géén significant verschil kan worden aangetoond in vergelijking met de controle.
- *LOEC*. 'LOEC' betekent 'lowest observed effect concentration'. Dit is de testconcentratie met de laagste hoeveelheid toxicant of monster (grond, extract) waarbij een significant verschil kan worden aangetoond in vergelijking met de controle.

Biologische beschikbaarheid

De biologisch beschikbare fractie van een stof is het deel van deze stof in grondwater of bodem dat kan worden opgenomen door levende organismen. Dit is dus de fractie waaraan deze organismen daadwerkelijk worden blootgesteld (actuele blootstelling). De actuele blootstelling wordt beïnvloed door abiotische en biotische factoren, zoals blootstellingduur, temperatuur, pH, redoxpotentiaal, organische-stofgehalte, saliniteit, kat- en anionuitwisselcapaciteit, microbiële activiteit (afbraak), oppervlakte-inhoudratio van organismen, (consumptie)gedrag, voedingstoestand en leeftijd [Van Leeuwen en Hermens, 1995]. Bovendien hebben de meeste van deze factoren ook weer een invloed op elkaar. Dit maakt het zeer lastig om de actuele blootstelling accuraat te voorspellen [STOWA, 1997].

Randvoorwaarden

Voor enkele fysische en chemische parameters worden vaak criteria ofwel randvoorwaarden opgesteld waaraan een matrix moet voldoen om geschikt te zijn als testmedium. Voor bioassays met de waterige fractie van de bodem worden voorlopig de parameters gemeten die gebruikelijk zijn voor aquatische testen, namelijk pH, zuurstofgehalte, nitrietgehalte, ammoniumgehalte, geleidbaarheid en temperatuur [AquaSense, 1997b]. Er zijn echter niet of nauwelijks randvoorwaarden beschikbaar voor deze parameters. Voor het direct testen van bodem beperken de randvoorwaarden zich meestal tot het organische-stofgehalte, de pH, het vochtgehalte en de temperatuur waarbij de test moet worden uitgevoerd.

Randvoorwaarden zijn voor ieder testorganisme anders. Bij overschrijding van de gestelde randvoorwaarde voor een of meerdere van deze abiotische parameters, kan worden verwacht dat het testresultaat wordt beïnvloed [Brils en Den Besten, 1995]. Voorafgaand aan de test kunnen eventuele overschrijdingen van de pH en zuurstofgehalte in de waterige fractie worden aangepast. Voor de bodem is nog weinig ervaring met de aanpassing van randvoorwaarden, met uitzondering van pH-verhoging met van CaCO_3 . Als de criteria tijdens de test worden overschreden, is de test ongeldig en moet deze opnieuw worden uitgevoerd.

Geldigheidscriteria

Omdat de mate van effect behalve door de hoeveelheid toxicant wordt bepaald door diverse factoren (onder meer biologische beschikbaarheid, leeftijd en beweeglijkheid van het testorganisme), is het voor een goede interpretatie noodzakelijk om het resultaat te vergelijken met dat van een relatief schone referentiebodem met vergelijkbare karakteristieken, met het poriewater of elutriaat van een referentiebodem en/of met het verdunningswater in het geval van testen met poriewater of elutriaat. In protocollen worden de minimumspecificaties (criteria of voorwaarden) aangegeven waaraan deze referentie- of controletestresultaten moeten voldoen om te kunnen spreken van een geldige test. Omdat ieder testorganisme anders is, gelden voor ieder organisme specifieke geldigheidscriteria.

Geldigheidscriteria hebben betrekking op het functioneren van het biologisch materiaal onder niet-toxische condities. Afhankelijk van het testorganisme kan het geldigheids criterium een minimumoverlevingspercentage, een minimumkiemingspercentage, een minimale groei, een bepaald aantal nakomelingen of een maximale variatie tussen meetgegevens zijn [Brils en Den Besten, 1995].

2.2.4 Testbatterij bioassays

Tussen verschillende soorten testorganismen kunnen er grote verschillen zijn in gevoeligheid voor specifieke toxicanten. Een factor 10.000 verschil in gevoeligheid tussen soorten is niet onrealistisch [Brils en Den Besten, 1995]. De gevoeligheid van een bepaalde soort voor een specifieke toxicant is sterk afhankelijk van de opnamekinetiek, die bepalend is voor de interne (residu)concentratie na een bepaalde blootstellingduur en het werkingsmechanisme van de toxicant (effecten op enzymsystemen, zenuwstelsel, organen, mobiliteit, reproductie en dergelijke). Een bepaald testorganisme kan dus voor een toxicant zeer gevoelig zijn en voor een andere juist helemaal niet. Er bestaat dus niet zoiets als 'het gevoeligste testorganisme'. In het algemeen wordt daarom aanbevolen om meerdere bioassays te gebruiken. De samenstelling van zo'n set van verschillende bioassays (testbatterij) hangt af van onderzoeksdoel. Vanuit financieel oogpunt is het logisch om voor elk van de toepassingen een minimumset te definiëren.

Er zijn diverse criteria denkbaar voor de selectie van een testbatterij van geschikte bioassays. Drie wetenschappelijke criteria [Van Straalen en Verkleij, 1991; Van Straalen en Van Gestel, 1993] hiervoor zijn:

- Taxonomisch nauw verwante soorten lijken wat betreft gevoeligheid meer op elkaar dan minder verwante soorten. Het is dan ook raadzaam om soorten te selecteren die taxonomisch zo ver mogelijk van elkaar af staan.
- Het is aan te bevelen om soorten met een verschillende ecologische rol (ecologische relevantie) te selecteren, of nog beter, soorten die op een verschillende manier hun voedsel verwerven (verschillend trofisch niveau).
- Een testbatterij zou moeten bestaan uit organismen die via verschillende relevante routes worden blootgesteld aan de toxicant(en). Voor land- en waterbodems kunnen dit zijn: via verontreinigd poriewater, door ingestie van verontreinigd materiaal en door directe opname uit (bodem)lucht.

Behalve door deze criteria wordt de keuze met name bepaald door praktische criteria. Zaken die een grote rol spelen, zijn de beschikbaarheid van de organismen (makkelijk te kweken of verkrijgen), de handelbaarheid (goede overleving in voorraad of kweek, makkelijk te manipuleren), de beschikbaarheid van voldoende wetenschappelijke achtergrondinformatie, de tolerantie voor de variatie in fysische en chemische eigenschappen van sedimenten en de beschikbaarheid van een goede testmethode [Hill e.a., 1993]. Maar ook zaken als onderscheidend vermogen, testduur (liefst niet te lang) en kosten zijn van belang. Als geprobeerd wordt om ook een relatie te leggen met de veldwaarnemingen, dan wordt er bij voorkeur gekozen voor inheemse organismen die voorkomen in het Nederlandse (water)bodemmilieu of voor soorten die daarmee sterk verwant zijn.

In deze studie zijn de volgende specifieke selectiecriteria aangelegd bij de keuze van de te onderzoeken bioassays:

- gevoeligheid, met name voor minerale olie;
- ontwikkelingsstatus van de methode (protocol);
- referentieinformatie;
- eenvoud;
- type organismen;
- toepasbaarheid voor bodem.

2.3 Inventarisatie van bioassays

2.3.1 Afbakening

Om tot een selectie van een testbatterij bioassays te komen, is allereerst geïventariseerd welke bioassays mogelijk geschikt zijn voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Hierbij zijn de volgende beperkingen opgelegd (voorselectiecriteria):

- De bioassay betreft een labbioassay. Dit houdt in dat organismen in het laboratorium worden blootgesteld aan een (extract van een) monster uit het veld.
- De bioassay maakt gebruik van het organisme in zijn geheel. Dit betekent dat testen waarbij het organisme op een of andere wijze moet worden opgewerkt, bijvoorbeeld ter bepaling van biomarkers of enzymactiviteit, buiten beschouwing zijn gelaten.
- Met de bioassay worden uitsluitend toxische effecten gemeten. Dit betekent dat mutageniteitstesten en bioaccumulatiebepalingen buiten beschouwing zijn gelaten.
- De bioassay betreft een single-speciesbioassay. Hiervoor is gekozen omwille van de standaardiseerbaarheid en praktische uitvoerbaarheid.
- De bioassay maakt gebruik van terrestrische organismen of van aquatische organismen maar is reeds regelmatig gebruikt voor de beoordeling van verontreinigde bodem (bijvoorbeeld in DECHEMA-kader).

In het basisprojectplan voor dit onderzoek is aangegeven dat de inventarisatie van bioassays zou worden gericht op relatief goedkope, eenvoudige en snelle (acute) bioassays. Omdat chronische bioassays relatief duur en complex zijn, zo is gesteld, voldoen deze niet aan deze selectiecriteria

en vallen ze buiten het aandachtsveld. De inventarisatie van uitsluitend acute bioassays leverde echter vrijwel alleen bioassays op die uitgaan van blootstelling van de test-organismen aan een waterige fractie (elutriaat of poriewater) en niet aan de verontreinigde grond zelf. Dit is niet in overeenstemming met het gestelde criterium dat een geschikte testbatterij moet bestaan uit organismen die via verschillende relevante routes worden blootgesteld aan toxicanten, waaronder ingestie van verontreinigd materiaal. Om ook een overzicht te verkrijgen van technieken die wél uitgaan van een directe beoordeling van grond, is daarom besloten om ook chronische bioassays te inventariseren.

De simultane toepassing van acute en chronische bioassays is ook wenselijk omdat er een beter inzicht wordt verkregen in de waarde van de resultaten van acute bioassays door de testresultaten te vergelijken [AquaSense, 1997b].

2.4 Resultaten

In deze paragraaf worden de resultaten van de bioassayvoorselectie besproken. Allereerst wordt een aantal algemene zaken besproken. Vervolgens wordt per stofgroep aangegeven welke ervaringen er zijn met de beoordeling van verontreinigde bodems. Ten slotte worden de conclusies weergegeven.

2.4.1 Algemeen

In tabel 1 staat een overzicht van de bioassays die zijn geïnventariseerd op basis van de voorselectiecriteria. Hierbij is een duidelijk onderscheid gemaakt tussen acute en chronische bioassays.

Uit de geraadpleegde literatuur blijkt dat testen met bodemorganismen voornamelijk zijn ontwikkeld voor de beoordeling van stoffen (toxiciteitstest). Testen die specifiek zijn ontwikkeld voor het testen van verontreinigde bodems (bioassays), bestaan nog nauwelijks. Een test die als stofftest is ontwikkeld, kan echter in veel gevallen (al dan niet met enige aanpassing) wel geschikt zijn voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Voorbeelden hiervan zijn onder andere drie veel toegepaste testen: de 'terrestrial plants, growth test' [OECD, 1984d], de 'earthworm, acute toxicity test' [OECD, 1984c] en de springstaartenreproductietest (ISO, in voorber. (a)). Daarnaast blijkt dat veel terrestrische testen die in de literatuur zijn beschreven nog in een ontwikkelingsstadium verkeren en dat er nog weinig bekend is over de randvoorwaarden en over de geldigheid- en beoordelingscriteria.

Wat opvalt na beschouwing van de geïnventariseerde testen, is dat er bij acute testen in vrijwel alle gevallen gebruikt wordt van elutriaat terwijl in chronische testen de bodem in zijn geheel wordt getest.

2.4.2 Ervaringen per stofgroep

Er zijn bioassays gebruikt om bodems te beoordelen die waren verontreinigd met een scala van toxische stoffen. Hieronder worden de ervaringen per stofgroep apart toegelicht. Daarbij ligt de meeste nadruk op de ervaringen met de beoordeling van grond die is verontreinigd met minerale olie, omdat deze ervaringen het relevantst zijn voor het vervolgonderzoek. Bovendien ligt de meeste nadruk op de ervaringen in Nederland, want deze ervaringen hebben de meeste relevantie voor de toepassing van bioassays in de Nederlandse situatie. Deze ervaringen zijn aangevuld met de ervaringen uit onze buurlanden Duitsland (DECHEMA-kader), België en Groot-Brittannië en eventueel met ervaringen uit de Verenigde Staten.

Minerale olie

In 1997 is in opdracht van STOWA een rapport samengesteld waarin onder andere de toxiciteit van minerale olie voor aquatische milieus wordt beschreven [STOWA, 1997]. Minerale olie is een complex mengsel van zeer veel verschillende stoffen. Er bestaan vele soorten minerale olie die ecotoxicologisch gezien van elkaar verschillen. Olie heeft een grote affiniteit voor organisch materiaal en accumuleert daarom in organismen [Stortelder e.a., 1989]. Minerale olie bestaat voor 50 tot 98% uit koolwaterstoffen [Clark en Brown, 1977].

De vijf belangrijkste stofgroepen zijn alkanen, cyclo-alkanen, monocyclische aromaten (benzeen, toluen, xyleen) en di- en polycyclische aromaten [Scholten e.a., 1993]. Er zijn nog weinig toxiciteitsgegevens bekend voor minerale olie. Voor vissen, kreeftachtigen en insecten zijn de meeste minerale-oliecomponenten weinig giftig (acute EC50 > 10 mg/l en chronische NOEC > 0,1 mg/l). Voor algen zijn geen toxiciteitsgegevens bekend [Van Rijn e.a., 1995].

Een goed overzicht van de toxische effecten van olie in aquatische milieus wordt gegeven door Scholten e.a. [1993 en 1996]. Verwacht mag worden dat de werkingsmechanismen voor terrestrische milieus niet wezenlijk zullen verschillen. Van koolwaterstoffen (het hoofdbestanddeel van minerale olie, zie boven) is bekend dat ze een narcotiserende en dus vergelijkbare werking hebben. De toxiciteit van deze stoffen kan daarom worden opgeteld. Hierbij neemt de mate van toxiciteit toe met de mate van lipofiliteit: benzeen, toluen, xyleen en naftaleen. Dit inzicht is echter gebaseerd op literatuurgegevens (acute EC50 en chronische NOEC's) van relatief kortdurende toxiciteitstesten. Bij langer durende testen kunnen aromaten wel een specifiek werkingmechanisme vertonen, waardoor bijvoorbeeld de hormoonhuishouding wordt verstoord of waardoor mutagene en/of carcinogene effecten kunnen worden waargenomen.

Met name de in water oplosbare fracties van minerale olie kunnen acute toxische (narcotiserende) effecten veroorzaken. Dit betreft vooral mono- en di-aromaten en de (cy-clo)alkanen en alkenen met een maximale lengte van elf koolstofatomen. Doordat deze componenten echter min of meer vluchtig zijn en relatief makkelijk afbreken, zullen deze minder snel ophopen in de (water)bodem dan de meer lipofiele en stabiele PAK's. Deze laatste groep wordt geaccumuleerd door organismen en wordt via de voedselketen doorgegeven aan hogere organismen.

Een belangrijk aspect bij de ecotoxicologische risicobeoordeling van olie in bodems is waarschijnlijk dat, zoals is geconstateerd in aquatische bioassays met de zoutwaterslijkgarnaal *Corophium volutator*, contact met olie primair verantwoordelijk is voor negatieve effecten op organismen. Het gaat hierbij met name om de fractie C12-C24-alkanen, die een olieachtige substantie vormt (Scholten e.a., 1996). Verder is bekend dat de ecotoxicologische risico's van olie door verwerking duidelijk afnemen [Scholten e.a., 1996].

De in AquaSense [1997b] beschreven testbatterij met acute terrestrische bioassays (zie onder 'Metalen') is tevens gebruikt om een aantal met olie verontreinigde monsters te testen, tot 1,66 keer de interventiewaarde. Er werden effecten konden aangetoond met de wortelgroeiremmingtest met *Lactuca sativa* (vanaf 0,11 x IW) en met de acute immobiliteitstest met *Folsomia candida* (vanaf 1,66 x IW). Er werd echter alleen met de acute immobiliteitstest met *Folsomia candida* een verband aangetoond met de verontreiniginggraad. Met de overige bioassays werden geen significante effecten aangetoond.

Witteveen en Bos [1997] heeft de toxiciteit onderzocht van gronden die licht verontreinigd waren met olie (tot 0,37 keer de interventiewaarde). Hiervoor werden twee testen ingezet: een chronische regenwormenreproductietest met *Eisenia fetida* en een chronische springstaartenreproductietest met *Folsomia candida*. De resultaten zijn samengevat in tabel 2. Weergegeven is vanaf welke verontreiniginggraad (uitgedrukt als fractie van de interventiewaarde) een effect is gemeten. *Eisenia fetida* blijkt nauwelijks gevoelig te zijn voor olie in de geteste verontreiniginggraad. De reproductie van *Folsomia candida* blijkt sterk te zijn beïnvloed door olie.

Tabel 1 Overzicht van single-speciesbioassays

Tabel 2 Resultaten van een reproductietest met de regenworm *Eisenia fetida* en de spring-staart *Folsomia candida* met grond verontreinigd met olie (bioassays uitgevoerd door Witteveen en Bos [1997]; weergegeven is vanaf welke verontreiniginggraad, uitgedrukt als fractie van de interventiewaarde, een effect is gemeten)

Organisme	Parameter	Effect bij een combinatie van nikkel en chroom
<i>Eisenia fetida</i>	overleving	26 (Ni), 2 (Cr)
	groei	12 (Ni), 6 (Cr)
	reproductie	5 (Ni), 3 (Cr)
<i>Folsomia candida</i>	overleving	niet beïnvloed
	groei	26 (Ni), 2 (Cr)
	reproductie	26 (Ni), 2 (Cr)

Ook door Van den Munckhof en Veul [1994] werd in een bioassay op met olie vervuilde grond gevonden dat de overleving en reproductie van *Folsomia candida* toenamen bij afnemende verontreiniging.

In een artikel van Loehr en Webster [1997] wordt een overzicht gegeven van bioassays die zijn gebruikt om de effectiviteit van biologische saneringen te volgen, onder andere op met olie verontreinigde locaties. De volgende bioassays bleken geschikt om het saneringsverloop te volgen, omdat met deze bioassays een verband kon worden aangetoond tussen de olieconcentratie en de toxiciteit:

- de Microtox-bioassay (acuut);
- zaadkieming en wortelgroei van planten (chronisch);
- bioassays met de regenworm *Eisenia fetida* (chronisch);
- een acute immobiliteitstest met de watervlo Ceriodaphnia.

Bovenstaande bevindingen worden bevestigd door onderzoeken naar met olie verontreinigde bodems van onder andere Ahlf e.a. [1993] en Salanitro e.a. [1997]. Salanitro e.a. [1997] testten twee ziltige leembodems met een laag (0,3%) en hoog (4,7%) organisch-koolstofgehalte die verontreinigd waren met zware, medium- en lichte olie. De geteste concentraties (voor en na sanering) staan in tabel 3. Na acht tot elf maanden waren de concentraties totaal olie met 40 tot 88% afgenomen, waarbij de zware olie het minst en de lichte olie het meest werd afgebroken. In beide gronden liet het gehalte olie de grootste afname zien in de eerste drie tot vijf maanden.

De gronden werden zowel voor als tijdens en na acht tot elf maanden biologische sanering getest met de veertiendaagse overlevingstest met de regenworm *Eisenia fetida*, de Microtoxbioassay (solid phase) en met de zaadkieming en groeitest met tarwe, haver en maïs volgens OECD-richtlijn 208. De grond met een laag percentage organisch koolstof was voor zowel de zware en medium- als lichte olie gedurende ten minste acht maanden toxisch voor de regenworm, terwijl bij de grond met een hoog organisch-koolstofgehalte slechts gedurende drie tot vijf maanden toxische effecten werden aangetoond. Een goede verklaring voor het verschil in toxiciteit werd niet gevonden. De Microtox-bioassay (solid phase) bleek minder gevoelig en meer variabel dan de regenwormenbioassay.

Na drie maanden saneren waren de verontreinigde bodems niet meer toxisch voor de Microtox. De zaadkieming van tarwe, haver en maïs was voor de sanering met 50 tot 100% geremd, terwijl na sanering geen effecten op de kieming meer werden waargenomen. De groei van maïs werd bij verontreiniging met zware en mediumolie zelfs significant gestimuleerd (40 tot 70%) ten opzichte van de controle. Dit stimulerende effect, dat al eerder werd beschreven in verschillende referenties voor onder andere soja, was ook na saneren nog aanwezig. De groei van tarwe en haver werd significant geremd in bodems met medium- en lichte olie (20 tot 70%). Na acht tot elf maanden sanering was deze groeiremming significant afgenomen tot 0 tot 40%.

Tabel 3 Gehalten gemeten in het onderzoek van Salanitro e.a. [1997]

	Zware olie		Mediumolie		Lichte olie	
	Voor	Na	Voor	Na	Voor	Na
totaal olie (mg/kg)	12000-14000	8000-10000	26000-27000	8000-10000	4000-9600	1000
BTEX (mg/kg)	1735	n.b.	15140	n.b.	36100	n.b.
PAK's (mg/kg)	180	n.b.	460	n.b.	960	n.b.

Ahlf e.a. [1993] vonden ook een positieve correlatie tussen de concentratie olie en de remming van de dehydrogenase activiteit van de bacterie *Bacillus cereus*, in met motorolie verontreinigde bodem. Deze bioassay werd uitgevoerd in een bodemsuspensie volgens Liu [1981].

PAK's

De onder 'Metalen' beschreven testbatterij met acute terrestrische bioassays [AquaSense, 1997b] is ook gebruikt om de toxiciteit van met PAK's verontreinigde bodems te beoordelen. Hoewel de bodem was verontreinigd met PAK-concentraties tot 15,3 keer de interventiewaarde, werd in géén van de bioassays een significant toxische effect gemeten.

Klepka en Schuphan [1997] toonden voor de volgende testen (uitgevoerd in DECHEMA-kader) een gevoelige respons en een korte reactietijd aan voor een met PAK's verontreinigde bodem:

- Een wortelgroeiremmingstest volgens een methode die vergelijkbaar is met de ASTM-richtlijn [ASTM, 1990]. Bij deze acute-testmethode worden de zaden in een zeefje boven de te testen waterige oplossing (poriewater of elutriaat) gehangen. De test werd uitgevoerd met *Lepidium sativum* (tuinkers).
- Een chronische reproductietest met de springstaart *Folsomia candida* volgens ISO-richtlijn 11267 [ISO, in voorber. (a)].
- Een contactbioassay met de bacterie *Bacillus cereus* volgens Liu [1981]. Bij deze bioassay wordt de dehydrogenase-activiteit gemeten in een bodemsuspensie waaraan de bacterie is toegevoegd.

Na sanering nam de toxiciteit in alle testen met af met 60% of meer, terwijl de concentratie PAK's met 50% was gereduceerd.

Brinkmann e.a. [1996] onderzochten de effectiviteit van biologische sanering van een terrein dat was verontreinigd met creosoot (PAK's) en pentachloorfenol, voor en na sanering. Hierbij werd gebruikgemaakt van drie bioassays:

- een acute bacterietest met de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (Microtox), uitgevoerd volgens een met NEN 6516 [NEN, 1993] vergelijkbare methode;
- een vijfdaagse zaadkieming- en wortelgroeiremmingstest met *Lactuca sativa*, uitgevoerd volgens een methode afgeleid uit EPA- en ASTM-richtlijnen [ASTM, 1990];
- een veertiendaagse overlevingstest met de regenworm *Eisenia fetida*, vergelijkbaar met OECD-richtlijn 207 [OECD, 1984c].

Vóór sanering was de bodem toxisch voor zowel de Microtox als de wortelgroei van *Lactuca sativa* en de overleving van *Eisenia fetida*. Door de sanering namen de concentraties van de stoffen af met 95% en bleek in alle bioassays geen toxiciteit meer aantoonbaar. Dit betekent dat sanering resulteerde in afname van de verontreinigingniveaus en de volledige verdwijning van meetbare toxisch effecten.

In het eerder genoemde overzichtsartikel van Loehr en Webster [1997] (zie onder 'Olie') en in Fisher en Seech [1995] worden tevens voorbeelden genoemd van biologische saneringen waarin de Microtox en de veertiendaagse overlevingstest met de regenworm *Eisenia fetida* zijn gebruikt om het saneringsverloop van met PAK's verontreinigde grond te beoordelen. Er kon een verband worden aangetoond tussen de concentratie PAK's en de toxiciteit, die werd gemeten in de bioassays.

Zware metalen

In AquaSense [1997b] wordt een testbatterij van routinematig toepasbare terrestrische bioassays beschreven, die bestaat uit de volgende acute bioassays:

- immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida*;
- immobiliteitstest met de nematodensoort *Plectus acuminatus*;
- wortelgroeiremmingstest op agar met *Lactuca sativa* (sla);
- ECHA-test, gebruikmakend van *Bacillus* sp. met als effectparameter bacteriële groeiremming.

Alle testen zijn uitgevoerd met elutriaat. Deze testbatterij is onder andere gebruikt om een aantal met lood verontreinigde monsters (tot 1,0 keer de interventiewaarde) te testen. Uit de resultaten bleek dat de wortelgroei van *Lactuca sativa* gevoelig reageerde op de loodverontreiniging. Significante effecten konden worden aangetoond vanaf een verontreiniging van 1,0 keer de interventiewaarde. Met de overige bioassays werden geen significante effecten aangetoond.

Wenzel [1997] gebruikte een aantal acute bioassays, namelijk de Microtox-test met de mariene bacterie *Vibrio fischeri*, een contacttest met de bacterie *Bacillus subtilis*, de ECHA-test (zie hierboven), een ciliatenproliferatietest, een immobilisatietest met de watervlo *Daphnia magna* en diverse Toxkit-testen voor de beoordeling van bodems die verontreinigd zijn met metalen en nitroaromaten. Zij vond dat de ECHA-test het gevoeligst reageerde, gevolgd door de contacttest met *Bacillus subtilis* en de Microtox-test.

Witteveen en Bos [1997] onderzocht de toxiciteit van gronden die verontreinigd waren met een combinatie van nikkel (tot 26 keer de interventiewaarde) en chroom (tot zes keer de interventiewaarde). Dit gebeurde met twee testen: een regenwormenreproductietest met *Eisenia fetida* en een springstaartenreproductietest met *Folsomia candida* (beide chronisch; beoordeling van grond in z'n geheel). De resultaten zijn samengevat in tabel 4. Weergegeven is vanaf welke verontreiniginggraad (uitgedrukt als fractie van de interventiewaarde) een effect is gemeten. Voor *Eisenia fetida* bleek reproductie de gevoeligste parameter te zijn. *Folsomia candida* bleek niet erg gevoelig voor nikkel en chroom.

Tabel 4 Resultaten van een reproductietest met de regenworm *Eisenia fetida* en de springstaart *Folsomia candida* met grond die is verontreinigd met nikkel en chroom (bioassays uitgevoerd door Witteveen en Bos [1997]; weergegeven is vanaf welke verontreinigingsgraad, uitgedrukt als fractie van de interventiewaarde, een effect is gemeten)

Organisme	Parameter	Effect vanaf
-		
<i>Eisenia fetida</i>	overleving groei	niet beïnvloed 0,37
<i>Folsomia candida</i>	reproductie overleving groei reproductie	niet beïnvloed niet beïnvloed niet beïnvloed 0,05

Smit [1997] voerde diverse experimenten uit met de chronische reproductietest met *Folsomia candida* in kunstgrond, kunstmatig verontreinigde grond, verweerde kunstmatig verontreinigde grond en verontreinigde grond. Zij vond dat de toxiciteit van zink voor *Folsomia candida* voornamelijk werd bepaald door de concentratie in de bodemoplossing. Door 'ageing' (veroudering) nam de concentratie in de bodemoplossing en daarmee de toxiciteit af. Geconcludeerd werd dat de chronische reproductietest met *Folsomia candida* geschikt lijkt voor de beoordeling van bodems verontreinigd met metalen.

Kamerman en Van Gestel [1991] en Van Gestel e.a. [1992a; 1992b] voerden diverse experimenten uit met regenwormen, planten en de Microtox-bioassay, met grond verontreinigd met metalen en met gereinigde grond. De concentraties liepen uiteen van enkele tot circa 1000 mg/kg As, Cd, Cu, Pb en Zn in de verontreinigde grond. Zink vormde de belangrijkste verontreiniging. In de gereinigde grond liepen de concentraties uiteen van enkele tot maximaal 300 mg/kg. De regenwormen (*Eisenia fetida*) werden gedurende vier weken blootgesteld aan de grond, waarna onder andere de overleving en het gewicht werden bepaald. De planten, *Lactuca sativa* (sla) en *Raphanus sativus* (radijs), werden gezaaid op de gereinigde of verontreinigde grond. Na vier weken werd onder andere het gewicht van de planten bepaald. Daarnaast werd er poriewater gewonnen, waarmee de Microtox-bioassay werd uitgevoerd. Bij de regenwormen werd niet of nauwelijks sterfte waargenomen. Wel was de groei in de verontreinigde grond verminderd ten opzichte van de gereinigde grond. De slaplantjes hadden een lager vers gewicht op de verontreinigde grond ten opzichte van de gereinigde grond. Radijs vertoonde op verontreinigde grond een relatief hogere bladproductie. Op gereinigde grond was de knolproductie hoger. Ook met de Microtox-bioassay kon worden aangetoond dat de kwaliteit van de grond toeneemt door reiniging.

Voor alle bioassays, met uitzondering van de bioassay met sla, geldt dat door rijping van de bodem een verdere kwaliteitsverbetering werd waargenomen. Sla wilde niet groeien op gerijpte gereinigde grond. Een verklaring hiervoor werd niet gevonden. Verder werd geconcludeerd dat sla minder goed kiemt en groeit op zure gronden dan radijs en daardoor minder geschikt is voor de beoordeling van met zuur gereinigde gronden.

Noteboom en Posthuma [1995] voerden reproductietesten uit met de regenworm *Eisenia andrei* en de potworm *Enchytraeus crypticus* in 'Budel-grond' (grond afkomstig van een metaalsmelterij in Budel, verontreinigd met zink, koper, lood en cadmium). Er werd een betere reproductie aangetoond bij gronden die verder van de fabriek lagen en lagere concentraties metalen bevatten. Bovendien bleek de reproductie van de potwormen sterker geremd dan die van de regenwormen. Dezelfde Budel-grond is gebruikt in een bioassay met witte mosterd (*Sinapis alba*). Voor deze bioassay kon geen verband worden aangetoond tussen het resultaat van de bioassay en de afstand vanaf de fabriek [Noteboom en Posthuma, 1995].

In Noteboom en Posthuma [1995] wordt ook een onderzoek beschreven waarin de toxiciteit van met zink verontreinigde grond is beoordeeld met rode klaver (*Trifolium pratense*) volgens OECD-richtlijn 208 [OECD, 1984d]. De bioassay werd uitgevoerd in het laboratorium onder gecontroleerde omstandigheden én in situ in het veld onder veldomstandigheden. Uit de resultaten bleek dat de geschatte EC50-waarden voor lab en veld nagenoeg gelijk waren.

Naast bovengenoemde testen zijn er ook testen met ciliaten (protozoën) gebruikt om de toxiciteit van met metalen verontreinigde bodems te bepalen. Forge e.a. [1993] onderzochten de biobeschikbaarheid van metalen via een bioassay met de protozo Colpoda steinii. De groeiremming van de protozo bleek te correleren met de beschikbare metaalconcentraties, bepaald door extractie met water of 0,01M CaCl₂.

Bowers e.a. [1997] gebruikten een bioassay waarin de groei van ciliaten werd gemeten en vergeleken deze met een vijfdaagse zaadkiemingbioassay volgens EPA-richtlijn [U.S. EPA, 1982] met *Lactuca sativa* (sla), beide uitgevoerd met elutriat. De resultaten van de ciliaatgroeitest vertoonden een betere correlatie met de chemische parameters zoals gemeten in de elutriaten en vertoonden minder variatie dan de zaadkiemingbioassay. De overeenkomst in het identificeren van de aan- of afwezigheid van toxische effecten tussen de twee testen was 60% voor de 25 geteste elutriaten.

Bestrijdingsmiddelen

Het effect van (grond verontreinigd met) bestrijdingsmiddelen op bodemorganismen is in Nederland onder andere onderzocht door Ronday e.a. [1997]. De onderzoekers testten zowel parathion als carbofuran met een acute immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida* en met een chronische reproductietest met *Folsomia candida*. De concentratie waarbij effect werd gevonden, was in beide bioassays vergelijkbaar.

Daarnaast werd door Ronday en Houx [1996] de toxiciteit beoordeeld van een gestandaardiseerd watermedium dat was verontreinigd met de pesticiden parathion en dimethoat en van een bodem die kunstmatig was verontreinigd met parathion. Hierbij werden bioassays met zeven terrestrische organismen toegepast. Hoewel deze bioassays in dit onderzoek niet direct zijn gebruikt voor de beoordeling van verontreinigde bodems, worden ze hier toch besproken omdat ze interessante resultaten opleveren en bovendien geschikt lijken voor de beoordeling van de waterige fractie van de bodem. De gebruikte organismen waren:

- de bacterie-etende nematode *Plectus parietinus*;
- de aardappelcyste nematode *Globodera rostochiensis*;
- de potwormen *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus buchholzi*;
- de regenworm *Eisenia fetida*;
- de mijt *Caloglyphus mycophagus*;
- de springstaart *Folsomia candida*.

Alle organismen werden gedurende vier dagen blootgesteld aan een gestandaardiseerd water-medium met respectievelijk parathion en dimethoaat, met immobiliteit als effectparameter. De potworm *Enchytraeus albidus* werd bovendien blootgesteld aan bodem die kunstmatig werd verontreinigd met parathion. *Folsomia candida* bleek het gevoeligst te reageren op beide stoffen. Hoewel er wel effecten werden gemeten bij deze organismen, bleken toxicologische effecten op zowel de nematoden als de mijten praktisch moeilijk waarneembaar te zijn. In de bioassay met *Enchytraeus albidus* in de kunstmatig verontreinigde bodem werden geen negatieve effecten waargenomen bij een concentratie van tien keer de aanbevolen veld dosis. Geconcludeerd werd dat de springstaart *Folsomia candida*, op basis van de praktische uitvoerbaarheid van de test en de hoge gevoeligheid van het testorganisme, het meest geschikte organisme blijkt te zijn voor het testen van de kwaliteit van bodem die is verontreinigd met bovengenoemde stoffen.

Gälli e.a. [1994] gebruikten de Microtox om bodems te beoordelen die zijn verontreinigd met bestrijdingsmiddelen. Deze bioassay werd geprefereerd boven een acute (immobilisatie)bioassay met *Daphnia magna* en boven een algengroei test met *Scenedesmus subspicatus*, op basis van uit de literatuur bekende toxiciteitgegevens van de aanwezige verontreinigingen. De Microtox-bioassay bleek redelijk gevoelig voor vrijwel alle in de bodem gevonden bestrijdingsmiddelen, is praktisch goed uitvoerbaar en heeft een korte testduur. De resultaten van de uitgevoerde Microtox-bioassays kwamen redelijk overeen met de toxiciteit die was voorspeld op basis van de aanwezige stoffen en de uit de literatuur bekende toxiciteitgegevens.

Mengsels van verontreinigingen

Thomas e.a. [1986] onderzochten diverse bodems die waren verontreinigd met metalen, oplosmiddelen, ftalaten, bestrijdingsmiddelen en PAK's, alleen of in combinatie. Hierbij werden toegepast (alle uitgevoerd volgens Porcella, 1983):

- een algenbioassay;
- een acute bioassay met de watervlo *Daphnia magna*;
- een (acute?) bioassay met regenwormen;
- een wortelgroei remming test met elutriaat.

Daarnaast werden een bodemcontacttest met sla (effectparameter zaadkieming) en de Microtox-bioassay gebruikt. De resultaten lieten zien dat de algenbioassay het gevoeligst was, terwijl een wortelgroei remming test met sla (*Lactuca sativa*) het minst gevoelig reageerde. Een aantal aanvullende monsters met onbekende verontreinigingen liet zien dat de regenworm en de bodemcontacttest met sla de meest gevoelige waren, terwijl de wortelgroei van sla, getest met elutriaat, ook werd geremd maar minder gevoelig was dan de bodemcontacttest. De groei van algen in de elutriaat werd gestimuleerd.

Persone e.a. [1993] gebruikten een aantal aquatische bioassays (onder meer Toxkits, aangevuld met een veertiendaagse overlevingstest met regenwormen) om de toxiciteit van onder andere verontreinigde bodems te bepalen. De bodems waren verontreinigd met een mengsel van metalen, PAK's en diverse organische stoffen. De gebruikte bioassays zijn:

- de Rotoxkit F, gebruikmakend van de zoetwaterrotifeer *Brachionus calyciflorus*;
- de Streptoxkit F, gebruikmakend van larven van de zoetwaterkreeftachtige *Streptocephalus proboscideus* (deze toxkit is in een later stadium vervangen door de Thamnotoxkit F omdat de daarin gebruikte cysten beter uitkomen en omdat de bioassay gevoeliger is; de Thamnotoxkit F maakt gebruik van de zoetwaterkreeftachtige *Thamnocephalus platyurus*);
- de Microtox-bioassay, die gebruikmaakt van de mariene bacterie *Vibrio fisheri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*);
- een acute immobiliteitstest met de watervlo *Daphnia magna* (24 uur);
- een veertiendaagse overlevingstest met de regenworm *Eisenia fetida*.

Met alle bovenstaande testen werden effecten gemeten, waarbij steeds een ander bioassay het gevoeligst reageerde. Op basis van de gecombineerde resultaten van alle bioassays bleek het mogelijk om de monsters in te delen naar toxiciteit. Voor alle bodemmonsters kon de toxiciteit van de meest toxische monsters worden verklaard door de aanwezige stoffen.

Ma e.a. [1997] deden onderzoek naar de toxiciteit van uiterwaardengrond, waarbij gebruik werd gemaakt van een reproductietest met de regenworm *Lumbricus rubellus* en reproductie-test met de pissebed *Trachelipus rathkei*. De pissebedden kregen bovendien in de uiterwaarden verzameld strooisel te eten. De bodem was verontreinigd met een mengsel van onder andere metalen, PAK's, PCB's, HCB, olie en DDT, in concentraties tot en met klasse 3. De uitgevoerde bioassays gaven geen aanwijzingen voor het bestaan van duidelijke nadelige effecten van de verontreinigde grond of strooisel op de overleving, groei en reproductie van de regenwormen of pissebedden.

Interessant in het kader van dit onderzoek is ook om te vermelden dat er in DECHEMA-kader een onderzoek zal worden uitgevoerd naar de bruikbaarheid van zowel aquatische als terres-trische bioassays bij verschillende in-situsaneringen op rangeerterreinen van de Duitse spoor-wegen (de verontreiniging(en) zijn nog niet bekend; Klepka e.a., 1997). De bioassays die zullen worden gebruikt, zijn:

- enzymactiviteit van de bacterie *Arthrobacter globiformis*;
- Microtox;
- algengroeitest (72 uur);
- immobilisatietest met *Daphnia magna* (48 uur);
- een wortelgroeiremmingtest met tuinkers;
- acute toxiciteit voor *Folsomia candida* (bodem).

Eind 1997 waren er nog geen resultaten bekend.

2.4.3 Conclusies

Bioassays zijn effectief gebleken bij de beoordeling van bodems die zijn verontreinigd met een scala van stoffen. Ook om het verloop van een (biologische) sanering te volgen, hebben aquatische en terrestrische bioassays in vele gevallen hun bruikbaarheid aangetoond. Tot op heden is de meeste ervaring bij de beoordeling van verontreinigde bodems opgedaan met chronische testen. Veelgebruikte testen zijn:

- een acute regenwormentest met *Eisenia fetida* (volgens OECD-richtlijn 208, ISO 11268-1 of een vergelijkbare methode);
- een chronische reproductietest met de springstaart *Folsomia candida* (volgens ISO 11267);
- een acute bacterietest met de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*), beter bekend als de Microtox-bioassay (volgens NVN 6516 of een vergelijkbare methode);
- acute of chronische bioassays met planten die worden uitgevoerd volgens OECD 208, ISO 11269-1, ISO 11269-2, EPA-richtlijnen of een andere methode. Hierbij worden veelal de soorten *Lactuca sativa* (sla), *Lepidium sativum* (tuinkers) of *Avena sativa* (haver) gebruikt. Van deze soorten blijkt *Lactuca sativa* meestal de gevoeligste te zijn (onder andere Keddy e.a., 1994; Thomas en Cline, 1985).

Behalve terrestrische testen blijkt ook een aantal aquatische testen te zijn gebruikt voor bodembeoordeling. Het betreft de eerder genoemde Microtox, een bioassay met de alg *Selenastrum capricornutum* waarin populatiegroei wordt gemeten (volgens ISO 8692, OECD 201 of een vergelijkbare methode), en acute immobiliteitstesten met de watervlo *Daphnia magna* (volgens ISO 6341, OECD 202 of een vergelijkbare methode), de rotifeer *Brachionus calyciflorus* (Rotokit F) en de kreeftachtige *Streptocephalus proboscideus* (Streptokit F). De laatste is in een latere fase van het onderzoek van Persoone e.a. [1993] vervangen door de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotokit F) omdat de cysten van deze soort beter uitkomen en de bioassay gevoeliger is. Behalve deze testen is er ook een immobiliteitstest met de aquatische nematode *Panagrellus redivivus* gebruikt. Deze testen hebben bij aquatische toepassing hun nut al (deels) in de praktijk bewezen. Ook bij terrestrische toepassing blijken ze bruikbaar [Ahlf e.a.,

1993; Brinkmann e.a., 1996; Debus en Niemann, 1994; DECHEMA, 1995; Fisher en Seech, 1995; Gälli e.a., 1994; Griest e.a., 1993; Persoone e.a., 1993; Simini e.a., 1995; Thomas e.a., 1986].

Het is moeilijk om op basis van de beperkte gegevens een uitspraak te doen over de specifieke gevoeligheid van de bioassays voor bepaalde stofgroepen. Op basis van de bespreking van de ervaringen per stofgroep kan worden geconstateerd dat het voor alle stofgroepen mogelijk blijkt om met zowel acute als chronische bioassays (een afname van) toxische effecten waar te nemen.

Van de acute terrestrische bioassays (< 5 dagen), waarbij niet de grond direct maar via het elutriaat wordt beoordeeld, leveren met name de diverse wortelgroeiremmingstesten, de acute immobilisatietest met *Folsomia candida* en de contactbioassay met de bacterie *Bacillus cereus* veelbelovende resultaten op. Daarnaast is in Duitsland ook voor de zeer eenvoudige ECHA-test een gevoelige reactie op bodemverontreiniging geconstateerd. Verder worden er goede resultaten behaald met de aquatische testen Microtox, de acute immobilisatietest met watervlooien en Toxkits (Rotokit en Thamnotokit).

Voor wat betreft de chronische testen (testduur > 5 dagen) lijken de groeitest met planten, de veertiendaagse overlevingstest voor regenwormen, de regenwormenreproductietest en de springstaartenreproductietest het meest geschikt. Voor deze bioassays zijn er tevens internationaal gevalideerde protocollen en zijn er relatief veel achtergrondgegevens bekend.

2.5 Voorstel selectie

2.5.1 Selectiecriteria

De selectiecriteria voor een testbatterij van acute bioassays waarin minimaal één producent, één destruent en een of twee consumenten als toetsorganismen zijn opgenomen, zijn:

- hoge gevoeligheid, met name voor minerale olie;
- beschikbaarheid protocol;
- beschikbare achtergrondinformatie;
- geringe complexiteit;
- voorkeur voor bodemorganismen;
- voorkeur voor directe blootstelling aan grond;
- vertegenwoordigers van verschillende trofische niveaus.

In het basisprojectplan is gesteld dat chronische bioassays niet voldoen aan deze criteria, omdat ze relatief duur en complex zijn. Er is weliswaar voorgesteld om acute bioassays te selecteren, maar er wordt toch voorgesteld om ook een aantal chronische bioassays te selecteren voor de volgende fase van dit onderzoek (screening veldmonsters). Zo kan dan niet alleen de waterige fractie van de grondmonsters maar ook de grond zelf worden beoordeeld.

Zoals in het basisprojectplan is gesteld, wordt ernaar gestreefd om in eerste instantie circa zes verschillende acute bioassays te selecteren voor de veldinventarisatie in de volgende fase van het project (aantonen van een toxisch signaal met veldmonsters). Deze selectie zal worden aangevuld met een aantal chronische bioassays (zie hierboven).

Tabel 5 Selectiecriteria bioassays

Selectie criterium	Score
Reageert de bioassay gevoelig op olie?	? = onbekend
Bestaat er een (internationaal gevalideerd) protocol?	+ = respons op olie aangetoond +/- = methode beschreven in de literatuur of een (interne) SOP + = een internationaal gevalideerd protocol is in ontwikkeling (ringtest is/wordt uitgevoerd) ++ = er bestaat een internationaal gevalideerd protocol (ISO of OECD)
Wat zijn de ervaringen met het testen van verontreinigde veldbodem?	- = geen +/- = weinig + = redelijk veel ++ = zeer veel
Hoe eenvoudig is de bioassay? (hierbij is ook de eventuele kweek meegerekend)	- = complex +/- = redelijk complex tot redelijk eenvoudig + = eenvoudig ++ = zeer eenvoudig
Maakt de bioassay gebruik van een bodemorganisme?	- = niet + = wel
Wordt het organisme in de bioassay direct blootgesteld aan grond?	- = niet + = wel

Tot het eindoordeel is gekomen door de scores per selectiecriteria te sommeren, waarbij:

- - en ? zijn geteld als 0 punten;
- +/- als 1 punt;
- + als 2 punten;
- ++ als 3 punten.

De resultaten van de toetsing van de geïnventariseerde bioassays aan de selectiecriteria staan in tabel 6. Het eindoordeel van de selectie en de uiteindelijke selectie van een acute en een chronische testbatterij testen worden in de volgende paragrafen behandeld.

Tabel 6 Selectie van bioassays

2.5.2 Acute bioassays

Eerder is opgemerkt dat een testbatterij bioassays minimaal één producent, één micro-organisme en twee consumenten en organismen van verschillende trofische niveaus dient te bevatten. Op basis van de selectiecriteria en een aantal aanvullende argumenten (zie hieronder bij de bespreking van de afzonderlijke testen) zijn de volgende testen geselecteerd om deel uit te maken van een testbatterij acute bioassays:

- de ECHA-test, gebruikmakend van *Bacillus* sp. met als effectparameter bacteriële groeiremming;
- de Microtox, gebruikmakend van de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*) met als effectparameter afname in bioluminescentie;
- een aquatische algentest waarin de populatiegroeisnelheid van de alg *Scenedesmus subspicatus* of *Selenastrum capricornutum* wordt gemeten;
- een wortelgroeiremmingtest, waarbij de bioassay wordt uitgevoerd met sla (*Lactuca sativa*) op agar waar elutriaat doorheen is gemengd;
- een acute immobiliteitstest met de bacterie-etende nematode *Plectus acuminatus*;
- een acute immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida*;
- een acute immobiliteitstest met de watervlo *Daphnia magna*.

Elke bioassay wordt hieronder kort gemotiveerd. De uitvoering van de bioassays wordt hier slechts kort toegelicht. Een uitgebreide omschrijving van de uitvoering (inclusief kweek) zal in de volgende deelrapportage worden gegeven.

Bij de testen met micro-organismen scoort de Microtoxtest het hoogst. Deze test wordt dan ook geselecteerd. Daarnaast wordt ook de ECHA-test als extra bacterietest geselecteerd, ondanks het feit dat de contacttest hoger scoort. Praktische argumenten die hierbij een rol hebben gespeeld, is dat de ECHA-test zeer eenvoudig en goedkoop is uit te voeren. De contacttest maakt gebruik van een *Bacillus*-soort en reageert gevoelig op olie. Op basis hiervan wordt verwacht dat de ECHA-test, die gebruikt maakt van verschillende *Bacillus* sp., ook gevoelig op olie zal reageren. Een ander argument om niet voor de contacttest maar voor de ECHA-test te kiezen, is dat de dehydrogenase-activiteit ook op andere wijze door Bioclear zal worden bepaald.

ECHA-test

Deze test bestaat uit een stripje met daarop bacteriën (*Bacillus* sp.) en indicatoren voor groei. Het stripje wordt in een waterige oplossing gedipt en 24 uur geïncubeerd. De effectparameter is wel of geen bacteriële groei. De test is zeer eenvoudig uit te voeren en goedkoop. Bovendien bleek bij toepassing van een aantal kortdurende testen voor de beoordeling van bodem die is verontreinigd met metalen en nitroaromaten, dat de ECHA-test het gevoeligst reageert [Wenzel, 1997]. Deze resultaten zijn niet bevestigd door onderzoek van AquaSense [1997b]. Door de stripjes te incuberen in de oplossing, kan de gevoeligheid van de bioassay echter op eenvoudige wijze worden verhoogd.

De Microtox

Deze bioassay maakt gebruik van de mariene bacterie *Vibrio fischeri*. Onder normale omstandigheden zendt deze bacterie licht uit (bioluminescentie). De effectparameter is afname in bioluminescentie. Met deze bioassay is al ruime ervaring opgedaan op het gebied van de beoordeling van verontreinigde bodems, onder andere door de KEMA en in DECHEMA-kader, waardoor het makkelijker is om vergelijkingen te maken met de resultaten uit andere onderzoeken. Bovendien is de bioassay snel en goedkoop en zijn er voor veel stoffen toxiciteitgegevens beschikbaar.

Selectie bioassays producenten

Omdat algen een zeer specifieke groep (bodem)organismen vormen met hun eigen specifieke toxiciteit, verdient het de voorkeur om een bodemalgentest in de testbatterij op te nemen. Op dit moment wordt in Duitsland een bioassay ontwikkeld met (diverse soorten) bodemalgen. De bioassay is echter nog niet zo ver ontwikkeld dat zij kan worden toegepast voor de beoordeling van verontreinigde bodems (persoonlijke communicatie met de heer Burhenne, Institut für Mikrobiologie, Biologische Bundesanstalt für Landwirtschaft, Berlin). Als alternatief wordt daarom voorgesteld om de aquatische groeiremmingstest met de zoetwateralg *Selenastrum capricornutum* of *Scenedesmus subspicatus* op te nemen in de testbatterij.

Bij de acute plantentesten heeft de wortelgroeiremmingstest volgens EPA-methode in grond de hoogste score, gevolgd door de wortelgroeiremmingstest in agar en de groeiremmingstest volgens EPA-methode in elutriaat. Voor de eenduidigheid en de vergelijkbaarheid met overige bioassays is er - ondanks de hoogste score voor de wortelgroeiremmingstest volgens EPA methode in grond - gekozen voor een elutriaat, zodat de gehele acute testbatterij gebruikmaakt van testen die in elutriaat worden uitgevoerd. Bovendien wordt blootstelling aan bodem al bij chronische testen meegenomen (zie hieronder). De keuze is gevallen op de wortelgroeiremmingstest in agar omdat hiermee bij AquaSense al goede ervaringen zijn opgedaan.

Aquatische algentest

In deze groeiremmingstest met de zoetwateralg *Selenastrum capricornutum* of *Scenedesmus subspicatus* wordt aan het begin en na 48 en 72 uur van de test de celdichtheid spectrofotometrisch gemeten. Op basis van de celdichtheden op de verschillende tijdstippen wordt een groeicurve gemaakt. Effectparameters zijn het oppervlak onder de groeicurve (A) en de groeisnelheid (μ). Voor deze test zijn er internationaal gevalideerde protocollen [ISO, 1989; OECD, 1984a], is ruime ervaring opgedaan met zoetwatermonsters en zijn er relatief veel toxiciteitgegevens. Bovendien wordt deze bioassay ook in het kader van DECHEMA gebruikt voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Door deze bioassay toe te voegen wordt onderlinge vergelijking met de resultaten uit onderzoeken uitgevoerd in DECHEMA-kader gemakkelijk.

Wortelgroeiremmingstest

Voorgesteld wordt om een acute wortelgroeiremmingstest met sla (*Lactuca sativa*) op agar uit te voeren volgens Toussaint e.a. [1995] te selecteren. Bij deze methode groeien de planten op agar waar elutriaat doorheen is gemengd. De agar heeft als voordeel dat de worteltjes netjes recht groeien en dus makkelijk zijn op te meten. Met deze methode zijn bij AquaSense al goede ervaringen opgedaan [AquaSense, 1997b]. Er is gekozen voor *Lactuca sativa* als testorganisme vanwege de relatief hoge gevoeligheid en vanwege de grote hoeveelheid toxiciteitgegevens in de literatuur.

Selectie bioassays consumenten

De hoogste score bij de acute bioassays met een consument leveren de acute immobiliteitstesten met een watervlooiensoort en met de springstaart *Folsomia candida*. Deze bioassays worden dan ook geselecteerd. Daarnaast wordt het zinvol geacht om een nematodentest op te nemen in de testbatterij omdat nematoden in grote aantallen voorkomen in de bodem (gemiddeld enkele duizenden per 100 g grond). Daarnaast hebben ze een belangrijke regulerende rol in het bodemecosysteem omdat ze bacteriën, schimmels, planten en andere invertebraten eten en omdat ze als voedselbron voor veel organismen dienen. Als nematodentest komt de acute immobiliteitstest met een terrestrische soort volgens het eindoordeel het meest in aanmerking.

Acute immobiliteitstest met Plectus acuminatus

Voorgesteld wordt om een acute immobiliteitstest met de bacterie-etende nematode *Plectus acuminatus* op te nemen in de testbatterij. In deze test wordt de nematode drie dagen blootgesteld aan elutriaat. Deze soort is gekozen omdat hij algemeen voorkomt in de Nederlandse bodem en een gemiddelde gevoeligheid bezit [Kammenga, 1995]. Bovendien is de soort eenvoudig in het lab te kweken. Met de test is al ervaring opgedaan bij AquaSense [AquaSense, 1997b]. Met deze test kon in dat onderzoek geen toxiciteit worden aangetoond. De concentraties waren echter niet erg hoog (lood tot 1,0 keer de interventiewaarde, olie tot 1,6 keer de interventiewaarde en PAK's tot 15,3 keer de interventiewaarde) en mogelijk heeft ook de biobeschikbaarheid een rol gespeeld. Naar verwachting kan de gevoeligheid worden verhoogd door de proefopzet aan te passen.

Acute immobiliteitstest met Folsomia candida

In deze bioassay wordt de immobiliteit van de springstaart *Folsomia candida* voor een elutriaat getest. De organismen bevinden zich hierbij op het elutriaat. Deze test is snel en eenvoudig uit te voeren en goedkoop. Ook zijn de organismen goed te kweken. Bovendien is met deze test al ruime ervaring opgedaan bij AquaSense [onder andere AquaSense, 1996, 1997a en 1997b]. Deze test bleek geschikt voor de beoordeling van bodems die zijn verontreinigd met olie en bestrijdingsmiddelen.

Acute immobiliteitstest met Daphnia magna

Bij deze test worden watervlooien blootgesteld aan elutriaat. De effectparameter is immobiliteit. Hoewel het een aquatisch organisme betreft, wordt toch aanbevolen om deze bioassay op te nemen in de testbatterij. Redenen hiervoor zijn dat de test geschikt is gebleken voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Voor de bioassay zijn er gestandaardiseerde protocollen en zijn er voor zeer veel stoffen toxiciteitgegevens beschikbaar. Bovendien wordt deze bioassay ook gebruikt in het kader van DECHEMA. Door deze bioassay toe te voegen wordt het makkelijker om vergelijkingen te maken met de resultaten uit onderzoeken die zijn uitgevoerd in DECHEMA-kader.

2.5.3 Chronische bioassays

Uit tabel 2.2 blijkt dat er een aantal chronische testen (> 5 dagen) is die hoog scoren, met name omdat er van deze testen al langere tijd een internationaal gevalideerde richtlijn bestaat, waardoor al veel ervaring is opgedaan met de testen. Bovendien worden bodemorganismen bij chronische testen direct blootgesteld aan de bodem. Chronische testen scoren echter laag op het punt van eenvoud.

Opvallend is dat er geen chronische testen met micro-organismen zijn. Dit vloeit voort uit de gestelde grens tussen acuut en chronisch. Een testduur van < 5 dagen is voor bacteriën wetenschappelijk gezien chronisch omdat hun levenscyclus enkele uren tot hooguit dagen beslaat. Bioassays met micro-organismen die langer dan vijf dagen duren, maken vrijwel allemaal gebruik van organismen die al in de bodem aanwezig zijn en niet worden toegevoegd. Deze bioassays vallen niet onder de definitie van 'labbioassay' en zijn daarom niet opgenomen in de voorselectie.

De testbatterij chronische bioassays zou daarom moeten bestaan uit minimaal één producent en twee consumenten. Op basis van de selectiecriteria komen de volgende testen duidelijk het meest in aanmerking om deel uit te maken van een testbatterij chronische bioassays:

- een chronische test met sla (*Lactuca sativa*);
- een reproductietest met de springstaart *Folsomia candida*;
- een veertiendaagse overlevingstest met de regenworm *Eisenia fetida* of een regenwormenreproductietest.

Deze bioassays, die hieronder kort worden besproken, hebben bewezen goed bruikbaar te zijn voor de beoordeling van verontreinigde bodems. Daarnaast zijn er voor alle bioassays standaardprotocollen, is er ruime ervaring met de toepassing van deze bioassays en zijn er toxiciteitgegevens bekend. Opname van chronische testen met *Lactuca sativa* en *Folsomia candida* heeft bovendien als voordeel dat hiermee de resultaten van de acute immobilisatietest kunnen worden gevalideerd. Uit onderzoek van AquaSense [1997a] met *Folsomia candida* is voor een beperkt aantal uiterwaardenmonsters al gebleken dat de acute en chronische toxiciteit vergelijkbare resultaten geven.

Chronische test met sla (Lactuca sativa)

Deze test wordt uitgevoerd volgens OECD-richtlijn 208 [OECD, 1984d] of ISO 11269-2 [ISO, 1995]. De planten worden gezaaid op de verontreinigde bodem. Ten minste twee weken nadat 50% van de plantjes in de controle is opgekomen, worden de plantjes geoogst en gewogen. Ook wordt het kiemingspercentage bepaald. Deze test is onder andere gebruikt voor de beoordeling van bodems die zijn verontreinigd met metalen en olie.

Een reproductietest met de springstaart Folsomia candida

In deze test wordt het effect op de reproductie van *Folsomia candida* bepaald na vier weken blootstelling aan een verontreinigd grondmonster. Momenteel wordt er een internationaal gestandaardiseerde richtlijn ontwikkeld voor deze test, namelijk ISO-richtlijn 11267 [ISO, in voorber. (a)]. Deze test is echter al meerdere malen toegepast voor de beoordeling van verontreinigde bodems (onder andere bodems verontreinigd met metalen, olie en nitroaromaten).

Een veertiendaagse overlevingstest met de regenworm Eisenia fetida

In deze test wordt de regenworm *Eisenia fetida* veertien dagen blootgesteld aan een verontreinigd grondmonster. Na deze periode worden de overleving en het gewicht beoordeeld. Met de toepassing van deze test voor de beoordeling van verontreinigde bodems is inmiddels zeer ruime ervaring opgedaan. De test is onder andere gebruikt voor het beoordelen van bodems die zijn verontreinigd met metalen, olie, pentachloorfenol (PCP), PAK's, PCB's en explosieven.

Een regenwormenreproductietest

In deze test wordt de regenworm *Eisenia fetida* vier weken of langer blootgesteld aan een verontreinigd grondmonster. Na deze periode wordt het effect op de overleving, groei en reproductie bepaald. De groei en reproductie van de regenworm blijken over het algemeen gevoeliger te reageren op verontreinigingen dan de overleving. In vergelijking met de veertiendaagse overlevingstest heeft de reproductietest echter als nadeel dat de testduur en de benodigde arbeidstijd voor het uitvoeren van de test langer zijn. Voor de reproductietest wordt momenteel een internationaal gestandaardiseerde richtlijn ontwikkeld, namelijk ISO-richtlijn 11268-2 [ISO, in voorber. (b)]. De test is onder andere toegepast voor de beoordeling van bodems die zijn verontreinigd met metalen, olie en een mengsel van onder andere metalen, PAK's, PCB's, HCB, olie en DDT.

HOOFDSTUK 3

SELECTIE VAN EEN EXTRACTIEMETHODE VOOR DE EERSTE STAP VAN ACUTE BIOASSAYS OP VERONTREINIGDE BODEM

3.1 Inleiding

In deze literatuurstudie is onderzocht welke extractiemethoden er tot nu toe worden gebruikt voor bioassays of chemische analyses in grond en welke extractiemethoden geschikt zijn om de toxiciteit van bodem mee te bepalen. Op basis van deze studie wordt een methode geselecteerd die wordt toegepast in dit onderzoek. Het doel van dit deel van het onderzoek was geschikte extractieprocedures te identificeren voor toepassing bij bioassays. Criteria hierbij zijn:

- herhaalbaarheid van de extractie;
- extractieduur;
- simulatie van werkelijke opname uit de bodem, met name van minerale olie;
- gevoeligheid van het organisme voor het extractant (pH, extractiemiddel);
- aansluiting bij ontwikkelde en genormaliseerde uitloogtesten;
- protocol beschikbaar;
- eenvoud;
- geschikt voor verschillende typen bodem;
- voldoende extractproductie.

In paragraaf 3.2 wordt de ervaring met extracties voor bioassays en voor chemische beoordeling beschreven. In paragraaf 3.3 worden de selectiecriteria voor een extract gegeven en wordt de geselecteerde extractiemethode beschreven. De gegevens zijn afkomstig uit de (inter)nationale vakliteratuur. Daarnaast zijn experts in dit vakgebied benaderd om actueel inzicht te krijgen in huidige stand van zaken met betrekking tot extractie van organische verbindingen uit grond voor bioassays. In deze studie is de nadruk gelegd op de toepassing bij grond die is verontreinigd met minerale olie, maar de studie kan eveneens dienen als referentiedocument voor andere organische verontreinigingen.

3.2 Ervaring met extracties

3.2.1 Ervaringen met extracties voor bioassays

Voor de uitvoering van bioassays op bodem zijn er twee mogelijkheden:

- Het toetsorganisme wordt rechtstreeks op de te onderzoeken bodem geplaatst.
- Er wordt gebruikgemaakt van een extract van de bodem.

In een aantal toetsen wordt het testorganisme rechtstreeks op de bodem geplaatst, bijvoorbeeld voor de regenwormentest, de chronische springstaartentest en de Microtox met bodemsuspensie [Witteveen en Bos, 1997; Salanitro e.a., 1997; Baun e.a., 1997; Brinkmann e.a., 1997]. Het voordeel van deze methoden is dat de blootstelling direct van de bodem naar het toetsorganisme kan plaatsvinden. In deze testen is echter ook sprake is van blootstelling via de waterfase, waarbij meestal het water met of zonder voedingsstoffen toegevoegd is aan de testbodem. Het nadeel van deze methoden is dat er moet worden gewerkt met een referentiebodem en dat het niet altijd mogelijk is om een juiste referentie te vinden:

- Wordt er gewerkt met echte bodems of met kunstmatige bodems? Er moet een keuze worden gemaakt tussen een klei- of een zandbodem.
- Welke organische stoffen moeten aanwezig zijn? Wat is het effect van deze keuzen?

De voornaamste blootstellingroute gaat via de waterige bodemoplossing. Dit is bijvoorbeeld gevonden voor de opname van organische verontreinigingen in regenwormen door Belfroid [1994] en Sanchez en Postuma [1995]. Daarom wordt er vaak gewerkt met een extract van de bodem. Dit heeft als voordeel dat er kan worden gewerkt met snelle toetsen (resultaten binnen vijf dagen, zie hoofdstuk 2). De bioassay op een extract is eenvoudiger uit te voeren, eenvoudiger te standaardiseren en beter te reproduceren. Verder kan er ook gebruik worden gemaakt van toetsorganismen die leven in waterig milieu. Hiermee is veel ervaring opgedaan.

Ook bij een extract moet er worden gewerkt met een referentie. Dit is echter eenvoudiger dan bij een bodem omdat een waterige referentie eenduidig is vast te stellen en omdat het effect van een waterige referentie direct kan worden vergeleken met het effect van een blanco-oplossing.

Bij de chemische beoordeling van bodem wordt de totale samenstelling van de verbindingen in de bodem bepaald. Deze totale samenstelling wordt bepaald door een agressieve ontsluiting van de gehele bodem. Dit betekent dat de geanalyseerde hoeveelheid verbindingen meestal hoger is dan de hoeveelheid die in het milieu beschikbaar is of binnen een redelijke termijn beschikbaar komt.

Voor de beoordeling van primaire en secundaire bouwstoffen, die worden toegepast op de bodem, wordt de uitloging van de chemische verbindingen getest in plaats van de totale samenstelling, zoals voorgeschreven in het Bouwstoffenbesluit. Deze uitloogtesten worden niet alleen voorgeschreven voor bouwstoffen maar ook bij hergebruik van (verontreinigde) grond. Met de uitloging van chemische verbindingen wordt bedoeld het onder natuurlijke omstandigheden beschikbaar komen van deze verbindingen. In uitloogtoetsen wordt daarom gewerkt in waterige oplossingen. Met de uitloging is een betere schatting te maken van de hoeveelheid van de verbinding die in werkelijkheid vrijkomt in het milieu dan met de bepaling van de totale samenstelling van een bouwstof. Deze uitloogtesten zijn mogelijk ook bruikbaar bij de bereiding van een extract voor een bioassay.

Voor het literatuuronderzoek zijn de volgende onderzoeksvragen gesteld:

- Welke extractiemethoden voor bioassays op bodem worden in de literatuur genoemd?
- Welke uitloogmethoden zijn er voor de chemische bepaling van de beschikbaarheid van verontreinigingen?

Voor de chemische bepaling van de beschikbaarheid zijn er zeer veel verschillende methoden en dit levert een zeer grote set van referenties op. Voor de chemische beoordeling zijn de onderzochte extractiemethoden beperkt tot (met name in Nederland en in Europees (CEN) verband genormaliseerde) uitloogmethoden.

De voorkeur gaat uit naar extracties waar veel ervaring mee is en extracties die zijn gestandaardiseerd.

3.2.2 Testcondities

Uit de literatuur (voornamelijk afkomstig van tijdschriften als *Environmental Science and Technology* en *Environmental Toxicology and Chemistry* en uit conferentieverlagen van de laatste drie jaar) blijkt dat er op zeer veel verschillende manieren wordt geëxtraheerd. De gebruikte methoden om te extraheren, zijn onder te brengen in verschillende groepen namelijk:

- poriënwater;
- toevoegen van water in verschillende verhoudingen;
- toevoegen van water met zouten;
- toevoegen van extractiemiddelen (van zuur tot organische complexen).

Hieronder wordt per groep een overzicht gegeven van de gevonden referenties (een deel van de referenties komt uit een onderzoek van AquaSense [1996]):

- grondwater: Dyrebrog e.a., 1997;
- poriënwater: Ankley, 1991; Nebeker e.a., 1984; Vlaar, 1994;
- (gedistilleerd of gedesioniseerd) water: RIVM, 1993; Simini e.a., 1995; Forge e.a., 1993; Gälli e.a., 1994; Greene e.a., 1989; Warren-Hicks e.a., 1989; Harkley e.a., 1994; Ankley, 1991; DECHEMA, 1995; Krantzberg en Boyd, 1992; Brinkmann e.a., 1997;
- water met zouten of aangezuurd water: Persoone e.a., 1993; Maas e.a., 1992; Baun e.a., 1997; Green e.a., 1993; Gupta, 1991; Hsu e.a., 1997; AquaSense, 1997;
- extractiemiddelen: Jenner, 1995 (zuur en EDTA); KEMA, 1996 (toevoegen 5% DMSO); Skøt e.a., 1995 (dichloromethaan); IWACO, 1991 (zuur).

Er is in de verschillende referenties gewerkt in verschillende bodem-extractieverhoudingen. De meeste referenties werken met een verhouding van 1 op 4 (bodem ten opzichte van extractiemiddel). Dit geldt voor: Ankley, 1991; Nebeker e.a., 1984; Baun e.a., 1997; Greene e.a., 1989; Warren-Hicks e.a., 1989; Harkley e.a., 1994; Persoone e.a., 1993; Maas e.a., 1992; Green e.a., 1993. Daarnaast worden er ook andere verhoudingen gebruikt, zoals 1 op 100 [Jenner, 1995], 1 op 10 [Brinkmann e.a., 1997], 1 op 2 [DECHEMA, 1995] en 1 op 1 [AquaSense, 1997]. Voor het extraheren van sediment wordt meestal minder extractiemiddel toegevoegd, namelijk 4 op 1 [Krantzberg en Boyd, 1992] en 12 op 1 [RIVM, 1993]. Er worden meestal geen argumenten genoemd voor deze verhoudingen.

Ook de duur verschilt van extractie tot extractie. Er worden extractietijden van gebruikt van:

- 30 minuten [Ankley, 1991; Nebeker e.a., 1984; Harkley e.a., 1994];
- 2 uur [KEMA, 1996];
- 6 uur [Jenner, 1995];
- 24 uur [Maas e.a., 1992; Forge e.a., 1993; Dechema, 1995; IWACO, 1991; Baun e.a., 1997; Brinkmann e.a., 1997];
- 48 uur [Greene e.a., 1989].

Soms wordt er meerdere malen geschud. Bij Jenner [1995] bijvoorbeeld wordt tweemaal drie uur geschud. In andere gevallen worden er ook geluidstrillingen toegepast [Baun e.a., 1997; KEMA, 1996].

De bodem wordt van de vloeistof gescheiden door centrifuge, door de bodem uit te laten zakken of door filtratie. DEHEMA [1995] bijvoorbeeld schrijft bij een bodemextractie een centrifugestap voor van vijftien minuten bij 5000 tot 20000 maal g. AquaSense [1997] gebruikt een centrifugestap van twintig minuten bij 3000 RPM, en het RIVM [1993] van tien minuten bij 5000 RPM. Jenner [1995] gebruikt een filtratie over 0,45 mm filter. Krantzberg en Boyd [1992] laten het sediment 24 uur uitzakken.

Niet alle details worden in elke literatuurreferentie genoemd, en soms wordt de extractiemethode helemaal niet beschreven.

Resultaten van de bioassays na extractie

Na extractie wordt de bioassay uitgevoerd. Met de gebruikte bioassays zijn meestal toxische effecten gemeten. Vaak worden de effecten van een gecombineerde extractie en bioassay relatief beschouwd:

- De resultaten op een verontreinigde bodem worden vergeleken met resultaten op schone grond.
- De resultaten worden vergeleken in een gradiënt van de verontreiniginggraad.
- De verandering van het effect in de tijd wordt bestudeerd.

Het nadeel van een relatieve beoordeling is dat de resultaten van de bioassays (en de voorgaande extractie) niet direct met elkaar kunnen worden vergeleken. Het is daarom niet mogelijk om op grond van de resultaten van de bioassays aan te geven welke extractie betere resultaten geeft en welke slechtere. In de testen verschillen de extractie, de bioassay, de verontreiniging en de verontreiniginggraad.

Conclusies

Uit de literatuur blijkt dat bij de extractie voor de bioassays geen algemeen gestandaardiseerde methoden zijn gebruikt maar dat elke onderzoeker zijn eigen methode heeft opgezet. Soms wordt de extractiemethode niet eens beschreven. De keuze voor een bepaalde extractiemethode is ad hoc. Er worden verschillende bodem-extractiemiddelverhoudingen en verschillende extractietijden gebruikt. Scheiding vindt plaats door centrifuge, bezinken of filtratie. Met de meeste bioassays die op de extracten volgen, worden wel resultaten gevonden. De resultaten worden meestal relatief gebruikt ten opzichte van schone grond. Het meest gebruikte extractiemiddel is water, waar soms zouten aan zijn toegevoegd. De meest gebruikte bodem-extractieverhouding is 1 op en 4. Meestal wordt er gecentrifugeerd.

3.2.3 Literatuuroverzicht van genormaliseerde uitloogtoetsen

Testcondities

Er worden voor de chemische beoordeling van bodem zeer veel verschillende extracties uitgevoerd. In dit overzicht zijn alleen de genormaliseerde uitloogtesten bestudeerd. De ontwikkelde uitloogtesten zijn met name gericht op de uitloging van anorganische verbindingen (NEN 7300-serie; CEN TC 292-testen; Jenner, 1995; IWACO, 1991). Op dit moment wordt onderzoek gedaan naar mogelijke aanpassingen van de bestaande testen om de uitloging van organische stoffen te bepalen. De resultaten uit deze onderzoeken worden ook in dit overzicht meegenomen [RIVM 1994, 1995a, 1995b, 1996a, 1996b].

Voor de chemische beoordeling van uitloging worden in Nederland genormaliseerde uitloogtoetsen gebruikt (NEN 7300-serie). In deze serie zijn vier soorten uitloogtesten beschreven, namelijk:

- *De kolomtest (NEN 7343)*. Hierin wordt een kolom gevuld met 400 gram materiaal waarin in opwaartse richting aangezuurd water wordt gepompt. De test duurt ongeveer 21 dagen, en gedurende deze periode worden verschillende fracties opgevangen tot een uiteindelijke water-vastestofverhouding (*liquid-solid ratio: L/S*) van 10.
- *De cascadetest (NEN 7349)*. De cascadetest bestaat uit vijf successieve schudtesten waarbij bij in elke stap 24 uur wordt uitgeschud met aangezuurd water bij een L/S van 20.
- *De beschikbaarheidstest (NEN 7341)*. In de beschikbaarheidstest wordt de maximale uitloging over honderd jaar in natuurlijke omstandigheden bepaald. De beschikbaarheidstest bestaat uit een schudtest bij L/S 50 en een vastgelegde pH van 7 en successief een schudtest bij L/S 50 en een vastgelegde pH van 4. De beschikbaarheidstest duurt tweemaal drie uur.
- *De diffusietest (NEN 7345)*. In de diffusietest wordt de uitloging in een vormgegeven blok (van bijvoorbeeld beton) bepaald. Hierbij wordt een blok in een bak met aangezuurd water geplaatst en dit water wordt meerdere malen ververs. De test duurt 64 dagen.

De ontwikkeling van deze uitloogmethoden loopt vanaf de jaren tachtig en vindt nu opvolging in Europees verband, met name voor het testen van afvalstoffen [Van der Sloot, 1996]. De genormaliseerde uitloogtoetsen zijn gericht op de uitloging van anorganische stoffen. Er zijn veel verschillende testen. Twee belangrijke onderdelen van uitloging worden meestal getest, namelijk:

1. het vrijkomen van componenten in de tijd;
2. het vrijkomen als functie van de belangrijkste controlerende parameters, zoals pH, redox en complexatie.

In een test van het eerste type wordt de uitloging in de praktijk zo veel mogelijk gesimuleerd in het laboratorium, maar dan wel op een snellere tijdschaal. Voorbeelden van deze testen zijn de kolomtest en de diffusietest. Een test van het tweede type heeft als doel de (uitloog)eigenschappen van het te onderzoeken materiaal te bestuderen. Een voorbeeld is de pH-stat-test. In een pH-stat-test wordt de uitloging gemeten bij een opgelegde (statische) pH [Van der Sloot, 1996]. De Nederlandse testmethoden (NEN 7300-serie) zijn met name gericht op simulatie van de uitloging in de tijd over een lange periode (vijftig tot honderd jaar). Daarom zijn ze niet geschikt voor het bepalen van concentraties die acute toxiciteit kunnen veroorzaken.

Er is in het verleden onderzocht of het mogelijk is om op de extracten in de uitloogtesten bioassays uit te voeren [IWACO, 1991]. In de literatuurstudie van IWACO [1991] zijn de eisen van verschillende bioassays - zoals Microtox, algen, insecten en vissen - vergeleken met de condities die voorkomen in een uitloogtest. Het bleek dat het in principe mogelijk is om bioassays te gebruiken maar dat dit afhankelijk is van de eisen die een testorganisme stelt aan de condities in het extract, zoals voor de pH, het zoutgehalte of de toxiciteit van het extractiemiddel. Daarnaast kan de interpretatie van de resultaten problemen geven. De meeste testen gaan bijvoorbeeld uit van een extract waarbij de uitloging over een lange tijdsperiode wordt beschouwd (honderd jaar). Als dergelijke testen worden gecombineerd met een acute bioassay, is het lastig om het resultaat te interpreteren. Voor de bepaling van toxische concentraties die acuut kunnen voorkomen, moet er worden gewerkt met veel lagere L/S-verhoudingen. IWACO [1991] concludeerde dat het belangrijk is om te weten wat het doel is van de aan uitloogtoetsen gekoppelde bioassays. Afhankelijk van het doel moet er een combinatie worden gekozen, bijvoorbeeld:

- Meet de gecombineerde test de relatieve toxiciteit van de uitloogbare fractie van chemische stoffen uit materialen?
- Is de test onderscheidend voor schadelijke en onschadelijke materialen?

Op het moment van rapportage van IWACO (in 1991) was er nog weinig ervaring met bioassays op bodem of afvalstoffen.

Parameters die uitloging beïnvloeden

De belangrijkste parameters voor de uitloging, zo blijkt uit de jarenlange ervaring met uitloogtesten, zijn de vloeistof-vastestofverhouding (L/S), de tijdsduur van de extractie, de pH en de invloed van zuurstof en opgelost organisch koolstof (DOC) [Van der Sloot, 1996]. Het belang van deze parameters voor uitloging wordt bepaald door het onderliggend mechanisme. Een component die

(bijna) geen binding ondervindt met de vaste stof, zal relatief gezien bij een hogere L/S meer uitlogen. De concentratie van de component in het extract neemt echter bij toenemende L/S meestal af door het verdunningseffect. De tijdsduur van uitloging wordt belangrijk als de uitloogprocessen worden bepaald door kinetiek (bijvoorbeeld als uitloging wordt bepaald door diffusie uit de vaste stof). Dit proces kan jaren duren. Een groot deel van de uitloging van componenten is afhankelijk van oplosbaarheids- en sorptieprocessen, en die zijn meestal sterk afhankelijk van de pH en van de redoxconditie (concentratie zuurstof). Door kleine wijzigingen in pH en redox in een uitloogtest kan de vrijgekomen concentratie van een component meer dan een factor 1000 verschillen. Voor verbindingen die binden aan DOC, kan ook door wijzigingen in het DOC-gehalte in oplossing de vrijgekomen concentratie tot meer dan een factor 1000 verschillen [Van der Sloot, 1996].

De opzet van een uitloogtest, zoals een kolomproef, een schudproef of een cascadeproef, bepaalt vaak de condities voor de belangrijkste uitloogparameters (L/S, tijd, pH, redox en DOC).

Op dit moment wordt in Nederland onderzocht in hoeverre de uitloogtesten geschikt zijn voor het bepalen van de uitloging van organische stoffen en welke aanpassingen noodzakelijk zijn [RIVM 1994, 1995a, 1995b, 1996a en 1996b; stukken van de normcommissie 390 11]. Het blijkt dat er een aantal problemen ontstaat, namelijk: vervluchtiging van de verontreiniging, adsorptie aan het extractiemateriaal en afbraak van verontreiniging tijdens de extractie. Door vervluchtiging, adsorptie en afbraak zijn er tijdens het experiment verliezen van meer dan 80%. Vooral bij de scheidingsstap tussen vaste stof en vloeistof na extractie treedt het grootste verlies op (tot 50 %). De resultaten na filtratie en centrifugatie verschillen soms meer dan een factor 5.

De scheiding tussen vaste stof en vloeistof geeft aanleiding tot discussie. Bij de milieuchemische beoordeling van extracten wordt aangehouden dat stoffen kleiner dan 0,45 µm in oplossing zijn en alles groter dan 0,45 µm als deeltje kan worden beschouwd. Dit is een afspraak en geen bewijs, want de scheiding tussen vaste stof en vloeistof is moeilijk vast te stellen doordat er colloïden voorkomen. Colloïden in bodemsuspensie bestaan meestal uit anorganische en organische complexen die in sterk in grootte kunnen variëren (van nm tot en met µm). De meeste datasets in de wereld zijn opgebouwd op basis van scheiding op 0,45 µm, en het lijkt dus verstandig om deze aanpak te volgen bij de extractie voor bioassays.

In biologisch onderzoek wordt vaak geadviseerd om te centrifugeren, omdat met centrifugeren het meeste poriënwater wordt verkregen [AquaSense, 1996]. Bij filtratie kan er adsorptie van verontreiniging aan de opstelling en filter optreden [RIVM, 1995b]. Soms wordt er bij filtratie extra toxiciteit geïntroduceerd [KEMA, 1996], alhoewel dit kon worden vermeden door inert filtermateriaal te gebruiken. Ook treedt er verlies op door vervluchtiging van verontreinigingen [RIVM 1995b]. Daarnaast is een grond met hoog organisch-stofgehalte lastig te filtreren (praktijkervaring AquaSense en KEMA). Het verlies van organische bestanddelen tijdens filtratie wordt vaak veroorzaakt door uitvloeking van DOC. Om dit te voorkomen zou er calcium in lage concentraties (mM) kunnen worden toegevoegd (mondelinge communicatie dr. R.N.J. Comans, ECN).

Het RIVM [1995b] heeft gevonden dat er om deeltjes kleiner dan 0,45 µm te scheiden van deeltjes groter dan 0,45 µm minstens zeventig minuten moet worden gecentrifugeerd bij 6000 RPM. Door lange centrifugetijden treedt er extra verlies op door vervluchtiging van verontreinigingen. Verder is het lastig om centrifugemateriaal te vinden dat bestand is tegen dit regime en waarbij weinig wandadsorptie optreedt.

Zowel filtreren als centrifugeren geeft dus problemen. Centrifugatie is echter lastig te standaardiseren omdat het afhankelijk is van de centrifugesnelheid, afstand van de buitenkant van de buis tot het middelpunt en de vorm van de centrifugebuis. Meer dan een half uur centrifugeren is niet praktisch, en dat betekent dat er bij hoge snelheid in gekoelde centrifuges moet worden gewerkt om scheiding bij 0,45 µm te krijgen.

Uit de huidige literatuur komt geen oplossing. Zowel centrifugeren als filtreren leidt tot artefacten. Uit het oogpunt van praktische haalbaarheid wordt in deze studie gekozen voor filtratie. Om vervluchtiging zo veel mogelijk tegen te gaan, wordt gekozen voor een overdrukopstelling in plaats

van voor een vacuümfiltratie-opstelling [RIVM, 1994]. Voor de filters moet gebruik worden gemaakt van een inert materiaal. Het RIVM meldt dat PAK kan adsorberen aan teflon [RIVM 1995a, 1995b]. Gezien de inertheid van dit materiaal lijkt dit te worden veroorzaakt door de hydrofobiteit van teflon (mondeling overleg met Armand Orbons, IWACO). Daarom wordt voorgesteld om hydrofiele inerte filters te gebruiken, namelijk PVDF (polyvinylidifluoride; mondeling overleg met dr. M. Beerlage, KEMA). Eventueel moet vooraf een extra centrifugestap worden ingebouwd voor bodem met een hoog organisch gehalte.

3.2.4 Discussie en conclusie

Uit de besproken overzichten komt geen gestandaardiseerde extractiemethode naar voren voor de bereiding van extracten voor bioassays. Ook lijken de bestaande genormaliseerde uitloogmethoden niet zonder aanpassingen te kunnen worden gebruikt voor de toepassing op bioassay op bodem. Met name de lange tijdsduur die in deze toetsen wordt gesimuleerd, vormt een probleem.

De meeste toegepaste conditie in de gevonden extractiemethoden voor bioassays is een waterig extract, een verhouding van bodem en extract van 1 op 4, een schudduur van 24 uur en scheiding van de bodem en het extract via centrifugeren. Met de meeste bioassays op de extracten wordt wel een resultaat gevonden. Meestal wordt dit resultaat relatief beschouwd. Het is niet mogelijk om de resultaten onderling te beschouwen, omdat de extracties, de bioassays, de verontreinigingen én de mate van verontreiniging verschillen.

In de verschillende studies worden wel de parameters genoemd die van invloed zijn op de samenstelling van het extract en daardoor op het te meten effect in de bioassay. Bij de selectie van een extractie moet rekening worden gehouden met deze parameters.

Het effect in een bioassay is afhankelijk van de concentratie aan toxische stoffen in het extract door:

- de mate van extractie;
- de aanwezigheid zwevend stof;
- het verlies van stoffen;
- de toxiciteit van het extractiemiddel.

Mate van extractie

De mate van extractie is afhankelijk van de vloeistof-vastestofverhouding (L/S). Bij een hogere L/S wordt er relatief meer stof uit de vaste stof geëxtraheerd maar gaat de absolute concentratie omlaag. Verder is de mate van extractie afhankelijk van de tijdsduur van de extractie, de temperatuur en de deeltjesgrootte van de bodem. De zuurgraad, oxidatiegraad en mate van complexatie bepalen de mate van extractie. De aanwezigheid van complexerende stoffen aan de vaste stof of in de vloeistof, de zuurgraad en de oxidatiegraad kunnen worden beïnvloed door het extractiemiddel (bijvoorbeeld bij de toevoeging van zouten, organische extractiemiddelen of van zuur of base). De mate van extractie is ook afhankelijk van de grondsoort, van de verontreiniging en van de mate van veroudering van de verontreiniging.

Aanwezigheid van zwevend stof

De aanwezigheid van zwevend stof kan het effect in een bioassay verhogen doordat er hogere concentraties verontreiniging of naleveringseffecten optreden, maar kan het effect in de toets ook verlagen doordat er adsorptie van de verontreiniging aan zwevend stof optreedt. De aanwezigheid van zwevend stof wordt bepaald door de mate van scheiding tussen vaste stof en vloeistof.

Verlies van stoffen

Tijdens de extractie kan er afbraak plaatsvinden door biologische of chemische processen. Deze afbraak wordt beïnvloed door beluchting tijdens de extractie (toevoer van zuurstof en koolzuur) en de aanwezigheid van licht. Daarnaast kan er vervluchtiging optreden, waardoor stoffen verdwijnen uit het extract. Verder kunnen verontreinigingen zich hechten aan de wand van de extractie-opstelling, waardoor ze uit de oplossing verdwijnen.

Toxiciteit extractiemiddel

Het effect in een bioassay is niet alleen afhankelijk van de concentratie van verontreinigingen in het extract maar ook van de samenstelling van het extractiemiddel, bijvoorbeeld de zuurgraad (pH), de aanwezigheid van zouten, de oxidatiegraad en de aanwezigheid van voedingsmiddelen. Soms is het extractiemiddel toxisch voor de bioassay.

Uit de literatuurstudie blijkt dat er geen genormaliseerde extractiemethoden zijn die direct kunnen worden toegepast voor bioassays. Het is niet mogelijk om de resultaten van de verschillende studies rechtstreeks met elkaar te vergelijken om zo de beste methode te selecteren. Wel komt uit de literatuur naar voren welke parameters de extractie en het resultaat van de bioassay beïnvloeden. Met deze kennis moet het mogelijk zijn om een extractiemethode te selecteren.

3.3 Selectie van een extractiemethode

3.3.1 Selectiecriteria

- De extractiemethode voor bioassays op bodem moet aan de volgende criteria voldoen
- De extractie moet herhaalbaar zijn.
- De extractieduur moet beperkt zijn.
- De extractie moet geschikt zijn voor verschillende bodems en verschillende soorten verontreinigingen, en in ieder geval voor minerale olie en de verontreinigingen die zijn aangetroffen in het havengebied.
- De mate van extractie moet relevant zijn voor de beschikbaarheid in de praktijk.
- Het extractiemiddel mag geen groot effect hebben op het toetsorganisme.
- De procedure moet zo veel mogelijk aansluiten op genormaliseerde procedures.
- De resultaten van de bioassays moeten goed interpreteerbaar zijn.
- De extractie moet eenvoudig zijn uit te voeren.
- De procedure moet geschikt zijn voor verschillende typen bodems.
- De extractie moet genoeg extract opleveren op alle bioassays op uit te voeren.

De extractie moet herhaalbaar zijn zodat dezelfde resultaten worden gevonden (goede reproduceerbaarheid) bij herhaling in hetzelfde laboratorium of in een ander laboratorium met dezelfde extractie op dezelfde bodem. Uit de onderzochte literatuur blijkt dat dit aspect bij de meeste extracties voor bioassays niet is meegenomen. De resultaten van de extracten zijn meestal relatief gebruikt. Alleen voor de uitloogtesten bij chemische beoordeling is dit aspect wel meegenomen.

De toets moet onafhankelijk zijn van de bodemsoort of verontreiniging omdat de resultaten van verschillende plaatsen met elkaar moeten kunnen worden vergeleken. Het gaat hierbij om verschillende bodemtypen, en in deze gronden zullen ook andere verontreinigingen aanwezig zijn. Daarom moeten de resultaten van verschillende bodemtypen en verschillende verontreinigingen met elkaar kunnen worden vergeleken. Dit maakt de bioassay ook breder toepasbaar. De in de literatuur beschreven extracties worden meestal per site gebruikt. Alleen bij de uitloogtesten voor de chemische beoordeling worden resultaten van verschillende matrices met elkaar vergeleken.

Als de mate van extractie relevant is voor de beschikbaarheid in de praktijk, is het een stuk eenvoudiger om de resultaten te interpreteren. De extractie is gericht op acute toxiciteit omdat de bioassay daarop is gericht, maar naleveringseffecten die optreden in de praktijk door wegspoeling of door omzetting van de verontreiniging moeten worden meegenomen. In de meeste extracties voor bioassays wordt de praktijk gesimuleerd maar wordt een eenmalige schudtest toegepast, zodat het naleveringseffect niet is meegenomen. De uitloogtesten voor chemische beoordeling zijn opgezet om het vrijkomen van verontreinigingen over een lange termijn vast te stellen, en de vrijgekomen concentraties zijn niet direct met de praktijk vergelijkbaar.

Als het extractiemiddel toxisch is voor het toetsorganisme, verandert het effect van de verontreinigingen in de bodem. Het negatieve of positieve effect van het extractiemiddel op het

organisme moet daarom minimaal zijn en met een blanco bepaling kunnen worden beoordeeld. Het extractiemiddel mag geen interactie aangaan met de verontreinigingen (waardoor door synergisme de toxiciteit zou veranderen).

De resultaten van de toetsing van de extractiemethoden aan de selectiecriteria staan in tabel 7.

Tabel 7 Selectie van extractiemethoden op grond van de aangelegde selectiecriteria

Extractie-methode	Geschikt voor minerale olie	Protocol	Ervaring	Eenvoudig	Verschillende typen bodem	Relevantie Biologische beschikbaarheid	Geen effect extractie middel	Extract volume	Extractie duur	Herhaalbaar resultaat	Oordeel
NEN 7343 kolom	-	+	+	--	+	+/-	+	+	--	+	+/-
NEN 7349 cascade	-	+	+	-	+	-	+	+	--	+	+/-
NEN 7341 beschikbaarheid	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
CEN TC 292	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Organische uitloogtesten	+/-	-	-	-	+	-	+	+	--	+/-	-
Eenmalige schudtesten met of zonder zouten	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Grondwater	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+/-	-
Poriënwater	-	-	+	+/-	-	++	+	--	+	--	-
Extractie-middelen	+/-	+/-	+/-	-	+	-	--	+	+	+	-

Zoals is aangegeven in tabel 7, is eigenlijk geen van de gebruikte extracties geschikt voor minerale olie, omdat olie slecht oplost in water. Alleen het gebruik van andere extractiemiddelen verbetert de extraheerbaarheid. Deze geven echter vaak een toxisch effect op de bioassays, en de relevantie voor biologische beschikbaarheid is niet aanwezig. Tijdens de extractie kan er verdamping en absorptie van minerale olie optreden. Met name de scheiding tussen grond en extract geeft altijd een verlies.

Vooraf voor de chemische uitloogtoetsen zijn er protocollen en ervaring. Deze zijn echter meestal gericht op het vrijkomen van componenten over een lange duur en niet op het simuleren van werkelijke concentraties. Ook voldoen de uitvoering en tijdsduur van deze testen niet aan de criteria. Aanpassing van de CEN TC 292-test is een mogelijke oplossing. Voor een eenmalige schudtest is de relevantie met de biologische beschikbaarheid niet geheel duidelijk.

3.3.2 Geselecteerde extractiemethode

Uit dit literatuuronderzoek komt geen gestandaardiseerde methode of andere methode naar voren die volledig voldoet aan de gestelde criteria. Met de informatie uit het literatuuronderzoek wordt daarom een nieuwe extractiemethode opgesteld die zo veel mogelijk bestaat uit een combinatie van toegepaste en bewezen technieken. Uit paragraaf 3.2 blijkt dat er veel verschillende parameters zijn die de samenstelling van het extract bepalen en kunnen veranderen. Het is daarom moeilijk om een extractie te selecteren waarbij rekening wordt gehouden met al deze parameters.

De eenvoudigst interpreteerbare extractie is een extractie die de werkelijkheid zo veel mogelijk simuleert. Omdat de praktijk wordt gesimuleerd, worden de belangrijkste parameters meegenomen die de toxiciteit in werkelijkheid beïnvloeden. De resultaten van de extractie zijn direct vergelijkbaar met concentraties in de praktijk. Dit biedt de mogelijkheid om verschillende gronden en verontreinigingen met elkaar te vergelijken.

Uit de bodem onttrokken poriënwater kan het extract van de praktijk worden genoemd. Een poriënwater is echter een momentopname van de bodem en is niet reproduceerbaar. Het is afhankelijk van het vochtgehalte van de gemonsterde bodem, dat onder andere wordt beïnvloed door eventuele regenval voorafgaand aan de bemonstering. Daarnaast is het vaak niet mogelijk om voldoende poriënwater te onttrekken uit een bodem om een bioassay uit te voeren.

Om een goed reproduceerbare toets op te zetten, is het dus noodzakelijk om water toe te voegen. Om de toets toch relevant te houden voor de praktijk en voor de bepaling van acute toxiciteit, moet de L/S-verhouding laag zijn, zodat de concentraties in oplossing relatief hoog blijven. AquaSense [1997] vond op Nederlandse verontreinigde bodem slechts matige toxische effecten. Om de toxische effecten goed meetbaar te houden, moet er daarom niet te veel worden verdund. AquaSense [1997] gebruikte evenveel water als bodem en dit lijkt de maximaal toepasbare hoeveelheid water. Bij dergelijke verhoudingen is de bodem nog goed handelbaar, bij minder wordt dit lastig. Een bodem met een hoog organisch gehalte houdt echter veel vocht vast dat moeilijk is te onttrekken.

Om dit probleem op te lossen wordt niet uitgegaan van het drogestofgehalte maar wordt de bodem eerst op de maximale WHC (*waterholding capacity*) gebracht [AquaSense, 1997]. De WHC is de maximale hoeveelheid water die een bodem kan vasthouden. Hiervoor wordt een hoeveelheid extractievloeistof (water) toegevoegd die even groot is als de hoeveelheid droge stof L/S 1. Dit betekent dat niet in elke bodem evenveel vocht wordt toegevoegd. In de praktijk zal een bodem met een hoog WHC gehalte meer water bevatten, en de voorgeschreven extractie volgt dus deze praktijk.

In de praktijk kan een verontreiniging worden verwijderd door omzetting (chemisch of biologisch) of door wegspoelen naar andere grondlagen of naar het grondwater, waarna weer nieuwe verontreiniging in oplossing komt (naleveringseffect). Het is dus noodzakelijk om dit effect mee te nemen. Een eenmalige schudtest neemt geen naleveringseffect mee en is daarom geen goede oplossing.

De beste simulatie van de praktijk is een kolomproef. Uit de ervaring met uitloogtesten blijkt echter dat een kolomproef (NEN 7343) omslachtig is (lange tijdsduur, laboratoriumbenodigdheden en dergelijke). Het is gebleken dat de resultaten van de kolomproef (NEN 7343) goed te vergelijken zijn met de resultaten van een cascade-achtige schudproef (NEN 7349; Van der Sloot, 1996). De eenvoudigste cascadeproef is een tweestapsschudproef. Op Europees niveau wordt nu een tweestapsschudproef ontwikkeld voor de beoordeling van afvalstoffen (CEN TC 292 WG 2) en het is gebleken dat de resultaten van deze proef redelijk te vergelijken zijn met de kolomproef (niet-gepubliceerde resultaten van Van der Sloot en KEMA).

Om de testmethode zo eenvoudig en goedkoop mogelijk te houden, wordt daarom een tweestapsschudproef geselecteerd. Een tweestapsschudproef komt redelijk overeen met de praktijk, is herhaalbaar, is eenvoudig uit te voeren en het naleveringseffect wordt meegenomen (wat niet het geval is bij een eenstapsproef), en voldoet dus aan de selectiecriteria.

Het lijkt mogelijk om aan te sluiten bij de CEN TC 292 WG 2-tweestapsuitloogproef. De proef van CEN TC 292 WG 2 heeft echter een hoge eind-L/S-waarde (L/S 10) omdat de chemische beoordeling van de uitloging over een langere periode wordt beschouwd. In dit project wordt een veel lagere L/S aangehouden.

De totale tijdsduur van de CEN TC 292 WG 2 is 24 uur. De test is opgebouwd uit een stap van zes uur en een stap van achttien uur. Dit wordt aangehouden. 24 uur is lang genoeg om een goede herhaalbaarheid van de extractie te garanderen, omdat voor de meeste processen dan een evenwichtssituatie optreedt. Dit geldt in ieder geval voor de processen die de acute toxiciteit veroorzaken. De indeling van zes en achttien uur is gekozen uit praktische overwegingen, zodat de proef over een dag en nacht goed uitvoerbaar is.

In de praktijk kan het voorkomen dat er bijvoorbeeld door regenwater zouten of zuur worden toegevoegd aan het poriënwater. Het effect hiervan is echter meestal verwaarloosbaar ten opzichte van de zouten in de bodem en ten opzichte van de buffercapaciteit van de bodem.

Toevoeging van zouten en zuur creëert wel een mogelijke fout bij de preparatie en kan problemen opleveren voor het toetsorganisme. Het heeft daarom de voorkeur om geen zuur of zouten toe te voegen. Om uitvloeking van organisch materiaal te voorkomen, zodat er geen verlies optreedt tijdens de extractie en scheiding van de vaste stof en vloeistof, wordt er echter calcium in lage concentraties toegevoegd. Er wordt daarom gewerkt met demiwater met 0,001 M CaNO_3 .

Daarnaast is het noodzakelijk om de uiteindelijke pH, geleidbaarheid en oxidatiegraad van het extract na scheiding te meten, zodat (indien het nodig voor het testorganisme) het extract later kan worden aangepast om in het testbereik van het specifieke toetsorganisme te komen.

Adsorptie, vervluchtiging en omzetting van verontreinigingen tijdens de extractie moeten zo veel mogelijk worden tegengegaan. Organische verontreinigingen hechten het minst aan glas, en om effect met licht te vermijden wordt er gewerkt in donker glas. Er moet zo weinig mogelijk lucht worden toegevoegd en daarom wordt er gewerkt in volle potten. Om toch een goede menging te krijgen, wordt er gewerkt op een rollerbank of *end-of-end rotator*. Er moet naar worden gestreefd om zo weinig mogelijk handelingen uit te voeren.

Voor de scheiding van de bodem en het extract wordt een filtratiestap over een membraanfilter (0,45 mm) voorgeschreven op een inert en hydrofiel materiaal (PVDF). Om vervluchtiging zo veel mogelijk tegen te gaan, moet er worden gefiltreerd in een overdrukopstelling. Bij hoge organische stofgehalten moet er eventueel eerst nog worden gecentrifugeerd. Dit is noodzakelijk als de filtratie erg langzaam wordt. Deze centrifugestap moet goed uitvoerbaar zijn en zo weinig mogelijk verlies geven (dus in gasdichte glazen buizen, bijvoorbeeld tien minuten bij 3000 RPM).

Om veranderingen tijdens de conservatie van het extract tegen te gaan, moet de bioassay zo snel mogelijk (binnen 24 uur) worden ingezet. In de tussentijd moet het extract koel en donker worden (5°C) bewaard in afgesloten glazen potten.

3.3.3 Extractieprocedure

Hieronder volgt een samenvatting van de voorgestelde extractieprocedure zoals die wordt beschreven in paragraaf 3.3.2.

Materiaal

- extractiemiddel: demiwater met 0,001 M CaNO_3 ;
- werken in donkere, glazen, luchtdichte potten (zo weinig mogelijk bovenstaande lucht);
- voor schudden gebruikmaken van rollerbank;
- filters van 0,45 mm van PVDF;
- overdrukfilteropstelling gebruiken.

Methode

WHC bepalen;

- bodemvochtgehalte aanvullen tot *waterholding capacity* (WHC);
- tweestapsschudtest uitvoeren met totale tijdsduur van 24 uur:
 - stap 1: eerste helft extractievloeistof toevoegen aan vochtige bodem tot L/S = 0.5 (liter extractiemiddel ten opzichte van droge stof, l/kg), op rollerbank plaatsen en na zes uur de extracten filtreren;*
 - stap 2: tweede helft extractievloeistof toevoegen aan afgefiltreerd materiaal tot L/S 0.5 (hierbij mag het inerte filter worden meegenomen in de extractie) en na achttien uur affiltreren;*
- extracten combineren en in een afzonderlijk monster pH, Eh en Ec meten;
- gecombineerde extracten bewaren in glazen potten in donker bij 5°C en binnen 24 uur bioassay uitvoeren.

Om te controleren of deze proef aan alle eisen kan voldoen, wordt de testprocedure voorgelegd aan deskundigen van IWACO, RIZA, RIVM, DECHEMA en LUW.

- * Als er hoge concentraties organische stof aanwezig zijn, moet er eerst worden gecentrifugeerd in gasdichte glazen centrifugebuizen (tien minuten bij 3000 RPM) omdat de filtratie anders zeer moeizaam verloopt.

HOOFDSTUK 4

KARAKTERISERING EN SELECTIE DEELLOCATIES

4.1 Inleiding

4.1.1 Algemeen

Het onderzoek wordt geconcentreerd op de locatie Petroleumhavenweg in Amsterdam. Dit terrein is al sinds begin deze eeuw in gebruik als op- en overslaglocatie voor brandstoffen, en de bodem is daardoor op vele plaatsen verontreinigd met minerale olie. Aangezien deze terreinen een industriële bestemming hebben (met op veel plaatsen overslag van brandstoffen), is het voor het havenbedrijf acceptabel dat een restfractie verontreiniging aanwezig blijft in de bodem. Een deel van het terrein is al gesaneerd via een *landfarming*-proces.

Op de locatie staan twee *landfarm*-hallen die momenteel bij De Vries en Van de Wiel in gebruik zijn voor biologische grondreiniging. De bestemming van de gereinigde grond is lokaal, aangezien binnen het havengebied grond mag worden verwerkt met een zekere restconcentratie. Het terrein waarop deze hallen zich bevinden, is nog niet gesaneerd en het is de bedoeling om deze grond te saneren via biologische in-situtechnieken. Hiertoe wordt een pilotproef ingericht op de locatie.

4.1.2 Doelstelling

De doelstelling van deze fase van het onderzoek is geschikte deellocaties te identificeren op de locatie Petroleumhavenweg in Amsterdam waar fase 1.1 (de veldmeting bioassays) en de latere fase 2 (het pilotonderzoek) kunnen worden uitgevoerd.

4.1.3 Gebruikte informatie

Voor deze studie is gebruikgemaakt van het OMEGAM-rapport *Bodemonderzoek op het landfarmterrein aan de Petroleumhavenweg te Amsterdam* (mei 1996). De monsternamen en chemische analyses zijn uitgevoerd in april 1996.

4.2 Locatiebeschrijving

4.2.1 Bodemopbouw

De locatie heeft een oppervlakte van circa 10.500 m². Het terrein is aan het einde van de vorige eeuw opgehoogd met bagger die vrijkwam bij het graven van de Petroleumhaven. Daardoor is de bodemopbouw door antropogene invloeden bepaald. Op het grootste gedeelte van het terrein bestaat de bodem tot op een diepte van mv -3 à -4 m (maximale boordiepte) voornamelijk uit matig grof ophoogzand met plaatselijk bijmenging met puin. Op het westelijk deel van het onderzoekerrein (bij de weg) is de ophooglaag 1 tot 2 m dik. Daaronder ligt een kleilaag tot de maximale boordiepte. Het gaat hier om een kleidijk die is opgehoogd ten tijde van de aanleg van de haven en waartussen het gebaggerde materiaal is aangebracht.

4.2.2 Verontreinigingssituatie

Voor de bemonstering is het gebied verdeeld in kwadranten van 10 bij 15 m. Van elk kwadrant zijn op verschillende dieptes bodemonsters genomen. Als een verontreiniging organoleptisch (reuk, zicht) werd geconstateerd, werd een monster en eventueel omliggende monsters geanalyseerd op het gehalte aan minerale olie. Daarnaast zijn er zeven grondwatermonsters genomen en geanalyseerd op minerale olie en vluchtige aromatische koolwaterstoffen. De overige verontreinigingen (zware metalen, PAK, organo-halogenverbindingen, cyanide en zwavel) werden op een beperkt aantal (drie) mengmonsters geanalyseerd.

De resultaten van de analyses op minerale-olieverontreiniging op de locatie staan in tabel 8 en figuur 1.

Tabel 8 Minerale-olieverontreiniging Petroleumhavenweg

Monsterpunt	Minerale olie hoogste concentratie (mg/kg ds)	Fractieverdeling in % C10-C19/C19-C29/C29-C35/C35-C40	Diepte	Bodemtype
12.2	6300	83/16/0/0	1 m	1 m zand, daaronder klei
13.5	170	57/24/16/4	2 m	zand
14.1	720	4/45/41/10	toplaag	zand
15.1	1700	57/32/8/2	toplaag	zand, op 2 m klei
16.3	5600	81/17/1/0	1 m	zand
17.4	410	85/6/7/2	2 m	klei
2.4	400	6/37/44/13	1 m	matig grof zand
20.4	1600	69/26/4/1	1,5 - 2 m	zand
23.1	300	22/52/21/5	toplaag	zand, klei op 1 m
24.2	17000	86/13/1/0	0,5 m	zand, klei op 1 m
26.2	3600	64/30/5/1	1 m	zand
27.1	1300	42/41/13/3	toplaag	zand
28.2	3900	63/28/8/1	0,5 m	zand
3.1	84	7/50/36/7	toplaag	matig grof zand
1.1	190	12/42/37/9	ondiep	zand
6.1	780	20/39/32/9	ondiep	zand
4.1	240	13/43/34/9	tot 2 m	zand
5.7	2300	92/6/2/0	1,7 m	zand
8.1	4200	5/62/29/4	ondiep	zand
7.1	400	11/62/23/5	ondiep	zand, daaronder klei
9.3	1600	96/3/1/0	1 - 2 m	zand
10.1	150	10/56/28/6	tot 1,5 m	zand, daarna (170) klei
11.3	4300	79/19/1/0	> 1 m	klei
19.1	5900	77/20/3/1	ondiep	zand
18.4	4700	71/26/2/0	2 m	zand
21.3	1400	65/25/9/2	> 2 m	zand
22.5	2600	79/17/3/1	2 - 3 m	zand
25.2	7300	72/21/2/0	1,5 m	zand

Figuur 1 Locatieschets

Uit tabel 8 en figuur 1 blijkt dat het terrein grofweg in drie delen is te verdelen:

- Het noordelijke deel is licht verontreinigd (< 1000 mg/kg ds) en de fractieverdeling geeft aan dat er vooral een middelzware fractie (C19 - C29) aanwezig is. De verontreiniging concentreert zich in de bovenste laag van het zandpakket.
- Het westelijke gedeelte van het terrein, langs de weg, bevat op enkele plaatsen hogere concentraties minerale olie (tot 6300 mg/kg ds). Deze concentraties worden met name door de lichte fractie bepaald. De verontreiniging zit bijna uitsluitend in het ondiepe zandpakket (tot 1 m). De klei daaronder is niet of weinig verontreinigd.
- Het zuidelijke deel van het terrein is het zwaarst verontreinigd, met concentraties tussen de 200 en 6000 mg/kg ds. Ook hier bestaat de verontreiniging voornamelijk uit de lichte fractie (C10 - C19). De verontreiniging is daarnaast ook aanwezig tot een grotere diepte in het zandpakket.

De bodem is slechts licht verontreinigd met PAK (1 tot 7 mg/kg ds).

4.2.3 Selectie criteria

De monsters die worden genomen voor de uitvoering van bioassays in fase 1.1, moeten voldoen aan een aantal voorwaarden.

Concentratie

In fase 1.1 wordt gezocht naar een meetbaar effect van de verontreiniging in de bioassay. Dit betekent dat de concentratie verontreiniging hoog genoeg moet zijn om een effect meetbaar te maken. Daarnaast moeten er monsters zijn met een lage verontreinigingconcentratie maar met verder zo veel mogelijk vergelijkbare bodemkarakteristieken die als referentie kunnen dienen. De verwachting is dat monsters met een hoge concentratie verontreiniging een sterker toxisch signaal te zien geven dan monsters met een lage verontreinigingconcentratie. Beide dienen aanwezig te zijn in de initiële screening. Geprobeerd wordt om via de keuze van monsterplaatsen een concentratiegradiënt van minerale olie in de verschillende monsters te krijgen. Dit maakt het makkelijker om correlaties te leggen tussen concentratieniveaus en resultaten van de bioassays.

Type verontreiniging

Er zijn op de locatie in principe twee typen verontreiniging te onderscheiden: minerale olie met een hoog aandeel aan lichte (C10 - C19) fractie en minerale olie met een hoog aandeel in de middelzware (C19 - C35) fractie. De relatieve toxiciteit van beide fracties is (nog) niet bekend. Waarschijnlijk zal een biologische sanering behalve tot een algehele concentratie-afname leiden tot een verschuiving in de fractieverdeling van de lichte naar de zware fractie. Dit komt door de preferente afbraak van de lichte fractie, waardoor de zwaardere fracties overblijven. Beide fracties zijn daarom zowel in het begin als tegen het einde van de sanering van belang als dominante verontreiniging en dienen in deze initiële screening aanwezig te zijn.

Bodemtype

De meeste verontreiniging op de locatie bevindt zich in het zandpakket. De onderliggende kleilaag is slechts op enkele plaatsen verontreinigd. Daarom wordt ervoor gekozen om het onderzoek te beperken tot zandige grond. Op deze manier worden effecten van bodemtype (bijvoorbeeld deeltjesgrootte) op de testorganismen beperkt tot het effect van de zandige fractie, wat het onderzoek vereenvoudigt. Ook potentiële problemen bij de behandeling van klei (affiltreren elutriaat) worden hiermee vermeden zonder afbreuk te doen aan de belangrijkste doelstelling uit het onderzoek (namelijk de effectiviteit van bioassays bepalen). Uit het OMEGAM-onderzoek zijn twee belangrijke parameters voor de uitvoering van bioassays - het lutumgehalte en het organisch-stofgehalte - slechts in enkele mengmonsters meegenomen. Zowel de lutumfractie als het organisch-stofgehalte is in deze monsters laag: enkele procenten (2%). Dit is gunstig met het oog op versturende effecten van lutum en organisch stof op bioassays, maar beide parameters moeten bij de veldscreening wel worden bepaald.

4.3 Selectie deellocales

Op basis van bovenstaande criteria worden de volgende deellocaties geselecteerd. Monsters met een hoge verontreiniginggraad worden genomen op het zuidelijke deel van de locatie. Hier is een vrij grote spreiding in de analysedata te vinden, die zich echter allemaal bevinden rond de hogere concentraties (enkele duizenden mg/kg ds). Op deze deellocatie worden daarom monsters verwacht met hogere concentraties en eventueel hogere toxische waarden.

Monsters met een lage verontreiniginggraad worden genomen op het noordelijke deel van de locatie. De meeste analysedata op deze deellocatie wijzen op de aanwezigheid van een lage verontreiniginggraad (enkele honderden mg/kg ds). Op deze deellocatie worden daarom monsters verwacht met lagere concentraties en eventueel lagere toxische waarden. Daarnaast geldt dat op beide deellocaties de bodemopbouw vergelijkbaar is, voornamelijk bestaande uit matig grof zand.

De enige geschikte en beschikbare plaats voor de pilotproef ligt voor de eerste loods, tussen monsterpunt 18 en 25. Momenteel ligt hier materiaal opgeslagen, maar dit kan worden verplaatst. De verontreiniginggraad in dit gedeelte is redelijk hoog (concentratie minerale olie van 4700 tot 7300 mg/kg dg). Er is besloten om de pilotproef uit te voeren op het perceelgedeelte tussen monsterpunt 18 en 25.

4.4 Selectie monsternamenpunten

De monsternamenpunten worden geselecteerd op basis van bovengenoemde criteria. Het is echter te verwachten dat de monsters nooit helemaal de concentratie en fractieverdeling zullen hebben die op basis van deze studie worden verwacht. Er worden twaalf verschillende monsters genomen. Voorgesteld wordt om deze twaalf monsters te verdelen over zes proefvakken, zodat er per verwachte concentratie twee monsters beschikbaar zijn.

De deellocatie zuid is in principe geschikt en beschikbaar voor de uitvoering van de pilotproef tussen monsterpunt 18 en 25. Om de pilotlocatie niet door bemonstering te verstoren worden hier nog geen monsters genomen voor de initiële screening, maar liggen enkele van de monsterpunten hier dicht in de buurt.

Monsters voor de veldkarakterisering zullen worden genomen op het noordelijke, licht verontreinigde gedeelte en op het zuidelijke, zwaarder verontreinigde gedeelte van het terrein. De definitieve bemonstering hangt af van de mogelijkheden ter plaatse. De twee monsters per vak worden enkele meters uit elkaar genomen. Er is dus sprake van twaalf onafhankelijke monsters. De bemonstering wordt uitgevoerd door Witteveen en Bos.

Monstervoorbewerking

Bodemmateriaal wordt opgeboord en grove bestanddelen (stenen, takken) worden verwijderd. De monsters worden handmatig opgemengd, waarna er deelmonsters worden genomen voor de verschillende analyses. Er wordt geprobeerd om de heterogeniteit in de monsters zo klein mogelijk te houden. Dit is van belang bij de interpretatie van de resultaten van de verschillende analyses.

Parameters

De monsters worden geanalyseerd op de volgende parameters:

Chemische analyses:

- droge stof (Witteveen en Bos);
- organische stof (Witteveen en Bos);
- lutumgehalte (Witteveen en Bos);
- minerale olie (Witteveen en Bos);

- zware metalen (Witteveen en Bos);
- PAK's (Witteveen en Bos);
- extraheerbare organohalogeenvverbindingen (Witteveen en Bos).

Microbiologische analyses:

- MPN minerale olie (Bioclear);
- dehydrogenase-activiteit (Bioclear).

Bioassays:

- Microtox (KEMA);
- ECHA-test (AquaSense);
- aquatische algentest (AquaSense);
- wortelgroeiremmingtest (AquaSense);
- immobiliteitstest met de bacterie-etende nematode (AquaSense);
- immobiliteitstest met de springstaart (AquaSense);
- immobiliteitstest met de watervlo (AquaSense);
- chronische test met planten (VU);
- reproductietest met de springstaart (VU) ;
- veertiendaagse reproductietest met de regenworm (VU).

4.5 Selectie pilot

Op de locatie is een zonering aan te geven naar verontreinigingsgraad. In dit onderzoek wordt de veldscreening uitgevoerd op monsters van de deellocaties noord en zuid, die respectievelijk weinig (enkele honderden mg/kg ds) en sterk (enkele duizenden mg/kg ds) vervuild zijn met minerale olie. De pilotproef zal later worden uitgevoerd op het sterk verontreinigde locatiegedeelte.

HOOFDSTUK 5

CONCLUSIES EN AANPAK

5.1 Extractiemethoden

De extractiemethode die wordt gevolgd, bestaat uit een tweetrapsextractiemethode met water. Dit waterig extract wordt na filtratie direct gebruikt voor de uitvoering van bioassays. De exacte methode staat beschreven in hoofdstuk 3. De extracties worden uitgevoerd onder verantwoordelijkheid van KEMA.

5.2 Bioassays

De volgende bioassays worden uitgevoerd door AquaSense:

- de ECHA-test, gebruikmakend van *Bacillus* sp., met als effectparameter bacteriële groeiremming;
- een aquatische algentest (waarin de populatiegroeisnelheid van de alg *Scenedesmus subspicatus* of *Selenastrum capricornutum* wordt gemeten);
- een wortelgroeiremmingtest, die wordt uitgevoerd met sla (*Lactuca sativa*) op agar, waar elutriaat doorheen is gemengd;
- een acute immobiliteitstest met de bacterie-etende nematode *Plectus acuminatus*;
- een acute immobiliteitstest met de springstaart *Folsomia candida*;
- een acute immobiliteitstest met de watervlo *Daphnia magna*.

De volgende bioassay wordt uitgevoerd door KEMA:

- de Microtox, gebruikmakend van de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*), met als effectparameter afname in bioluminescentie.

De volgende bioassays worden uitgevoerd door de VU:

- een chronische test met sla (planten);
- een reproductietest met de springstaart *Folsomia candida*;
- een veertiendaagse reproductietest met de regenworm *Eisenia fetida*.

Overige analyses

De monsters worden verder geanalyseerd op de volgende parameters:

Chemische analyses:

- droge stof (Witteveen en Bos);
- organische stof (Witteveen en Bos);
- lutumgehalte (Witteveen en Bos);
- minerale olie (Witteveen en Bos);
- zware metalen (Witteveen en Bos);
- PAK's (Witteveen en Bos);
- extraheerbare organohalogenenverbindingen (Witteveen en Bos).

Microbiologische analyses:

- MPN totaal aërobe bacteriën (Bioclear);
- MPN minerale olie (Bioclear);
- dehydrogenase-activiteit (Bioclear).

Deellocaties

De monsters voor de veldkarakterisering worden genomen op het noordelijke, licht verontreinigde gedeelte en op het zuidelijke, zwaarder verontreinigde gedeelte van het terrein. De monsters voor de kolomproeven worden genomen tussen monsterpunt 18 en 25.

LITERATUUR

Ahlf, W., J. Gunkel en K. Rönnpagel, 1993.

Toxikologische Bewertung von Sanierungen, in R. Stegeman (ed.), *Bodenreinigung; biologische und chemisch-physikalische Verfahrensentwicklung unter Berücksichtigung der bodenkundlichen, analytischen und rentlichen Bewertung*, Economica Verlag, Bonn, p. 275-286.

Ankley, G.T., 1991.

Predicting the toxicity of bulk sediment to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs. Elutriate, *Environ. Tox. Chem.*, 10, p. 1359-1366.

AquaSense, 1996.

Acute bioassay met de terrestrische springstaart soort Folsomia candida. Verbetering van de methode en onderzoek naar de toepasbaarheid, stageverslag, rapportnr. 96.0859.

AquaSense, 1997a.

Beoordeling toxiciteit van verontreinigde grond uit uiterwaarden. Beoordeling met behulp van bioassays met de terrestrische springstaart Folsomia candida, in opdracht van Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, AquaSense, Amsterdam.

AquaSense, 1997b.

Beoordeling saneringsurgentie verontreinigde bodems met bioassays, in opdracht van VROM-DGM Directie Bodem en AquaSense, Amsterdam.

ASTM, 1990.

Standard guide for conducting seed germination and root elongation soil elutriate chronic toxicity bioassay (draft), *Annual book of ASTM standards*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Baun, A., N. Nyholm, J.V. Stoyanov en K.O. Kusk, 1997.

Application of algal test on soil suspensions for assesing potential bioavailable toxicity, In situ and on site bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28-may 1, volume 4, p. 1-3.

BBA, 1994.

BBA guideline, part VI, 2-2, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin.

Belfroid, A.C., 1994.

Toxicokinetiek en biologische beschikbaarheid van organische contaminanten voor de regenworm in Vogelmeerpoldergrond, Bodembreed 6e National Symposium Bodemonderzoek, Programmabureau Bodemonderzoek, Wageningen.

Bierkens, J., G. Klein en G. Schoeters (red.), 1997.

De gevoeligheid van 20 bioassays voor bodem: een vergelijkende studie. Eindverslag, rapportnr. TOX.RB97001, Project Natuurgebieden, Vlaamse Instelling voor Technol. Onderzoek VITO, Mol, België.

Bioclear, AquaSense, KEMA Environmental Services en Witteveen en Bos, 1997.

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in situ biorestauratie, Nobis-basisprojectplan, versie 1.2, projectnr. 96-1-13.

Bowers, N., J.R. Pratt, D. Beeson en M. Lewis, 1997.

Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (2), p. 207-213.

Brils, J.M. en P.J. den Besten, 1995.

Bioassays: het orakel van de ecotoxicologie?, in opdracht van Programma Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems (POSW), Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA), AquaSense-rapport 94.0681, Amsterdam.

Brinkmann, M., H. Stroo, A. Leuachner, D. Leuteriz en M. Stromberg, 1997.
Soil toxicity test to evaluate remediation of wood preservatives, In situ and on site bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28-may, 1.

Brinkmann M.R., H. Stroo, D. Leuteriz, A. Leuschner, M. Stromberg en M.D. Brouman, 1996.
Environmentally acceptable endpoints for land treatment of creosote and pentachlorophenol, handout.

Clark, R.C. en D.W. Brown, 1977.
Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems, in D.C. Malins (ed.), *Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms; vol I: nature and fate of petroleum*, Academic Press, p. 1-89.

Debus, R. en R. Niemann, 1994.
Nematode test to estimate the hazard potential of solved contaminations, *Chemosphere*, 29, p. 611-621.

DECHEMA, 1995.
Biologischer Testmethoden für Böden, Adhoc-Arbeitsgruppe Methoden zur Toxicologischen/Ökotoxikologischen Bewertung von Böden, Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA), Interdisziplinären Arbeitskreises 'Umweltbiotechnologie - Boden', 4, Frankfurt am Main.

Dyrborg, S, E. Arvin en H.H. Hansen, 1997.
Toxicity during the aerobic biodegradation of naphthalene and benzothiopene, In situ and on site bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28-may 1, volume 4, p. 7-9.

Fisher, D.R. en A.G. Seech, 1995.
The impact of soil toxicity testing on bioremediation technology, *Environmental Science & Engineering*, january 1995.

Forge, T.A., M.L. Berrow, J.F. Darbyshire en A. Warren, 1993.
Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii*, *Biology and Fertility of Soils*, 16, p. 282-286.

Gälli, R., C.D. Munz en R. Scholz, 1994.
Evaluation and application of aquatic toxicity test, use of the Microtox test for the prediction of toxicity based upon concentrations of contaminants in soils, *Hydrobiologica*, 275, p. 179-189.

Gestel, C.A.M. van, E.M. Dirven-van Breemen en J.W. Kamerman, 1992a.
Beoordeling van gereinigde grond. IV: Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegronden, RIVM, Bilthoven.

Gestel, C.A.M. van, E.M. Dirven-van Breemen en J.W. Kamerman, 1992b.
Beoordeling van gereinigde grond. V: Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op verontreinigde en gereinigde gronden, RIVM, Bilthoven.

Gestel, C.A.M van, 1997.
Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bioassays, in N.M. van Straalen en H. Løkke (ed.), *Ecological risk assessment of contaminants in soil*, Chapman & Hall, London.

Giesy, J.P., C.J. Rosiu en R.L. Graney, 1990.

Benthic invertebrate bioassay with toxic sediment and pore water, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, p. 233-248.

Greene, J.C., C.I. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, G. Linder, S.A. Peterson en M.J. Miller, 1989.

Protocol for short term toxicity screening of hazardous waste sites, EPA 600/3-88-029.

Green A.S., G.T. Chandler en E.R. Blood, 1993.

Aqueous-, porewater- and sediment-phase cadmium: toxicity relationships for a meiobenthic copepod environ, *Tox. Chem.*, 12, p. 1497-1506.

Griest, W.H., A.J. Stewart, R.L. Tyndall, J.E. Caton, D.H. Ho, K.S. Ironside, W.M. Caldwell en E. Tan, 1993.

Chemical and toxicological testing of composted explosives contaminated soil, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, p. 1105-1116.

Guchte, C. van de, H. Eijsackers, P.J. den Besten, C.A.M. van Gestel, T. Aldenberg, T.P. Traas en P.C. de Ruiter, 1996.

Ecotoxicologische risicobeoordeling van verontreinigde (water)bodems. Hoe verder?, Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (PGBO), Wageningen.

Gunkel, J., W. Ahlf en K. Rönnpagel, 1993a.

Toxikologische Bewertung von Sanierungen, in R. Stegman (ed.), *Bodemreinigung. Biologische und chemische-physikalische Verfahrensentwicklungen unter Berücksichtigung der bodenkundlichen, analytischen und rechtlichen Bewertung*, Economica Verlag, Bonn, p. 275-286.

Gunkel, J., K. Rönnpagel en W. Ahlf, 1993b.

Eignung mikrobieller Biotests für gebundene Schadstoffe, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 21, p. 215-220.

Gupta, S.K., 1991.

Soil interaction assesment of ecotoxicological risk of accumulated metals in soils with help of chemical methods standardized through biological tests, in J.P. Vernet (ed.), *Heavy metals in the environment*, Elsevier, Amsterdam, p. 38-55.

Harkley, G.A., P.F. Landrum en S.J. Klaine, 1994.

Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays, *Environ. Tox. Chem.*, 13, p. 1315-1329.

Hatzinger, P B. en M. Alexander, 1995.

Effect of aging of chemical in soil on their biodegradability and extractability, *Environ. Sci. Technol.*, 29, p. 537-545.

Hill, I.R., P. Matthiessen en F. Heimbach (red.), 1993.

Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments, from the 'workshop on sediment toxicity assessment', held at Slot Moermond congresscentrum, Renesse, The Netherlands, 8-10 november, Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europa (SETAC-Europe).

Hsu, F.C., M. Singh en S. Cunningham, 1997.

Ecotoxicological and human toxicology studies on weathered petroleum-contaminated soils, In situ and on site bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28-may 1, volume 4, p. 17.

ISO, 1989.

ISO 8692. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, 1993a.

ISO 11268-1: *Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, 1993b.

ISO 11269-1: *Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of root growth*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, 1995.

ISO 11269-2: *Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, 1996.

ISO 6341 *Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, in voorber. (a).

ISO 11267: *Soil quality - Effect of pollutants on collembola (Folsomia candida) - Methods for the determination of effects on reproduction*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, in voorber. (b).

ISO 11268-2: *Soil quality - Effect of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) - Part 2: Determination of effects on reproduction*, International Organization for Standardization, Genève.

ISO, in voorber. (c).

ISO/TC 190/SC 4 N 126: *Bioassays using soil algae*, International Organization for Standardization, Genève.

IWACO, 1991.

Evaluatie van de bruikbaarheid van uitloogextracten voor het uitvoeren van biologische test, rapportnr. 10.23180, Rotterdam.

Jenner, H.A., 1995.

Assesment of ecotoxicological risks of element leaching from pulverized coal ashes, proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen.

Kamerman, J.W. en C.A.M. van Gestel, 1991.

Beoordeling van gereinigde grond. III: De ontwikkeling van bioassays, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven.

Kammenga, J.E., 1995.

Phenotypic plasticity en fitness consequences on nematodes exposed to toxicants, proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen..

Kammenga J.E., P.H.G. van Koert, J.A.G. Riksen, G.W. Korthals en J. Bakker, 1996.

A toxicity test in artificial soil based on the life-history strategy of the nematode *Plectus acuminatus*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (5), p. 722-727.

Keddy, C., J.C. Greene en M.A. Bonnell, 1994.

A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada, Scientific Series No. 198, Ecosystem Conservation Directorate Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ontario, Canada.

Kehres, B., R. Gottschall en H. Vogtmann, 1994.

Bestimmung und Bewertung der Pflanzenverträglichkeit von Kompost mit Sommergerste, *Müll und Abfall*, 4-94, p. 238-243.

- KEMA, 1996.
Ontwikkeling van een snelle detectiemethode voor de verontreiniginggraad van bodemmonsters met behulp van een directe toxiciteitsmeting, rapportnr. 64780-KES/WBR 96-3119.
- Klepka, S., M. Groer, R. Petto, C. Rutschmann-Fröhlich en S. Schmitzer, 1997.
Ökotoxikologische Prüfverfahren in der Sanierungsbegleitung, presentation at the Zweite deutschsprachige SETAC Tagung, Aachen, 24-25 februari.
- Klepka, S. en I. Schuphan, 1997.
Bioassays for soils, poster presented at the Zweite deutschsprachige SETAC Tagung, Aachen, 24-25 februari.
- Krantzberg, G. en D. Boyd, 1992.
The biological significance of contaminants in sediment from Hamilton Harbour, Lake Ontario, *Environ Toxicol. Chem.*, 11, p. 1527-1540.
- Leeuwen, C.J. van en J.L.M. Hermens (red.), 1995.
Risk assessment of chemicals: an introduction, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Liu, D., 1981.
A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, p. 145-149.
- Loehr R.C. en M.T. Webster, 1997.
Changes in toxicity and mobility resulting from bioremediation processes, *Bioremediation Journal*, 1 (2), p. 149-163.
- Løkke, H. en C.A.M. van Gestel, 1998.
Handbook of soil invertebrate toxicity tests, John Wiley & Sons, Chichester.
- Ma, W.C., H. Siepel en J.H. Faber, 1997.
Onderzoek naar mogelijke ecotoxikologische effecten van bodemverontreiniging in de uiterwaarden op de terrestrische invertebratenfauna, IBN-rapport 289, Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek IBN-DLO, Wageningen.
- Maas, J.L. en E.M.M. Grootelaar, 1992.
Triade ringonderzoek. Operationele uitwerking. Het bepalen van de toxiciteit van sediment en poriewater m.b.v. bioassays, Rijkswaterstaat en RIZA AOCE nr. 92-08.
- Meier, J.R., L.W. Chang, S.Jacobs, J.Torsella, M.C. Meckes en M.K. Smith, 1997.
Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls, *Envir. Toxicol. Chem.*, 16 (5), p. 928-938.
- Meinerling, M., 1997.
Wirkungsprüfung kontaminierter Böden auf wirbellose Bodemorganismen, presentation at the Zweite deutschsprachige SETAC Tagung, Aachen, 24-25 februari, in Zusammenarbeit mit IBACON GmbH, Rossdorf.
- Munckhof, G.P.M. van den en M.F.X.W. Veul, 1994.
Milieuhygiënische beoordeling van het biologische reinigingsproces van met olieproducten verontreinigde grond door middel van uitloogproeven en bioassays, *Samenvattingen Nationaal Symposium Bodem Breed*, 6-7 december, De Blijde Wereld, Lunteren, p. 142-144.
- Nebeker, A.V., M.A. Cairns, J.H. Gakstatter, K.W. Malueg, G.S. Schuytema en D.F. Krawczyk, 1984.
Biological methods for determining of contaminated freshwater sediments to invertebrates, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, p. 617-630.

NEN, 1988.

NEN 5794: Bodem - Bepaling van de acute toxiciteit van chemische stoffen voor regenwormen, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN, 1991.

NEN 5797: Bodem - Bepaling van het effect van chemische stoffen op de reproductie bij regenwormen, in ontwikkeling, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN, 1993.

*NVN 6516: Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Photobacterium phosphoreum**, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, augustus 1993.

Noteboom, J. en L. Posthuma (red.), 1995.

Validatie toxiciteitgegevens en risicogrenzen bodem: voortgangsrapportage 1994, RIVM-rapportnr. 719102045, TNO-rapportnr. MW-R 95/052.

OECD, in voorber.

Enchytraeid reproduction test, Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

OECD, 1984a.

OECD guideline for testing of chemicals. 'Alga, growth inhibition test', OECD guideline 201, Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

OECD, 1984b.

OECD guideline for testing of chemicals. 'Daphnia sp., acute immobilisation and reproduction test', OECD guideline 202, Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

OECD, 1984c.

OECD Guideline for testing of chemicals. 'Earthworm, acute toxicity test', OECD guideline 207, Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

OECD, 1984d.

OECD Guideline for testing of chemicals. 'Terrestrial plants, growth test', OECD guideline 208, Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

OMEGAM, 1996.

Bodemonderzoek op het landfarmterrein aan de Petroleumhavenweg te Amsterdam, Amsterdam, mei 1996.

Pauw, N. de, C. Janssen en G. Persoone, 1992.

Biologische en toxicologische monitoring van het aquatische milieu, Verhandelingen van de Fac. L & TBW, Univ. Gent, 32, 7/1-21, PUO, 2 december.

Persoone, G., M. Goyvaerts, C. Janssen, W. de Coen en M. Vangheluwe, 1993.

Cost effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits, Final Report. Comm. of the Europ. Comm., contractnr. ACE 89/BE 2/D3.

Porcella, D.B., 1983.

Protocol for bioassessment of hazardous waste sites, EPA 600/2-83-054, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR.

Pratt, J.R., M. Hummel en Z. Xu, 1996.

Rapid estimation of toxicity using soil ciliates, *Bull. Environ. Toxicol. Chem.* (in press).

Rijn, J.P. van, N.M. van Straalen en J. Willems, 1995.

Handboek bestrijdingsmiddelen; gebruik en milieu-effecten, VU Uitgeverij, Amsterdam.

- RIVM, 1993.
Toxiciteitsmetingen m.b.v. de Microtox methode aan poriewater en poriewaterconcentraten van sedimenten uit enkele regionale wateren in Noord-Holland, RIVM-rapportnr. 719102 024.
- RIVM, 1994.
Beperkt ringonderzoek met de kolomproef voor polycyclische koolwaterstoffen (PAK), RIVM-rapportnr. 771402002.
- RIVM, 1995a.
Emissie van polycyclische koolwaterstoffen (PAK) uit diverse bouwmaterialen en afvalstoffen, RIVM-rapportnr. 771402003.
- RIVM, 1995b.
Verskil tussen centrifugeren en filtreren van eleuaten van uitloogproeven voor polycyclische koolwaterstoffen (PAK) organochloorbestrijdingsmiddelen (OCB) en plyphloorbifenylen (PCB), RIVM-rapportnr. 771402017.
- RIVM, 1996a.
Ontwikkeling van uitloogproeven voor minerale olie, RIVM-rapportnr. 771402 020.
- RIVM, 1996b.
Uitloging van PCB's en EOX uit afvalstoffen met kolom, cascade en aangepaste CEN-proef (materiaalonderzoek), RIVM-rapportnr. 771402 021.
- Römbke J. en T. Knacker, 1989.
Aquatic toxicity test for enchytraeids, *Hydrobiologia*, 180, p. 235-242.
- Ronday, R., 1996.
Hoeveel last hebben bodemdieren van verontreinigde grond?, *Bodem*, 3, p. 120-122.
- Ronday, R. en N.W.H. Houx, 1996.
Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water, *Pedobiologia*, 40, p. 106-112.
- Ronday, R., A.M.M. van Kammen-Polman, A. Dekker, N.W.H. Houx en M. Leistra, 1997.
Persistence and toxicological effects of pesticides in topsoil: use of the equilibrium partitioning theory, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (4), p. 601-607.
- Rudolph, P. en R. Boje, 1986.
Ökotoxikologie. Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung nach dem Chemikaliengesetz, Ecomed Verlag, Landsberg/Lech.
- Salanitro, J.P., P.B. Dorn, M.H. Huesemann, K.O. Moore, I.A. Rhodes, L.M. Rice Jackson, T.E. Vipond, M.M. Western en H.L. Wisniewski, 1997.
Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment, *Environ. Sci. Technol.*, 31, p. 1769-1776.
- Sanchez. A.F.A en L. Postuma, 1995.
Sublethal effects and kinetics of PAHs in Eisenia andrei Worms, Bodembreed 7e National Symposium Bodemonderzoek, Programmabureau Bodemonderzoek, Wageningen.
- Scholten, M.C.Th., H.P.M. Schobben. C.C. Karman, R.G. Jak en H. van het Groenewoud, 1993.
De berekening van het Maximaal Toelaatbare Risico niveau van olie en oliecomponenten in water en sediment, TNO-rapport IMW-R93/187.
- Scholten, M.C.Th., N.H.B.M. Kaag, H.P. van Dokkum, R.G. Jak, H.P.M. Schobben en W. Slob, 1996.
Toxische effecten van olie in het aquatische milieu, TNO-rapport TNO-MEP-R96/230.

Simini, M., K.S. Wentzel, R.T. Checkai, C.T. Philips, N.A. Chester, M.A. Major en J.C. Amos, 1995.
Evaluation of soil toxicity at Joliet Army Ammunition Plant, *Environ. Tox. Chem.*, 14, p. 623-630.

Skøt, M., E. Arvin, O. Kusk en S. Dyreborg, 1995.
Ecotoxicological testing of creosote contaminated soils (MGP site), *Land Contamination & Reclamation*, volume 3, 3-18-3-20.

Sloot, H.A. van der, 1996.
Developments in evaluating environmental impact from utilization of bulk inert wastes using laboratory leaching tests and field verification, *Waste Management*, vol. 16, p. 65-81.

Smit, C.E., 1997.
Field relevance of the Folsomia candida soil toxicity test, proefschrift Vrije Universiteit, Amsterdam.

Stephenson, G.L., A. Kaushik, K.R. Solomon en R.P. Scroggins, 1997.
Can sublethal toxicity test results predict acute or chronic toxicity of contaminated soils to earthworms?, presentatie gehouden op de 2nd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, 3-5 april, Amsterdam.

Stortelder, P.B.M., M.A. van der Gaag en L.A. van der Kooij, 1989.
Kansen voor waterorganismen. Een ecologische onderbouwing voor kwaliteitsdoelstellingen voor water en waterbodem, DBW/RIZA-nota 89.016a.

STOWA (Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer), 1997.
Ecotoxicologische beoordeling van verontreinigde waterbodems, 97-42, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Utrecht.

Straalen, N.M. van en J.A.C. Verkleij, 1991.
Leerboek oecotoxicologie, VU Uitgeverij, Amsterdam.

Straalen, N.M. van en C.A.M. van Gestel, 1993.
Ecotoxicological test methods using terrestrial arthropods, discussion paper for the OECD Test Guidelines Programme, VU, november.

Thomas, J.M. en J.F. Cline, 1985.
Modification of the Neubauer technique to assess toxicity of hazardous chemicals in soils, *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, p. 201-207.

Thomas, J.M., J.R. Skalski, J.F. Cline, M.C. McShane, J.C. Simpson, W.E. Miller, S.A. Peterson, C.A. Callahan en J.C. Geene, 1986.
Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays, *Environ. Toxicol. Chem.*, 5, p. 487-501.

Toussaint, M.W., T.R. Shedd, W.H. van der Schalie en G.R. Leather, 1995.
A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (5), p. 907-915.

U.S. EPA, 1982.
Environmental effects test guidelines, EPA 560/6-82/002, Washington DC.

U.S. EPA, 1989.
Ecological assessment of hazardous waste sites, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Oreg., EPA 600/3-89/013.

Vlaar, L.N.C., 1994.
Milieuchemische aspecten bij poriewater bereiding en de invloed hiervan op metaal-toxiciteit in toxiciteitstesten, concept Rijkswaterstaat- en RIZA-rapport.

Warren-Hicks, H., B.R. Parkhurst en S.S. Baker, 1989.
Ecological assesment of harzadous waste sties: a field and laboratory reference, U.S.
Environmental Protection Agency, EPA/600/389/013.

Wenzel, A., 1997.
Kurzzeit-Biotests zur Bodembeurteilung, Fruanhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie,
Abt. Biochemische Ökotoxikologie, Bergholz Rehbrücke, D. Presentatie Zweite deutschsprachige
SETAC Tagung, 24-25 februari, Aachen.

Williams P.L. en D.B. Dusenbery, 1990.
Aquatic toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Environmental Toxicology and
Chemistry*, 9, p. 1285-1290.

Witteveen en Bos, 1997.
Bodemkwaliteitsparameters - stimulering gebruik ecotesten; concept 02, in opdracht van
Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (PGBO), Witteveen en Bos Raadgevende Ingenieurs
(Deventer), Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, Wageningen.