

NOBIS 96-3-03  
RISICO-INSCHATTING VAN PAK-GRONDEN  
MET BEHULP VAN NEMATODEN

dr.ir. P. Doelman (IWACO B.V.)  
dr.ir. A.M.T. Bongers (Wageningen Universiteit, vakgroep Nematologie)  
drs. A.F. Peekel (IWACO B.V.)

januari 2000

Gouda, CUR/NOBIS

### **Auteursrechten**

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze opgave 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 enige 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, "©"Risico-inschatting van PAK-gronden met behulp van nematoden", januari 2000, 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, unless the source of the quotation, and, insofar as this has been published, the name of the author, are clearly mentioned, "©"Risk assessment of PAH soils using nematodes", January 2000, CUR/NOBIS, Gouda, The Netherlands."

### **Liability**

CUR/NOBIS and all contributors to this publication have taken every possible care by 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 insofar as this damage is a result of intentional fault or gross negligence of CUR/NOBIS and/or the contributors.

**Titel rapport**

Risico-inschatting van PAK-gronden met  
behulp van nematoden

**CUR/NOBIS rapportnummer**

96-3-03

**Project rapportnummer**

96-3-03

---

**Auteur(s)**

dr.ir. P. Doelman  
dr.ir. A.M.T. Bongers  
drs. A.F. Peekel

**Aantal bladzijden**

**Rapport:** 40  
**Bijlagen:** 30

---

**Uitvoerende organisatie(s) (Consortium)**

Stichting Bodemsanering NS (ir. G.N.M. Stokman, 030-2988310)  
RIZA (dr. C. van der Guchte, 0320-298411)  
Provincie Utrecht (ir. P.W.M. van Mullekom, 030-2583115)  
Bedrijfslaboratorium voor Grond en Gewasanalyse (ir. H. Keidel, 026-3346346)  
IWACO B.V. (ir. C.M. Breukink, 010-2865510)  
Wageningen Universiteit, vakgroep Nematologie (dr.ir. A.M.T. Bongers, 0317-482197)

---

**Uitgever**

CUR/NOBIS, Gouda

---

**Samenvatting**

Van 116 PAK-verontreinigde gronden is een biologische risico-inschatting gedaan door in die gronden de samenstelling van nematoden, kleine wormpjes van circa 1,0 mm lang, te analyseren. Over het voorkomen, het aantal, de verscheidenheid, de levensstrategie en de gevoeligheid voor verontreiniging en verstoring is van nematoden betrekkelijk veel bekend, met name in vergelijking met andere representanten van de bodemfauna. Ze leven in het bodemvocht en zijn daarom goede bio-indicatoren voor de beschikbare fracties van verontreinigingen.

Het tellen en determineren van nematoden in een grond kost ongeveer vierhonderd gulden en dan kan de nematodenfauna volgens 13 karakteristieken worden benoemd: aantal (1), taxonomische groepen (2), CP-1 % (3), CP-2 % (4), CP-3 % (5), CP-4 % (6), CP-5 % (7), MI(1-5) (8), MI(2-5) (9), bacterie-eters % (10), schimmeleeters % (11), omnivoren % (12) en carnivoren (13). De diverse ratio's van deze karakteristieken geven extra informatie over het nematodenbestand. Om de PAK-gronden met referenties te vergelijken zijn ook van 76 referentiegronden de data doorberekend en zijn ook deze 13 karakteristieken bepaald.

De PAK's in de bestudeerde gronden blijken niet uitloogbaar en niet biobeschikbaar, waardoor ze nauwelijks een risicofactor in de grond zijn voor het functioneren van het bodemecosysteem.

Door dit onderzoek worden er voorstellen gedaan hoe nematoden kunnen dienen als een beleidsinstrument voor bodemkwaliteit.

---

**Trefwoorden****Gecontroleerde termen:**

bodemverontreiniging, nematoden, PAK,  
risico-inschatting

**Vrije trefwoorden:**

---

**Titel project**

Risico-inschatting van PAK-gronden met  
behulp van nematoden

**Projectleiding**

IWACO B.V.  
(dr.ir. P. Doelman, 010-2865587)

---

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

**Report title**  
Risk assessment of PAH soils using nematodes

**CUR/NOBIS report number**  
96-3-03

**Project report number**  
96-3-03

---

**Author(s)**  
dr.ir. P. Doelman  
dr.ir. A.M.T. Bongers  
drs. A.F. Peekel

**Number of pages**  
**Report:** 40  
**Appendices:** 30

---

**Executive organisation(s) (Consortium)**

Stichting Bodemsanering NS (ir. G.N.M. Stokman, 030-2988310)  
RIZA (dr. C. van der Guchte, 0320-298411)  
Provincie Utrecht (ir. P.W.M. van Mullekom, 030-2583115)  
Bedrijfslaboratorium voor Grond en Gewasanalyse (ir. H. Keidel, 026-3346346)  
IWACO B.V. (ir. C.M. Breukink, 010-2865510)  
Wageningen Universiteit, vakgroep Nematologie (dr.ir. A.M.T. Bongers, 0317-482197)

---

**Publisher**  
CUR/NOBIS, Gouda

---

**Abstract**

Of 116 PAH-contaminated soils a biological risk assessment has been made based on the number and diversity of the nematode soil fauna. Nematodes are small (ca. 1.0 mm length) round worms with known identification, taxonomic diversity, life strategy, and sensitivity for contamination and disturbance. Since they function in the soil capillary water, they are good bio-indicators for the availability of contaminants.

The prize for counting and determination of nematodes in a soil sample is 400 Dutch guilders, providing a dataset of 13 characteristics: number (1), taxonomic diversity (2), CP-1 % (3), CP-2 % (4), CP-3 % (5), CP-4 % (6), CP-5 % (7), MI(1-5) (8), MI(2-5) (9), bacteria feeders (10), fungi feeders (11), omnivores (12) and carnivores (13). To compare the PAH soils with reference soils also from 76 reference soils those 13 characteristics have been determined.

The PAH in the investigated soils were not extractable and were not bio-available, so the PAH in those soils can hardly be considered as a factor of ecological risk.

Due to this research it was suggested how nematodes could be used as policy instrument to judge soil quality.

---

**Keywords**

**Controlled terms:**

nematodes, PAH, risk assessment,  
soil contamination

**Uncontrolled terms:**

---

**Project title**

Risk assessment of PAH soils using nematodes

**Projectmanagement**

IWACO B.V.  
(dr.ir. P. Doelman, 010-2865587)

---

This report can be obtained by: CUR/NOBIS, PO Box 420, 2800 AK Gouda, The Netherlands  
Dutch Research Programme In-Situ Bioremediation (NOBIS)

## VOORWOORD

Dit rapport heeft nogal wat stof doen opwaaien. Stofwolk 1: in het begin was er enthousiasme alom, want aan de hand van nematoden (millimeter-kleine wormpjes) zou het ecologisch risico van PAK's in grond eenvoudig kunnen worden aangegeven. Stofwolk 2: het was niet eenvoudig om aan PAK-gronden te komen; eindelijk lukte dat. Stofwolk 3: nu zijn er wel PAK-gronden, maar weet je zeker dat je het goed gedaan hebt; waar zijn de referentiegronden? Stofwolk 4: via het RIVM gaan we referentiegronden analyseren, maar zijn dat wel goede referentiegronden? Stofwolk 5: het rapport moet zo geschreven worden dat de expert (de nematoloog) het bodem-ecologisch verantwoord vindt en dat de lezende beleidsmedewerker het idee krijgt dat hiermee echt een grote stap gezet is naar een verantwoorde risicobeoordeling van grond.

Hoewel alle stof nog niet is neergedwarreld, is het wel duidelijk dat beleid en wetenschap veel meer belangstelling voor nematoden hebben dan drie jaar geleden toen het project geformuleerd werd.

januari 2000

## INHOUD

		SAMENVATTING	vi
		SUMMARY	x
Hoofdstuk	1	INLEIDING	1
Hoofdstuk	2	RISICO-INSCHATTING VAN VERONTREINIGDE GROND	3
	2.1	Ecotoxicologische risico-inschatting met betrekking tot dosiseffectgegevens	3
	2.2	Effectgerichte inschatting	5
	2.3	Nematoden als biomonitorsysteem	5
	2.4	Nematoden-dataset	8
Hoofdstuk	3	MATERIAAL EN METHODEN	11
	3.1	Oriëntatie	11
	3.2	Karakterisatie en selectie	12
	3.3	Collectie	13
	3.4	Analyses	13
	3.4.1	Chemisch/fysisch	13
	3.4.2	Nematodenanalyses	14
	3.5	Referentiebestanden van het RIVM	14
Hoofdstuk	4	RESULTATEN EN DISCUSSIE	15
	4.1	Beeld van de PAK-gronden en de algemene trends	15
	4.2	Analyse van de gronden met PAK en zware metalen	18
	4.2.1	Analyse via CCA	18
	4.2.2	Resultaten en korte bespreking	18
	4.3	Samenstelling van PAK in gronden	21
	4.4	Analyse van extra PAK-gronden met extra bioassays	21
	4.5	Referentiewaarden	24
Hoofdstuk	5	EVALUATIE	27
	5.1	Geselecteerde gronden	27
	5.2	Analyses	27
	5.3	Invloed van PAK en onderscheid tussen PAK en zware metalen	29
	5.4	Referentiegronden	31
	5.5	Beschrijving van een generieke methodiek	32
	5.6	Hoe mogelijk verder	34
	5.7	En hoe verder met de fundamentele aspecten	35
		LITERATUUR	37
Bijlage	A	SAMENVATTINGSTABEL VAN ANALYSES VAN PAK-GRONDEN	
Bijlage	B	NEMATODENTELLINGEN	
Bijlage	C	RESULTATEN VAN EXTRA ANALYSE	
Bijlage	D	VERHOUDING VAN INDIVIDUELE PAK'S	

Bijlage E BASISGEGEVENS VAN GRASLAND OP VEEN

Bijlage F BASISGEGEVENS VAN GRASLAND OP KLEI

## SAMENVATTING

### Risico-inschatting van PAK-gronden met behulp van nematoden

De risico-inschatting van PAK-gronden met behulp van nematoden is verricht aan 116 PAK-gronden en 76 referentiegronden. Het uitgangspunt was dat aan de hand van de samenstelling van de nematodenlevensgemeenschap in die PAK-gronden een uitspraak zou kunnen worden gedaan over de bodemkwaliteit in het algemeen.

Het doel van het onderzoek is als volgt geformuleerd:

*Het bepalen van de relatie tussen de Maturity Index van nematoden en de PAK-concentratie, waarbij onderscheid wordt gemaakt naar de concentratie van zware metalen, de herkomst en het gebruik van grond, de fysisch/chemische karakterisatie van de gronden, de begroeiing op de grond en de 'vorm' waarin PAK in deze grond voorkomt. Het project moet resulteren in een generiek toepasbare methodiek waarmee, op basis van de aangetoonde relatie en de reeds beschikbare kennis over referentiebodems, de effecten van verontreinigingen met PAK en zware metalen kunnen worden beschreven.*

Nematoden zijn gekozen, omdat daar in relatie tot andere representanten van de bodemfauna betrekkelijk veel van bekend is. Op aarde zijn 80 % van alle meercellige beesten nematoden. Het zijn kleine wormpjes (0,3 - 5 mm in lengte) die in elk bodemsysteem kunnen leven als er water, zuurstof en organisch materiaal is. Bodemnematoden functioneren in de waterfase van grond en spelen een grote centrale rol in bodemvoedselwebben. Over de gehele wereld zijn reeds meer dan 15.000 soorten beschreven. Een kilo grond kan wel 30.000 nematoden bevatten verdeeld over 30 tot 50 taxa. Die groepen verschillen in levensstrategie en in de wijze waarop ze zich voeden. In de periode 1930 - 1980 waren vooral de plantenparasitaire nematoden of aaltjes bekend, zoals 'the golden nematode', de veroorzaker van 'aardappelmoeheid'. Nu zijn ook bacterieeters, schimmeleeters, omnivoren en carnivoren bekend. Nematoden zijn in voedingsgroepen in te delen en in levensstrategiegroepen: de CP-groepen. Er zijn Colonizers (opportunisten; CP-1 en CP-2 groepen, die nogal ongevoelig zijn voor stress) en Persisters (CP-3, CP-4 en CP-5 groepen, die gevoelig zijn voor stress). De 'colonizers' of 'enrichment'-volgers (CP-1) zijn te omschrijven als snelle rakkers die het goed doen bij allerlei vormen van verstoringen. De 'persisters' (CP-5) zijn te omschrijven als rustige, sobere beesten, die gevoelig zijn voor verstoringen. Via de omvang van de CP-groepen wordt de Maturity Index (MI) berekend. Een verdeling van de nematodenpopulatie over deze vijf groepen leidt tot de Maturity Index:

$$MI = \sum_{i=1}^n v(i) \cdot f(i)$$

waarin:

$v(i)$  is de CP-waarde van familie  $i$ ;

$f(i)$  is de frequentie van deze familie in een monster.

De analyse van het nematodenbestand moet plaatsvinden volgens figuur I.



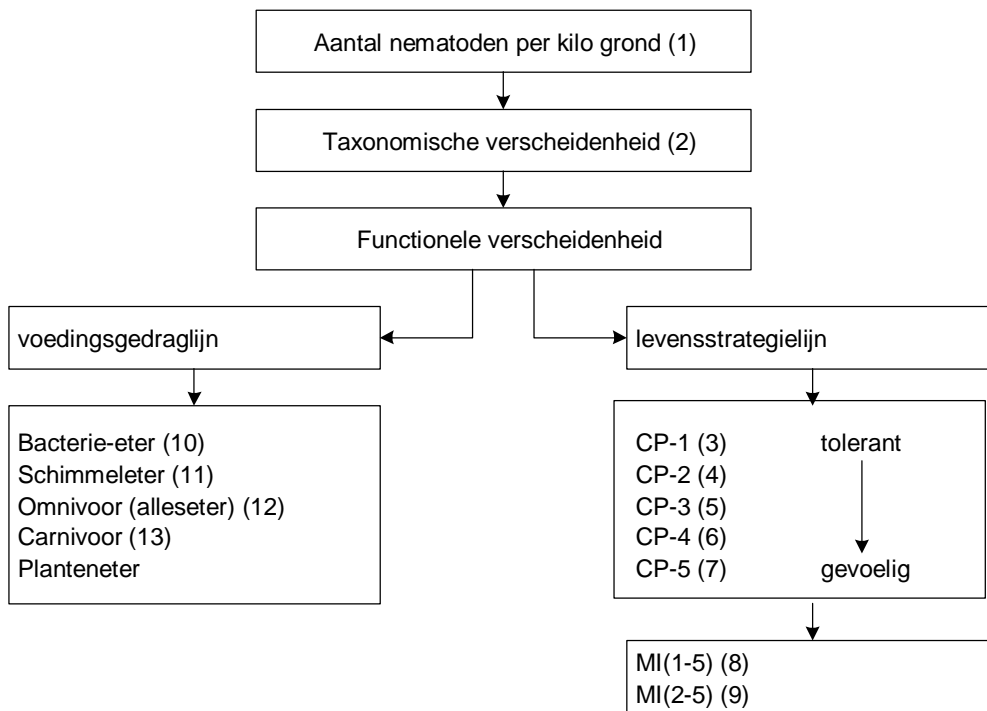


Fig. I. Analyseschema van nematoden, opgesplitst in 13 karakteristieken.

De diverse ratio's van deze 13 karakteristieken verschaffen extra informatie over het wel en wee van de nematodenpopulatie zoals bijvoorbeeld (10)/(1), het aantal bacterie-eters op het totale aantal nematoden.

De geselecteerde PAK-gronden zijn voornamelijk afkomstig uit de provincie Utrecht. Het feit dus dat vooral Utrechtse gronden verzameld zijn, duidt niet op een grotere PAK-problematiek daar, maar op betere contacten daar met probleembezitters. De referentiegronden van het Landelijk Meetnet zijn niet verzameld, maar daarvan mochten de nematodenanalyses worden gebruikt.

De relatie PAK-concentratie/MI(2-5) voor 96 PAK-gronden is weergegeven in figuur II. Er kan worden geconcludeerd dat er geen trendmatige correlatie is.

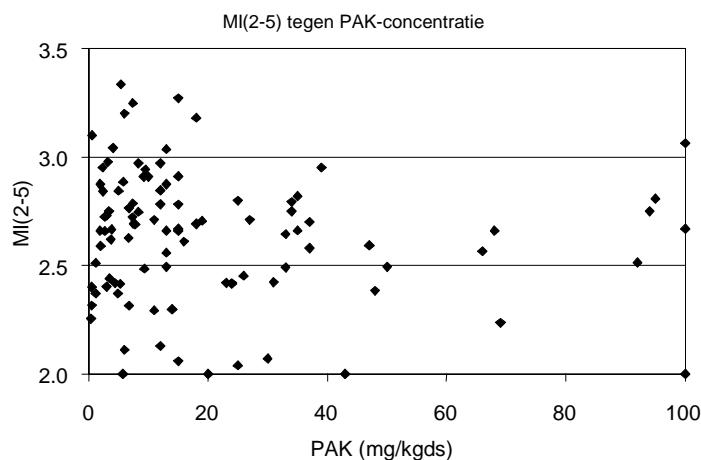


Fig. II. MI(2-5)-waarden in relatie tot de PAK-concentratie in de gronden.

Van 28 geselecteerde gronden is geanalyseerd wat de rol van zware metalen naast de rol van PAK is voor het nematodenbestand. De negatieve invloed van PAK en zware metalen op de nematodensamenstelling is zeer klein. Een negatieve invloed zou, op basis van canonische correspondentie-analyse, voor iets meer dan vijf procent kunnen worden toegeschreven aan zware metalen en voor iets minder dan vijf procent aan PAK.

Van 21 gronden is naar de beschikbare fractie van PAK gekeken in relatie tot de totale concentratie met behulp van een specifieke bioassay, de VITO-tox-proef en via uitloogexperimenten. Zowel de remmingsanalyses als de beschikbaarheidsmetingen duiden op het nauwelijks beschikbaar zijn van de PAK in de geanalyseerde gronden.

Gronden, waarin de PAK-concentratie laag was (lager dan circa 10 mg PAK/kg grond), zijn bij de formulering van het project als referentiegronden gedefinieerd. Daar er nauwelijks sprake was van een PAK-effect is besloten op zoek te gaan naar echte referentiegronden om van hen de Maturity Index te bepalen. Via het RIVM zijn bestanden van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit ter beschikking gesteld. Daar van een deel van het bestand de MI niet kon worden bepaald, zijn de gronden onderling vergeleken op basis van de hoeveelheid taxonomische groepen. De frequentieverdeling van de taxonomische groepen van de PAK-gronden en van de referentiegronden is weergegeven in figuur III.

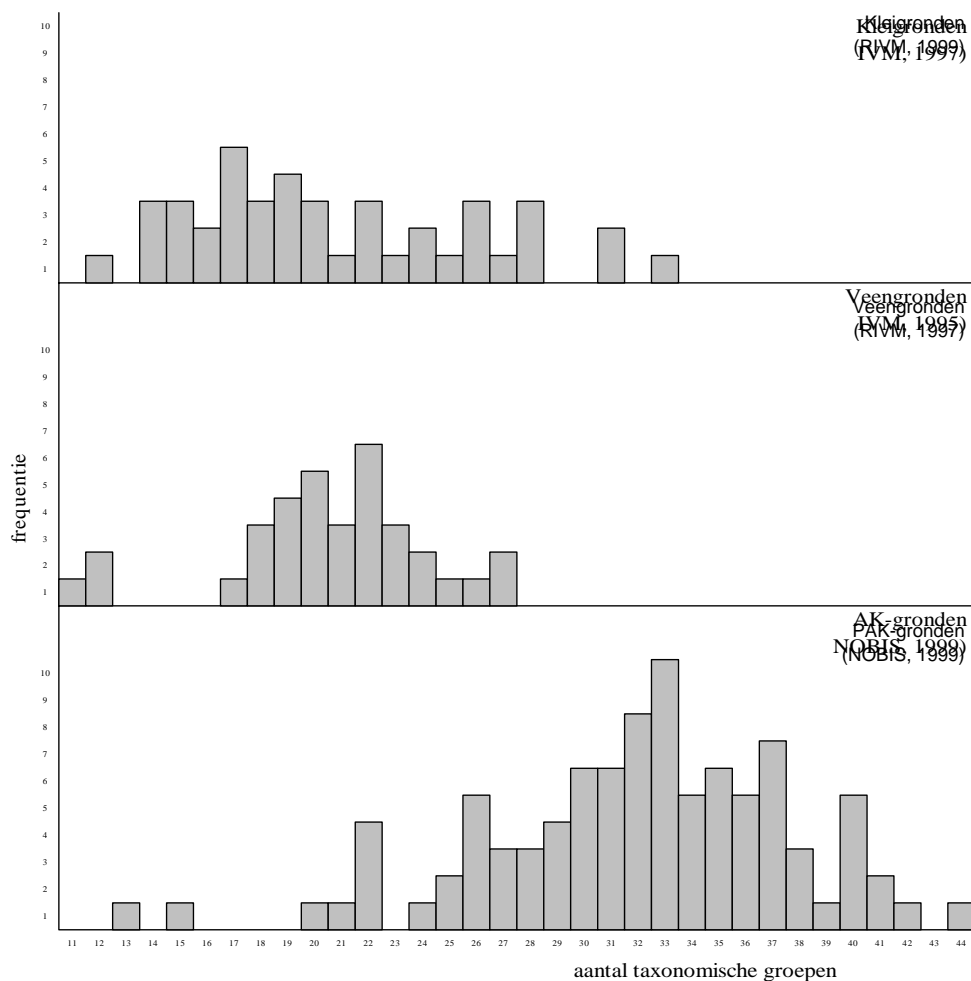


Fig. III. De frequentie van het aantal taxonomische groepen van de PAK-gronden en de referentieveen- en referentiekleigronden.

Duidelijk is dat de verscheidenheid in de PAK-gronden hoger is (gemiddeld 30 taxonomische groepen per grond) dan in de referentiegronden (gemiddeld 20 taxons per grond). Dit werd niet verwacht. Bij de keuze van de referentiegronden is bewust gekozen voor iets 'zwaardere' gronden, omdat de verwachting was dat kleigronden en veengronden in potentie een hogere diversiteit hebben dan zandige of zavelige gronden. De oorzaak van deze lage diversiteit zou bemesting kunnen zijn, daar de gronden vooral uit gebieden met intensieve melkveehouderij komen.

Om tot een generieke methodiek, als beleidsinstrument, te komen moet allereerst worden geaccepteerd dat nematoden de juiste biomonitors zijn van het bodemmilieu. Zowel het opsplitsen van het nematodenbestand in 13 karakteristieken plus ratiomogelijkheden, als hun in andere onderzoeken aangetoonde gevoeligheid voor zware metalen, minerale olie en bijvoorbeeld verzuring maakt hen tot een goede bio-indicator van de bodemkwaliteit.

Het in 116 PAK-gronden niet kunnen bepalen van een causaal verband tussen PAK-concentratie en nematodencriteria wordt met de hoogst mogelijke waarschijnlijkheid bepaald door het niet-beschikbaar zijn van PAK vanwege grondgebonden en onoplosbaar zijn. Qua gevoeligheid zijn nematoden net zo gevoelig voor PAK als gangbare toetsorganismen, zoals algen en waterlooien, zoals is gebleken uit literatuurgegevens en eigen acuut toxiciteitsonderzoek.

Bij het formuleren van het plan om de bodemkwaliteit te definiëren is vooral aan de Maturity Index gedacht. Na het analyseren van circa 190 gronden is de mening dat ook het totale aantal nematoden, de taxonomische verscheidenheid en de indeling naar de CP-waarden en de trofische groepen betrokken moeten worden, de 13 karakteristieken. Deze kunnen worden 'gedestilleerd' uit de nematodentelling en -classificatie van 'Oosterbeek' (1990) die slechts circa f 400,- kost. Na het herindelen volgens de 13 karakteristieken, zoals is weergegeven in figuur I, en mogelijk relevante ratio's, kan 'de specialist' een uitspraak doen over de Biologische Bodemkwaliteit.

Op basis van de analyse van bijna tweehonderd gronden wordt voorgesteld voor dat de voorlopige hoeksteen voor het instrument Bodemkwaliteit het aantal nematoden per kilo grond (**Z**), gecombineerd met het aantal taxonomische groepen (**Y**), gecombineerd met de verdeling van de taxonomische groepen over de CP-groepen, resulterend in MI-waarden (**X1** en **X2**). Om de discussie aan te vangen, wordt voorgesteld: **5.000 voor Z, 18 voor Y en 2,3 voor X2**. In concreto betekent dit dat een grond deugt als zij 5.000 nematoden per kilo bevat, bestaande uit minimaal 18 taxonomische groepen, leidend tot een Maturity Index (2-5) van 2,3 of meer. Dus als aan deze minimale eis (5.000/18;2,3) niet is voldaan, is er kwalitatief iets mis in die bodem en is nader onderzoek nodig. Eén en ander is in beeld te brengen via een CP-vijfhoek (fingerprinting via de 'amoëbe'-benadering).

Dit generieke instrument (Z/Y;X2) kan genuanceerd en getoetst worden. De nuances liggen enerzijds in correctiefactoren vanwege grondsoort en vegetatie. Anderzijds kan de matrix levensstrategie/trofische groepen extra kwaliteitsinformatie leveren.

Toetsing zou kunnen plaatsvinden binnen de Triade-gedachte door bijvoorbeeld het poriewater van de geanalyseerde gronden te analyseren (op verdachte verontreinigingen) of te gebruiken als toetsmedium.

## SUMMARY

### Risk assessment of PAH soils using nematodes

Risk assessment of polyaromatic hydrocarbons (PAH) contaminated soils with nematodes has been carried out for 116 PAH soils and 76 reference soils. The initial starting-point was that the structure of nematode population of the PAH-contaminated soils would reveal the general soil quality.

The aim of the research project was defined as follows:

*The determination of the relation between the Maturity Index of nematodes and the PAH concentration, whereas the heavy metal concentration, the origin and use of the soils, the physico-chemical characteristics of the soils, the vegetation and the PAH speciation can be discriminated. The result of the project must be a general applicable method to describe the effects of PAH and heavy metals, based on proven relations.*

Nematodes were selected due to relatively broad knowledge on this representative group of the soil biology. On earth 80 % of all animals are nematodes. These small roundworms (mm in length) live in every soil system containing water, oxygen and organic matter. They function in the waterphase and play a central role in terrestrial food webs. All over the world 15,000 species have been described. A general soil contains on the average 30,000 nematodes, divided in at least 30 - 50 taxa. Those taxa may differ in life strategy and in feeding behaviour. In the agricultural world, due to monocultures of crops, the plantparasitic nematodes have obtained strong attentions, such as the 'golden nematode', the reason for potato-crop-rotation. The non-parasitic nematodes consist of bacteria feeders, fungi feeders, omnivores and carnivores. Moreover they can be divided in life strategy groups: colonizers (C) and persisters (P). They are divided in five CP groups. CP-1 and CP-2 nematodes are generally rather insensitive for stress. The CP-3, CP-4 and CP-5 nematodes are generally sensitive for stress and contaminants. By determination of the CP groups a kind of diversity index, the Maturity Index, can be calculated:

$$MI = \sum_{i=1}^n v(i) \cdot f(i)$$

in which:

$v(i)$  is the CP value of the taxon;  
 $f(i)$  is the frequency of this taxon in a soil sample.

The analysis of the nematode structure may take place along the schedule as presented in figure I.

The selected PAH soils were mainly derived from the Province Utrecht. This is due to good personal contacts in that area and not due an extensive PAH problem. The reference soils came from an already existing monitoring project.

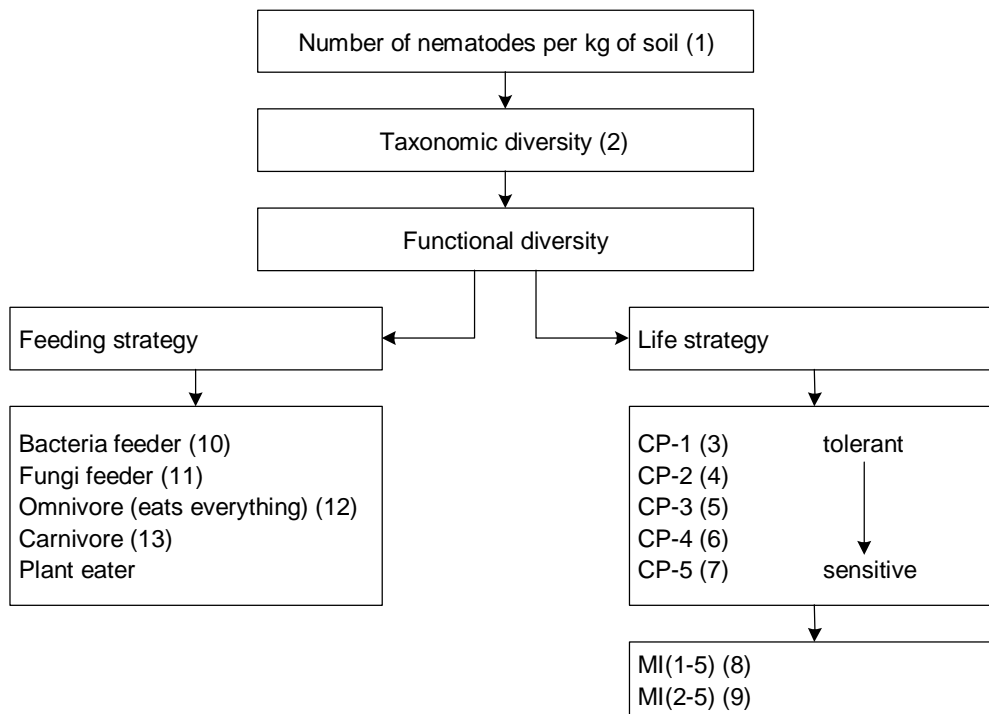


Fig. I. The nematode structure divided in 13 characteristics.

The relation of PAH concentrations in 96 soils and their nematode diversity, expressed as MI(2-5) has been presented in figure II. It has been concluded that no correlation exists.

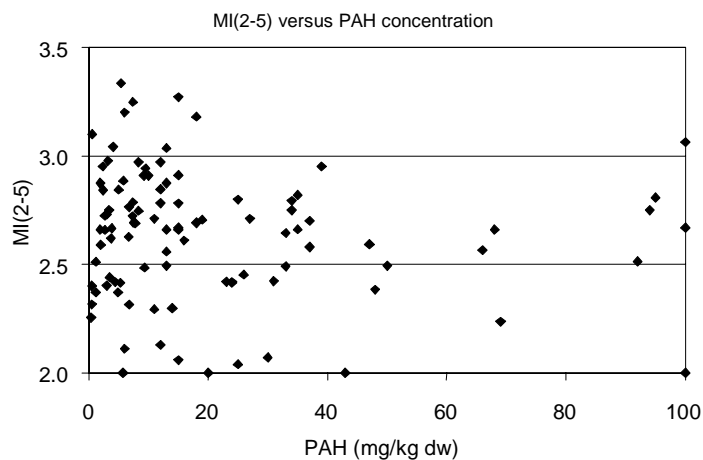


Fig. II. The MI(2-5) value in relation to the PAH concentration.

From 28 of those 96 soils also the influence of heavy metals has been analysed. With Canonical Correspondence Analysis (CCA) the negative effect of both PAH and heavy metals was extremely small (less than 5 %). From 21 of the PAHsoils the available fraction has been determined in two different ways. With a specific bioassay (the VITO-tox test) no available fraction could be determined. With a forced extraction test (70 % acetic acid) a maximum of only 5 % of the total PAH concentration of the soil became available. So it was concluded that in the PAH soils investigated PAH was not available and therefore didn't cause risk to nematodes. Literature research and separate experiments showed that the sensitivity of nematodes for available PAHs was of the same order as algae and waterfleas.

Special obtained reference soils (peat soils with grass and clay soils with grass) and the PAH soils were analysed on the frequency of the number of the taxa. In figure III the frequency distribution is shown. The diversity (average number of taxa) in the PAH soils is higher than in the 'reference soils'. Since these reference soils came from areas with intensive dairy the manure must have positively affected the CP-1 and CP-2 nematodes and therefore these soils are no good references.

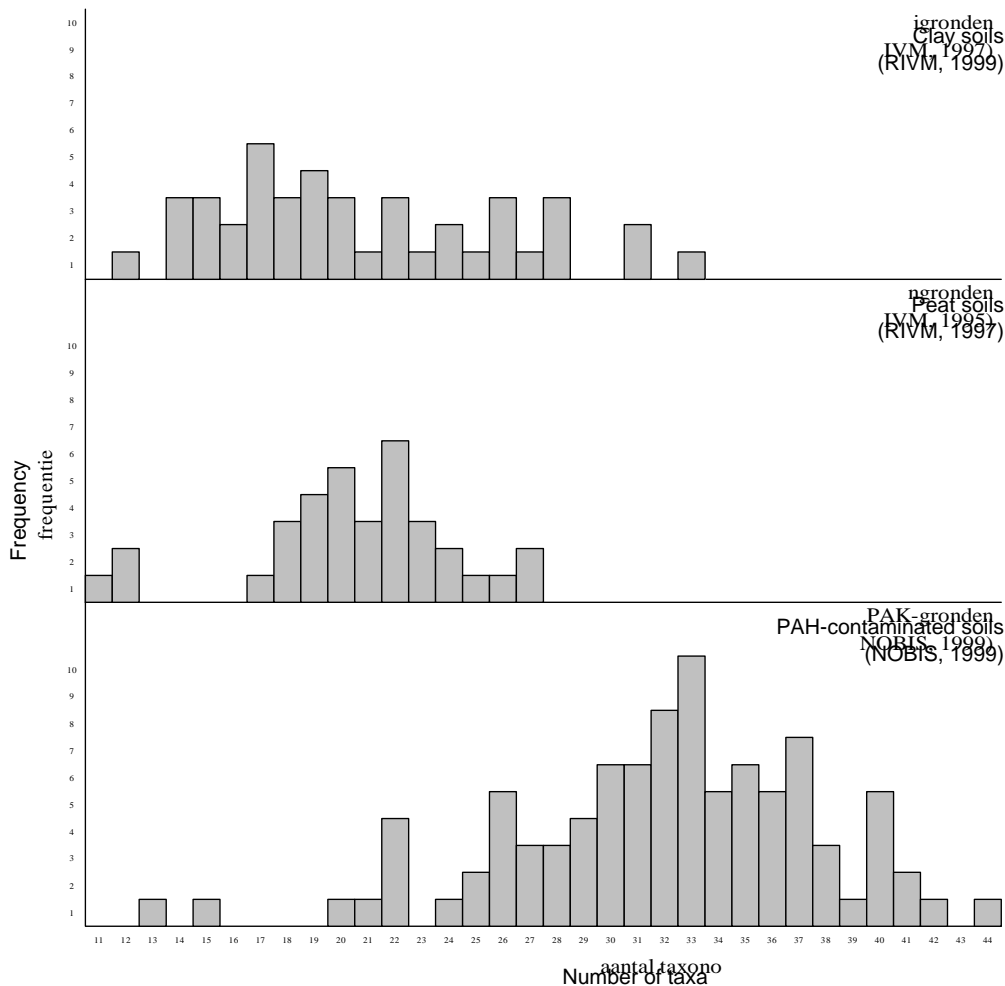


Fig. III. The frequency of the number of taxa of the PAH-contaminated soils and the reference peat and clay soils.

In order to come to a general accepted method for risk assessment of contaminated soils, nematodes have to be accepted as the correct biomonitoring tools of a soil ecosystem. Dividing the nematode structure in 13 characteristics, as mentioned in figure I, is the key to this method. Doses-response investigations on heavy metals and on mineral hydrocarbons have shown the usefulness of this approach. Since the technical nematode classification of a soil sample costs 400 Dutch guilders and can be done within a few days from sampling this approach is cheap and fast.

To challenge scientists and policy executors and to contribute to the discussion of a general method we postulate that the cornerstones of a soil quality tool is i) the total number of nematodes (Z), combined with ii) the number of taxa (Y), combined with iii) its distribution in CP groups (MI(1-5) and MI(2-5)).

To sharpen this the border of soil quality is defined as 5000 for Z, 18 for Y and 2,3 for MI(2-5). Below these values extra investigation has to be carried out to determine the cause of the poor nematode structure. Also fingerprinting in an 'amoeba' or five-quint, or combining the feeding groups and the life strategy groups may reveal hidden factors of the low soil quality.

## HOOFDSTUK 1

### INLEIDING

'Nematoden' staan centraal in het hier beschreven NOBIS-project. Het bijzondere van nematoden is dat het verreweg de meest voorkomende meercellige beesten zijn op aarde [Gould, 1991]. Tachtig procent van de levende beesten zijn nematoden: het zijn zeer kleine draadwormpjes met een lengte van gemiddeld 1,0 mm. In een kilo grond zijn gemiddeld 30.000 nematoden aanwezig.

De basishypothese van dit NOBIS-project is dat het giftige effect van een vervuiling in de grond 'zichtbaar' te maken moet zijn aan de hand van de nematodensamenstelling in die grond.

Het onderzoek, project 96-3-03, heet 'Haalbaarheidsproject risico-inschatting van PAK-gronden met behulp van nematoden'. Het doel van het onderzoek was door middel van de nematodenanalyse van PAK-gronden te onderbouwen dat nematoden de gezondheid van het bodemmilieu weerspiegelen. Voor gronden verontreinigd met zware metalen [Korthals, 1997] of met ruwe olie [NOVEM, 1998] was reeds aannemelijk gemaakt dat nematoden als bio-indicator van verontreinigde gronden zouden kunnen dienen. Verondersteld werd, door de indieners en uitvoerders van dit project, dat er aan het beleid een nogal simpel te hanteren instrument, een generieke methode ofwel biologische meetlat, zou kunnen worden geleverd, waarmee die bodemkwaliteit zou kunnen worden afgelezen. Door de metingen van de nematodenpopulaties van verontreinigde gronden te toetsen aan referentiegronden zou dit kunnen worden verwezenlijkt.

Aan de hand van het bepalen en analyseren van de nematoden van gronden verontreinigd met polycyclische aromaten (PAK) en het analyseren van nematoden van gronden uit het Meetnet Bodemkwaliteit is getracht het doel te bereiken. De resultaten worden hier gepresenteerd nadat 116 PAK-gronden geanalyseerd zijn op hun fysisch/chemische eigenschappen, de mate van verontreiniging en op de nematodensamenstelling en nadat deze resultaten zijn vergeleken met het nematodenbestand in 76 referentiegraslanden van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit. De databestanden zijn door drs. A. Schouten van het RIVM beschikbaar gesteld en zijn door IWACO opnieuw doorgerekend en nader geanalyseerd.

In hoofdstuk 2 wordt uitgelegd waarom en hoe nematoden kunnen worden gebruikt bij het bepalen van de bodemkwaliteit en welke voordelen dit levert ten opzichte van de klassieke beoordeling van bodemverontreiniging, het klassieke omgaan met verontreinigde grond. In hoofdstuk 3 worden het materiaal en de methoden beschreven. In hoofdstuk 4 worden de resultaten gepresenteerd en bediscussieerd. Er wordt onder andere aangegeven op welke manieren er geanalyseerd is. Hoofdstuk 5 bevat een evaluatie.

#### *Consortiumleden*

Dit haalbaarheidsonderzoek werd geïnitieerd door IWACO B.V. (dr.ir. P. Doelman en ir. C.M. Breukink) als adviesbureau en de WU-Nematologie (dr.ir. A.M.T. Bongers) als kennisinstituut, ondersteund door het Bedrijfslaboratorium voor Grond en Gewasanalyse te Oosterbeek (ir. H. Keidel). Als eindgebruiker namen het RIZA (dr. C. van der Guchte), de provincie Utrecht (ir. P.W.M. van Mullekom) en de SBNS (ir. G.N.M. Stokman) plaats in het consortium. Hanze Milieu (ir. J.A.N.M. Heersche) ondersteunde het idee en leverde positief commentaar.





## HOOFDSTUK 2

### RISICO-INSCHATTING VAN VERONTREINIGDE GROND

De multifunctionele benadering van bodemsanering, met gebruikmaking van interventiewaarden en streefwaarden, heeft plaats gemaakt voor de functionele benadering, waarbij gelet wordt op risico. Daarbij is voor de bodem onderscheid gemaakt in de 'contact'laag en de onderlaag. Centraal staat de beheersing van risico in relatie tot de gezondheid van mens en milieu. Voor de onderlaag, of ondergrond, betreft het vooral verspreidingsrisico, dat berekend wordt op basis van de 'natural attenuation' van de ondergrond.

'Natural Attenuation' ('NA') wordt gedefinieerd als 'de biodegradatie, de diffusie, de verdunning, de binding, de verdamping en/of de chemische of biochemische stabilisatie van verontreinigingen om de beweeglijkheid, de giftigheid en de hoeveelheid van de verontreiniging te reduceren tot niveaus waardoor de gezondheid van mens en milieu worden beschermd' [EPA, 1994].

Persistente verontreinigingen in de bovengrond, of contactlaag, zouden ook volgens het 'natural attenuation' principe kunnen worden beoordeeld, zowel in relatie tot de mens als het milieu: de ecologie. Het milieu van de bodem als contactlaag op bijvoorbeeld een diepte van circa 5 - 50 cm is, zowel biotisch als abiotisch, anders dan de bodem als onderlaag op bijvoorbeeld een diepte van 10 - 20 m. Over de ecologie van zowel natuurlijke als van landbouwsystemen van de bovenste 50 cm grond is kennis. Over de diepte van 10 - 20 m ontbreekt de kennis echter.

Het inschatten van de invloed van chemische stoffen in de bodem, op welke diepte dan ook, is zeer complex en moeilijk omdat men enerzijds het functioneren van bodemecosystemen niet kent en anderzijds omdat de invloed van de verontreiniging niet bekend is. In Europa zijn 100.000 chemische producten bekend en van slechts 7.000 is kennis beschikbaar over hun giftigheid [CEC, 1992; EPA, 1996]. Als specifieke kennis over de toxiciteit ontbreekt, moet die worden ingeschat. Dit kan onder meer via het vergelijken van de te beoordelen mogelijk toxische verbinding met uiterlijk gelijkende structuren van verbindingen waarvan wel toxiciteitsgegevens bekend zijn, de QSAR-methode, of via het uitvoeren van toxiciteitsexperimenten met de te beoordelen verbindingen.

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op de erkende inschatting via dosiseffectgegevens uit de literatuur (zie 2.1), de effectgerichte inschatting (zie 2.2) en de nematoden als potentiële biomonitor (zie 2.3).

#### 2.1 Ecotoxicologische risico-inschatting met betrekking tot dosiseffectgegevens

Het definiëren van de 'gezonde toestand' van een terrestrisch ecosysteem is nog moeilijker dan het definiëren van een goed niveau van de gezondheid van de mens [Gezondheidsraad, 1996].

De ecologische risicobeoordeling is het meest uitgewerkt voor stoffen als zware metalen en bestrijdingsmiddelen. Daarbij is de aanname gedaan dat bij de bescherming van de soortensamenstelling in kwantitatieve zin eveneens de structuur en de functie van ecosystemen gewaarborgd zijn. Om de gezondheidstoestand van een bodem te kunnen beoordelen in relatie tot aanwezige mogelijke toxische stoffen, zijn verschillende methoden voorhanden. Een traditionele methode is dat de concentraties van stoffen in de bodem worden gemeten, al dan niet gecorrigeerd voor pH of andere factoren die de beschikbaarheid beïnvloeden, en dat vervolgens wordt nagegaan of deze concentraties de 'normen' overschrijden.

De normen in de huidige risicobeschouwing van oppervlakkige grond, ofwel de 'contactlaag', met verontreinigingen, zoals zware metalen, pesticiden, ruwe olie of polycyclische aromaten, zijn veelal gebaseerd op dosiseffect (DE) data of effectieve concentratie (EC) data [Van Leeuwen, 1990]. Op dit moment worden vooral waarden die 5 % en 50 % schade veroorzaken (HC-5- en HC-50-waarden) bij bodembologisch representanten als regenwormen [Van Gestel en Ma, 1988] of springstaarten of pissebedden [Van Straalen en Denneman, 1989] gebruikt om de grenzen van het risico aan te geven [Alderberg en Slob, 1993]. Afhankelijk van het aantal soorten dat is getoetst, is een extrapolatiefactor toegepast, een soort veiligheidsfactor. Bij onvoldoende gegevens kan die factor 10 of 100 of zelfs wel 1.000 (bij 1 acute EC-50-schatting) zijn.

In figuur 1 is een overzicht gegeven van representanten van de bodemfauna. Deze representanten zijn ingedeeld naar voedselkeuze phytofagen (planteneters), saprofagen (organisch materiaaleters) en predatoren (andere beesten etend). Tevens geeft dit een beeld van de grootte van het beest. Nematoden zijn niet weergegeven. De 'beesten' zouden ook kunnen worden ingedeeld volgens bouwplan. Het anatomische bouwplan is in principe de enige basis voor diversiteit, 'disparity' genoemd.

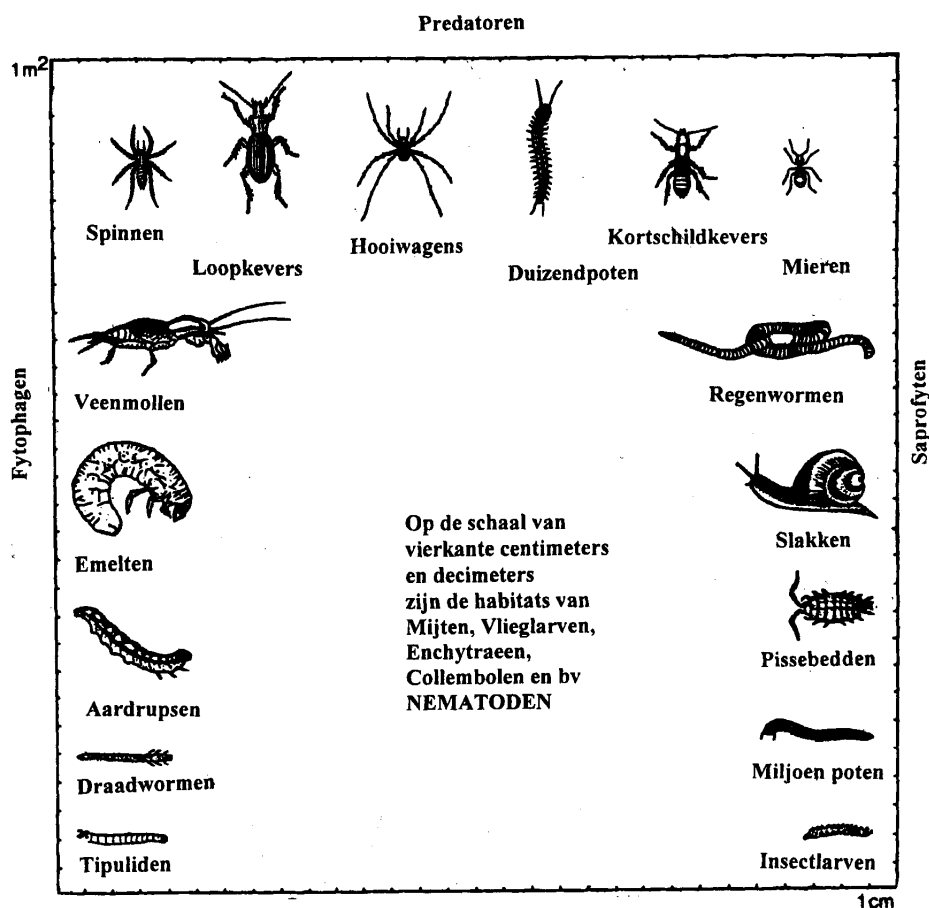


Fig. 1. Overzicht van een aantal representanten van de bodemfauna.

Van allerlei kanten is er kritiek op het ontstaan en gebruik van de HC-waarden. Ze zouden in niet relevante laboratoriumexperimenten zijn bepaald, waardoor de verontreiniging 5 keer zo giftig lijkt als dat ze in werkelijkheid is. Of ze zijn alleen maar bepaald aan kweekbare beesten, die misschien niet zo gevoelig zijn [Kooijman, 1987]. Of er is gekeken naar robuuste effecten als sterfte, reproductie of gewichtverlies, terwijl narcose-effecten niet worden beschouwd. Of er is geen rekening gehouden met heterogeniteit en ruimtelijke en tijdelijke variabiliteit. Of met het gebonden zijn of met het bound-residue zijn en dus niet beschikbaar zijn van de verontreiniging.

Samenvattend kan worden gesteld dat er ecologisch en statistisch veel beperkingen en onzekerheden zijn met de HC-rekensommen [Smith en Cairns, 1993; Renner, 1996].

Een andere effectgerichte methode van risico meten is 'daadwerkelijk in de grond kijken'. Dit vereist kennis om te kunnen zien of er iets 'mis' is. Het stellen van de diagnose (hoe ernstig is het) vereist brede bodembioologische kennis. Dit brede vakmanschap bestaat niet in één persoon of binnen één bepaalde wetenschappelijke vakgroep. Wel bestaan er enkele diagnostische toetsen of metingen om een grond te beoordelen op mogelijke verontreinigingen. Dan wordt er in de te beoordelen grond gekeken naar specifieke reacties van bijvoorbeeld de microflora (ademhaling, nitrificatie), de bodemfauna (specifieke samenstelling, biomassa), of de vegetatie (kieming, groei). Dit is de effectgerichte inschatting.

## 2.2 Effectgerichte inschatting

Effectgerichte metingen zijn in grote lijnen op te splitsen in bioassaymetingen en in biomonitoring. Onder bioassaymetingen wordt verstaan in de verdachte grond de reactie van een aantal toegevoegde biologische representanten (bacteriën 'oplichters' of symbiotische N<sub>2</sub>-binders, planten, springstaarten of bijvoorbeeld wormen) te meten. Onder biomonitoring wordt verstaan het analyseren in de tijd van een bepaalde populatie van de verontreinigde grond.

Deze effectgerichte benadering heeft voor- en nadelen. Nadelen (zoals genoemd in 2.1) zijn dat het nog geen geschikte en geaccepteerde methode is en dat effecten niet eenvoudig kunnen worden herleid tot de 'oorzaak'. (Dit laatste argument, van praktische aard, wordt vaak genoemd maar geeft precies het verschil in benadering aan. Stel dat de vissen in de Rijn doodgaan en dat bijvoorbeeld het monitoringssysteem van RIZA bij Lobith alarm slaat. Om de oorzaak te achterhalen kunnen dan wellicht 200 stoffen worden geanalyseerd. Stel dat geen van die stoffen de normen overschrijden, wil dat dan zeggen dat de waterkwaliteit goed is?).

Voordelen van de effectgerichte benadering zijn dat:

- a. ook effecten worden waargenomen van stoffen die niet in het standaard analysepakket zitten;
- b. ook effecten kunnen worden waargenomen van verontreinigingen van onbekende stoffen of stoffen waarover geen toxicologische informatie beschikbaar is;
- c. ook effecten van snel afbrekende stoffen kunnen worden gemeten (formaline doodt het bodemleven, maar de stof zelf is na een paar weken verdwenen);
- d. mengsels van stoffen kunnen worden beoordeeld, inclusief synergistische effecten;
- e. informatie wordt verkregen over de biologische beschikbaarheid van een stof.

De gedachte, van waaruit in dit NOBIS-project is gewerkt, is dat niet de totale concentratie van de verontreiniging gebruikt moet worden om het risico te beschouwen, maar dat de 'beschikbare' concentratie relevant is. Om niet te verdwalen in het bepalen van die fractie (dat zal verschillen voor de verschillende verontreinigingsstructuren) is gekozen om te kijken naar veelvoorkomende organismen die in de waterfase van grond functioneren.

## 2.3 Nematoden als biomonitoringsysteem

Op aarde zijn 80 % van alle meercellige beesten nematoden. Het zijn kleine draadvormige wormpjes (0,1 - 5 mm in lengte) die in elk bodemsysteem kunnen leven als er water, zuurstof en organisch materiaal is. Bodemnematoden functioneren in de waterfase en zijn onderdeel van bodemvoedselwebben [De Ruiter et al., 1995]. Vanwege dat functioneren in de waterfase worden deze het meest geschikt geacht om 'biobeschikbaarheid' te reflecteren. Over de gehele wereld zijn reeds meer dan 15.000 soorten beschreven. Een kilo Nederlandse grond kan gemiddeld 30.000 nematoden bevatten, verdeeld over 30 tot 50 taxa. Dus binnen één bepaald anatomisch bouwplan is weer een grote verscheidenheid, 'soortdiversiteit'. Die soorten kunnen

onderling verschillen in levensstrategie en in de wijze waarop ze zich voeden [Bongers en Bongers, 1998].

Van ongeveer 1930 tot 1980 is vooral aandacht besteed aan plantenparasitaire nematoden, de veroorzakers van ziekten bij planten, zoals 'the golden nematode', de veroorzaker van 'aard-appelmoeheid'. Sinds de 80-er jaren is er ook weer aandacht voor vrij levende nematoden, die bijvoorbeeld in te delen zijn naar het voedsel dat ze eten: bacteriën, schimmels, allerlei soorten organisch materiaal (omnivoren) en elkaar (carnivoren). Ook zijn nematoden in te delen naar hun levensstrategie en hun ecologisch gedrag.

In tabel 1 is samengevat waarom nematoden in principe goed bruikbaar zouden zijn als biomonitor. Het kunnen opsplitsen van de taxonomische (naamgeving op basis van uiterlijke kenmerken) diversiteit in een functionele diversiteit (op basis van voedselkeuze en op basis van levensstrategie) maakt de nematodendiversiteit tot een zeer goed effectbeoordelingssysteem [Coleman et al., 1988].

Tabel 1. Argumenten waarom nematoden geschikt zijn als biomonitor.

argumenten waarom nematoden geschikt zijn als effectgerichte biomonitor
- hoge dichtheid
- hoge diversiteit
- overal aanwezig
- efficiënt te isoleren
- goede kennis
- verscheidenheid in voedseltypen
- verscheidenheid in levensstrategie

Ook vanwege de gevoeligheid van nematoden mag worden verwacht dat het een goed instrument voor bio-indicatie is. Nematoden zijn zeer gevoelig voor gechloreerde verbindingen als DD (dichloorpropeen-dichloorpropaan) en chloorfenolen [Kappers en Wondergem-van Eyk, 1988]. Ook voor zware metalen als lood en cadmium zijn nematoden gevoelig gebleken, zelfs indirect via de voedselketen [Doelman et al., 1984]. Gevoeligheid voor Cu is aangetoond door Korthals en medewerkers [1996b]. De gevoeligheid voor verzuring [Hyvönen en Persson, 1990] en bemesting [Ettema en Bongers, 1993] is reeds aangetoond. Ook voor ruwe olie zijn nematoden gevoelig gebleken [NOVEM, 1998].

Volgens de levensstrategie zijn nematoden in te delen in aan de ene kant de 'Colonizers' (C) en aan de andere kant de 'Persisters' (P). Ze kunnen worden ingedeeld volgens een CP-schaal. Behalve extremisten zijn er tussengroepen. De CP-schaal kent vijf groepen [Bongers, 1990]. De opportunisten (colonizers) krijgen een waarde 1 en de asceten (persisters) krijgen een waarde 5.

De 'colonizers' (CP-1) zijn te omschrijven als 'enrichment'-volgers, snelle rakkers die het goed doen bij verstoringen. De 'persisters' (CP-5) zijn te omschrijven als rustige, sobere beesten, die gevoelig zijn voor verstoringen. In tabel 2 zijn de eigenschappen van deze twee extreme groepen weergegeven.

Tabel 2. Eigenschappen van 'colonizers' en 'persisters'.

colonizers	persisters
hoge reproductiesnelheid	lage reproductiesnelheid
veel eieren	weinig eieren
kleine eieren	grote eieren
korte generatietijd	lange generatietijd
tolerant	gevoelig voor verstoringen
hoog kolonisatievermogen	laag kolonisatievermogen
tijdelijke habitats	stabiele habitats
grote populatiefluctuaties	geringe populatiefluctuaties
relatief klein	relatief groot
actieve dieren	trage dieren
hoge O <sub>2</sub> -consumptie	lage O <sub>2</sub> -consumptie
lage voedingsefficiëntie	hoge voedingsefficiëntie
hoge metabolische activiteit	lage metabolische activiteit

Op basis van de eigenschappen, zoals weergegeven in tabel 2, zijn de nematoden dus in vijf CP-groepen ingedeeld. Een verdeling van de nematodenpopulatie over deze vijf groepen leidt tot de Maturity Index (MI).

$$MI = \sum_{i=1}^n v(i) \cdot f(i)$$

waarin:

- $v(i)$  is de CP-waarde van familie  $i$ ;
- $f(i)$  is de frequentie van deze familie in een monster.

De MI is de gemiddelde waarde van de nematoden op deze CP-schaal in een monster, het gewogen gemiddelde. Ook de bacterie-etters, schimmeleters, omnivoren en carnivoren zijn in deze index opgenomen. Neemt de microbiële activiteit toe dan reageren de opportunistische soorten snel, waardoor de MI afneemt.

Hoewel het mechanisme nog niet geheel duidelijk is, blijkt dat de langlevende soorten veel gevoeliger zijn voor verontreinigingen dan de kortlevende soorten, met andere woorden dat de MI ook afneemt als gevolg van verontreinigingen door het verdwijnen van de hoger ingeschaalde groepen of doordat gevoelige soorten door ongevoelige soorten worden vervangen. Afname van de MI kan dus wijzen op verhoogde microbiële activiteit (toename CP-1) of stress (afname CP-4 en CP-5). Om deze twee veranderingen in de MI naar oorzaak te kunnen herleiden is de MI(2-5) ontwikkeld (effect verrijking geminimaliseerd) [De Goede, 1993]. Dus door de CP-1 groep uit te sluiten wordt de MI(2-5) bepaald.

Om de MI te kunnen bepalen moet aan enkele voorwaarden voldaan zijn, waarvan de belangrijkste is dat de nematodengemeenschap in evenwicht verkeerd met het systeem, dat wil zeggen dat het niet mogelijk is om een sterk verstoorde grond te beoordelen. Fysische verstoring kenmerkt zich uiteindelijk door verrijking, resulterend in een hoge dominantie van CP-1. Vandaar dat binnen enkele dagen na de bemonstering de analyse op taxa moet plaatsvinden.

In tabel 3 zijn een aantal taxa weergegeven met hun CP-inschaling. De inschaling van de plantenparasitaire nematoden is tussen haakjes weergegeven.

Tabel 3. CP-waarden van terrestrische en aquatische nematodenfamilies [Bongers, 1990]

familie	CP	familie	CP	familie	CP
Alloionematidae	1	Aulolaimidae	3	Teratocephalidae	3
Bunonematidae	1	Bastianiidae	3	Tobrilidae	3
Diplogasteridae	1	Criconematidae	(3)	Tripylidae	3
Diplogasteroididae	1	Cyatholaimidae	3	Alaimidae	4
Diploscapteridae	1	Desmodoridae	3	Anatonchidae	4
Neodiplogasteridae	1	Diphtherophoridae	3	Bathyodontidae	4
Odontopharyngidae	1	Diplopeltidae	3	Choanolaimidae	4
Panagrolaimidae	1	Dolichodoridae	(3)	Dorylaimidae	4
Rhabditidae	1	Ethmolaimidae	3	Ironidae	4
Tylopharyngidae	1	Halaphanolaimidae	3	Leptonchidae	4
Anguinidae	2	Hemicycliophoridae	(3)	Mononchidae	4
Aphelenchidae	(2)	Heteroderidae	(3)	Nordiidae	4
Aphelenchoididae	(2)	Hoplolaimidae	(3)	Qudsianematidae	4
Cephalobidae	2	Hypodontolaimidae	3	Trichodoridae	(4)
Monhysteridae	2	Leptolaimidae	3	Actinolaimidae	5
Myolaimidae	2	Linhomoiedae	3	Aporcelaimidae	5
Neotylenchidae	2	Meloidogynidae	(3)	Belondiridae	5
Ostellidae	2	Microlaimidae	3	Chrysonematidae	5
Plectidae	2	Odontolaimidae	3	Discolaimidae	5
Tylenchidae	(2)	Onchulidae	3	Longidoridae	(5)
Tylenchulidae	(2)	Pratylenchidae	(3)	Nygolaimidae	5
Xyalidae	2	Prismatolaimidae	3	Thornenematidae	5
Achromadoridae	3	Rhabdolaimidae	3		

#### 2.4 Nematoden-dataset

De analyse van de nematoden zal plaatsvinden via het bepalen van het totale aantal per kilo grond (1), de taxonomische verscheidenheid (2), het aandeel CP-1 (3), CP-2 (4), CP-3 (5), CP-4 (6) en CP-5 (7) groepen, leidend tot de Maturity Indexen (8 en 9). Extra relevante informatie kan nog worden gehaald uit de classificatie in voedingsgroepen: het aandeel bacterie-eters (10), schimmeleeters (11), alleseters (12) en carnivoren (13). Het combineren van trofische groepen en CP-groepen leidt ook tot een uitspraak over bodemkwaliteit [Bongers en Bongers, 1998].

De 13 karakteristieken zijn uiteindelijk bepalend voor de uitspraak over de nematodenfauna, resulterend in een uitspraak of die bepaalde grond gezond is. Het analyseschema is samengevat in figuur 2.

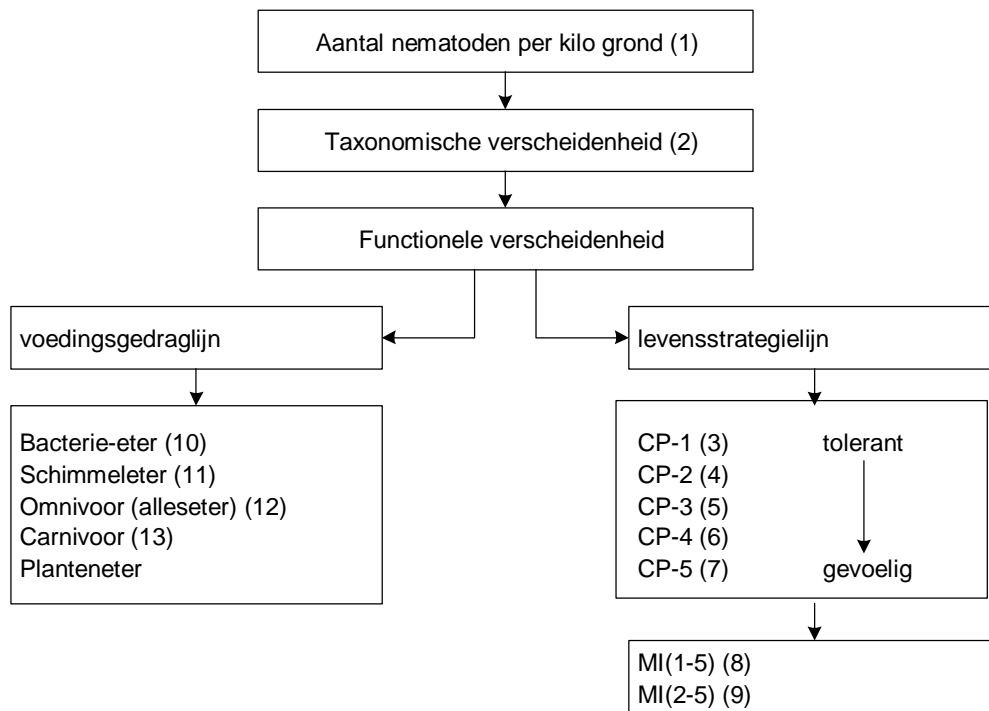


Fig. 2. Analyseschema van nematoden, opgesplitst in 13 karakteristieken.





## HOOFDSTUK 3

### MATERIAAL EN METHODEN

Om de doelstellingen van het haalbaarheidsonderzoek te bereiken, is het project te verdelen in zes activiteiten, te weten:

1. oriëntatie: bepalen waar gronden beschikbaar zijn en welke eigenschappen deze gronden globaal hebben;
2. karakterisatie en selectie: bepalen en vastleggen van de kenmerken van alle beschikbare gronden, zoals herkomst, fysisch/chemische samenstelling en vegetatie. Op basis van de karakterisatie worden de gronden geselecteerd die worden gebruikt voor de verdere uitvoering van het project;
3. collectie: monsters verzamelen die op basis van activiteit 2 zijn gekarakteriseerd en geselecteerd;
4. analyse: uitvoeren van de geplande analyses (chemisch, fysisch en biologisch);
5. analyseren van het nematoden-databestand van het Meetnet Bodemkwaliteit;
6. interpretatie en rapportage: interpretatie van verkregen data en daarmee de in de doelstelling opgenomen relaties af te leiden en de voorgestelde methodiek te formuleren.

Hierna zal per activiteit worden besproken wat is uitgevoerd om het beoogde resultaat te halen.

#### 3.1 Oriëntatie

Er is een inventarisatie gemaakt van partijen die potentieel bruikbare PAK-gronden vertegenwoordigen. Hiertoe zijn de consortiumleden benaderd. De verwachting dat vanuit het consortium mogelijk voldoende geschikte partijen grond verzameld konden worden, bleek echter niet te kunnen worden gerealiseerd. Meestal was er sprake van grond die reeds uit zijn natuurlijke omgeving was weggenomen en in metershoge depots gezet. Deze gronden zijn niet geschikt voor het onderzoek. Daarom is gezocht naar gronden op locaties waar een 'natuurlijke' situatie aanwezig is (gronden die aan het oppervlak liggen) en die vers bemonsterd kunnen worden.

Aangezien er uit het consortium niet genoeg geschikte gronden konden worden geïnventariseerd, is besloten om rapportages van bodemonderzoeken, uitgevoerd door Grontmij De Weger VoF en IWACO B.V. in opdracht van Managementgroep van de Betuweroute, door te nemen. Via ir. J.A. Groen is toestemming gekregen voor de bemonstering. Voor de selectie van locaties zijn de volgende selectiecriteria gehanteerd:

- monster uit de bovengrond (bovenkant monster dient te beginnen bij circa 0,05 m-mv);
- PAK-concentratie boven de streefwaarde;
- concentratie minerale olie lager dan 1.000 mg/kgds (= interventiewaarde) (er wordt verondersteld dat het boven die waarde moeilijk is om het effect van de minerale olie te scheiden van die van PAK).

Uit alle rapportages van bodemonderzoeken voor de aanleg van de Betuweroute zijn 333 locaties geselecteerd die aan bovengenoemde criteria voldoen. Alle bekende gegevens, zoals bijvoorbeeld het gemeten % lutum, % organische stof, pH-grondwater, uit de rapportages zijn opgenomen in een spreadsheet.

De inventarisatie heeft ook zes slibmonsters (via J. Harmsen, ICW), alsmede 10 grondmonsters van een voormalige illegale vuilstort te Nigtevecht (via drs. F.P. Keuning, Provincie Utrecht) opgeleverd.

#### 3.2 Karakterisatie en selectie

In deze fase van het onderzoek is een selectie gemaakt uit de 333 locaties. Allereerst zijn 124 locaties, waarvan het grondmonster een mengmonster is, uitgesloten van verdere deelname, omdat deze monsters niet representatief zijn voor één punt. Behalve PAK en zware metalen zouden de gronden ook minerale olie kunnen bevatten. Uit een selectie van 122 gronden bleek in 82 gronden de olieconcentratie beneden de streefwaarden (50 mg/kg) te zijn. In 38 gronden was de olieconcentratie beneden 2.525 mg/kg (= S + I/2 = H) (zie tabel 4). De algemene trend is dat de minerale olieconcentratie, op een enkele uitzondering na, beneden 500 mg/kg is (zie tabel 5). In die lage concentraties, en vanwege de ouderdom van de vervuiling, wordt van minerale olie geen invloed op het nematodenbestand verwacht, zoals eerder is aangetoond [NOVEM, 1998]. Om de selectie een goede afspiegeling te laten zijn van de gehele dataset is de maximale en minimale waarde van de PAK-concentratie, % lutum, % organische stof van de gehele dataset bepaald. Uit de 209 overgebleven locaties zijn vervolgens 75 locaties geselecteerd, die de range in PAK-concentratie goed dekken (zie tabel 6). Dit is bereikt door een histogram op te stellen van de 209 overgebleven locaties en de range in PAK-concentratie te verdelen in vier stukken met evenveel punten. Van de 75 geselecteerde punten is de range in % lutum en % organische stof bepaald. Verschillen ten opzichte van de 209 punten zijn weggewerkt door 21 extra punten te selecteren. Op deze manier dekken de 96 geselecteerde punten de range in PAK-concentratie, % lutum en % organische stof van de dataset.

Tabel 4. Verdeling van 333 locaties naar het toetsingsresultaat van minerale olie.

toetsingsresultaat	aantal
olie < S	82
S < olie < H	38
H < olie < I	2
niet bepaald	211
totaal	333

Tabel 5. Verdeling van 96 geselecteerde locaties naar het toetsingsresultaat van minerale olie.

toetsingsresultaat	aantal
olie < S	6
olie > S	9
niet bepaald	81
totaal	96

Tabel 6. Verdeling van de geselecteerde locaties.

klasse	PAK-concentratie (mg/kgds)	aantal locaties	Pb-equivalenten	aantal locaties
1	< 20	20	< 200	22
2	20 - 40	22	200 - 400	39
3	40 - 80	19	400 - 800	13
4	> 80	14	> 800	9

Tenslotte is van alle monsters bepaald of er in voorgaande bodemonderzoeken zware metalen zijn bepaald. Indien er geen zware metalen bekend waren, zijn deze na monsternamen alsnog door het Milieulaboratorium van IWACO B.V. bepaald.

De 96 geselecteerde monsters zijn gecodeerd op basis van de PAK-concentratie uit de bodemonderzoeksrapporten. Hiervoor is de range in PAK-concentratie van de selectie verdeeld in vier

stukken, op zo'n manier dat er een goede verdeling ontstaat over lage en hoge PAK-concentraties. De indeling is weergegeven in tabel 6. Uit die tabel blijkt dat er genoeg variatie aanwezig is in de hoge PAK-concentraties, zodat niet het doel van dit onderzoek, een relatie vaststellen tussen nematoden en PAK, wordt gemist. De eerste locatie met een PAK-concentratie lager dan 20 mg/kgds krijgt als codering 1.1. De tweede uit diezelfde klasse 1.2, enzovoorts.

### 3.3 Collectie

In week 26 en 27 (1998) zijn de 96 geselecteerde locaties met een guts (Ø 1 - 2 cm) bemonsterd door de Milieutechnische Dienst (MTD) van IWACO B.V. In figuur 3 is geografisch weergegeven waar bemonsterd is.

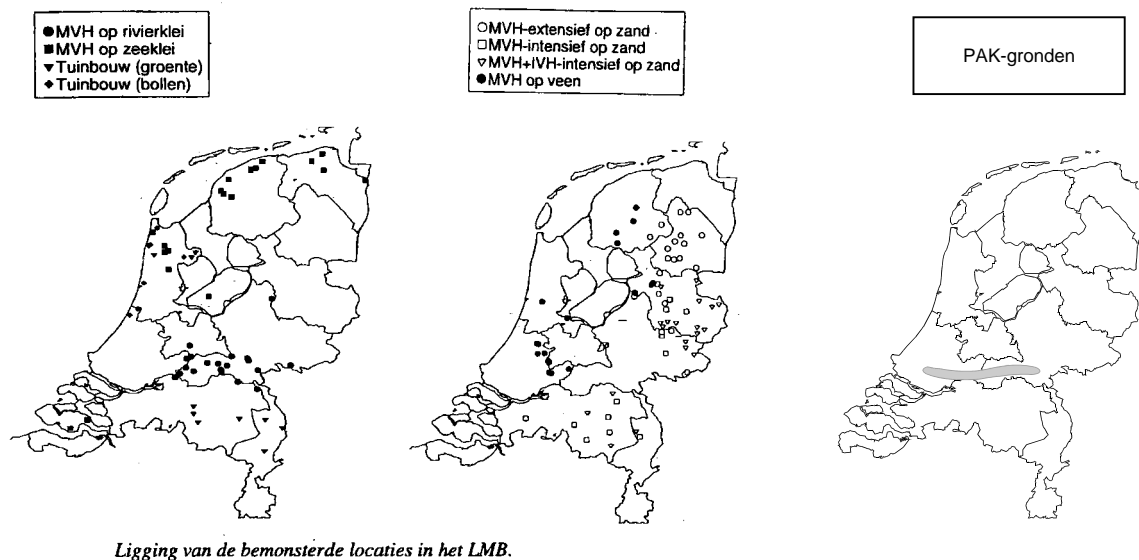


Fig. 3. Geografische ligging van de monsterpunten.

Elk grondmonster is een mengmonster van 60 afzonderlijke steken met de guts, rond de geselecteerde locatie. De steken zijn geplaatst op een diepte van 5 - 15 cm. Tijdens de bemonstering is de dominante vegetatie genoteerd en het bodemgebruik (b.v. weiland, wegberm e.d.). De monsters zijn naar het Bedrijfslaboratorium voor Grond- en Gewasonderzoek (te Oosterbeek) gestuurd.

### 3.4 Analyses

#### 3.4.1 Chemisch/fysisch

Het door STERLAB geaccrediteerde Milieulaboratorium (ML) van IWACO B.V. heeft verschillende analyses uitgevoerd. Ten eerste analyses van zware metalen op de monsters, waarvan uit eerdere bodemonderzoeken geen concentraties zware metalen bekend waren. Ten tweede analyses van de concentratie PAK (10 VROM), % lutum en % organische stof op tien monsters, die ter controle van de resultaten uit eerdere bodemonderzoeken dienen. De afwijkingen tussen de oude bodemonderzoeksresultaten en de nieuw bepaalde resultaten waren te groot om nog betrouwbaar gebruik te kunnen maken van de oude data. Daarom is van alle monsters het % lutum, % organische stof en de concentraties PAK (10 VROM) bepaald. Het lutumgehalte is met de pipetmethode conform NEN 5753 bepaald. Het organisch stofgehalte is met de gloeiverliesmethode conform NEN 5754 bepaald. De concentraties PAK (10 VROM) zijn met behulp van vloeistofchromatografie bepaald volgens een analysemethode die afgeleid is van ontwerp NEN 5731.

### 3.4.2 *Nematodenanalyses*

De samenstellingen van de nematodenpopulatie van de monsters zijn door het door STERLAB geaccrediteerde laboratorium van BLGG B.V. te Oosterbeek bepaald. Voor de extractie van nematoden uit grond is minimaal 100 gram grond opgespoeld met een techniek die gebaseerd is op de Oostenbrinktechniek [s'Jacob en Van Bezooijen, 1984]. De nematoden zijn in water verzameld door het grondmonster met de nematoden van boven in te brengen in een soort watertunnel waarin een opwaarts gedefinieerde waterstroming heerst. De bezinksnelheid van nematoden is kleiner dan van bodemmateriaal. Daardoor kan een suspensie worden verzameld, die uit nematoden en kleine deeltjes bestaat. Deze suspensie is over een katoenen filter geleid. Na 3 dagen is de omringende vloeistof met nematoden (die door het filter gekropen zijn) bemonsterd. Vervolgens zijn de nematoden geteld en geïdentificeerd in de vloeistof. De resultaten van de nematodentellingen zijn naar IWACO gestuurd, alwaar de gegevens zijn geanalyseerd en ingedeeld in 13 karakteristieken. Dr. R.G.M. de Goede werd betrokken bij de canonische correspondentie-analyse. Dr. A.M.T. Bongers was betrokken bij de overall analyse.

### 3.5 **Referentiebestanden van het RIVM**

Uit het bestand 'Meetnet Bodemkwaliteit' (beheer drs. A. Schouten, RIVM) zijn 76 grasgrond-data beschikbaar gesteld. Deze ruwe data zijn gerubriceerd op de 13 karakteristieken, zoals vermeld in figuur 2. De geleverde data betreffen graslandgronden in veenachtige en kleiachtige gebieden door geheel Nederland heen, zoals aangegeven in figuur 3.

## RESULTATEN EN DISCUSSIE

Hier worden de resultaten van de nematodenanalyses gepresenteerd en besproken in relatie tot de bodemkarakteristieken en met name de vervuilingkarakteristieken: polyaromatische koolwaterstoffen en deels zware metalen. Bij de discussie wat de invloed van die verontreiniging nu is op de nematodensamenstelling worden ook de RIVM-referentiegronden betrokken.

4.1 **Beeld van de PAK-gronden en de algemene trends**

De basisdata van de nematodentellingen in de PAK-gronden en de determinatie is weergegeven in bijlage A. Van de PAK-gronden zijn alle nematodenmetingen, zoals het totale aantal nematoden per 100 gram grond, het aantal taxa, het percentage bacterie-eters, schimmeleeters, omnivoren, carnivoren, de CP-1, CP-2, CP-3, CP-4 en CP-5 groepen, de Maturity Index van de CP-1 t/m CP-5 groep (MI(1-5)) en de Maturity Index voor de CP-2 t/m CP-5 groep (MI(2-5)) met chemische karakteristieken en dominante vegetatie, weergegeven in een samenvattingstabel (zie bijlage B).

Het verband tussen de Maturity Index (2-5) en de PAK-concentratie in 96 gronden is weergegeven in figuur 4. Tien gronden zijn apart in tabel 17 verwerkt vanwege de zeer hoge PAK-concentraties (tot 1.500 mg/kgds).

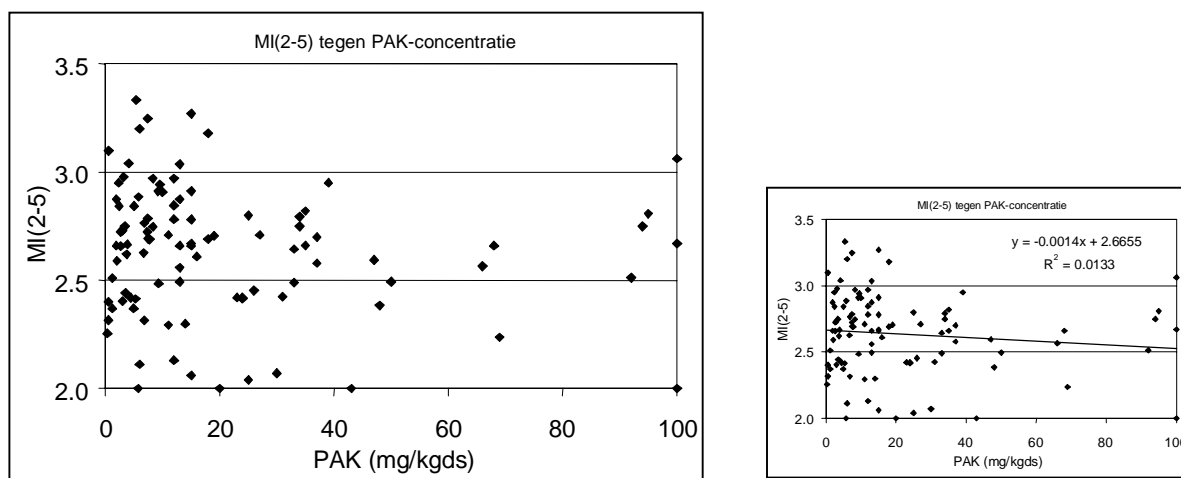


Fig. 4. MI(2-5)-waarden in relatie tot de PAK-concentratie in de gronden.

Volgens de initiële opzet was de verwachting dat deze figuur (zie figuur 4a) de belangrijkste zou zijn binnen 'risico-inschatting van PAK-gronden met behulp van nematoden', omdat bijvoorbeeld ervan uit was gegaan dat een relatie zou worden gevonden tussen de PAK-concentratie en de MI(2-5). De berekende regressielijn, zoals is weergegeven in figuur 4b, geeft alsnog geen duidelijke relatie weer.

In miniformaat zijn in figuur 5 ook de andere 12 nematodenkarakteristieken weergegeven. Deze figuren spreken voor zich, maar sommige aspecten worden kort besproken.

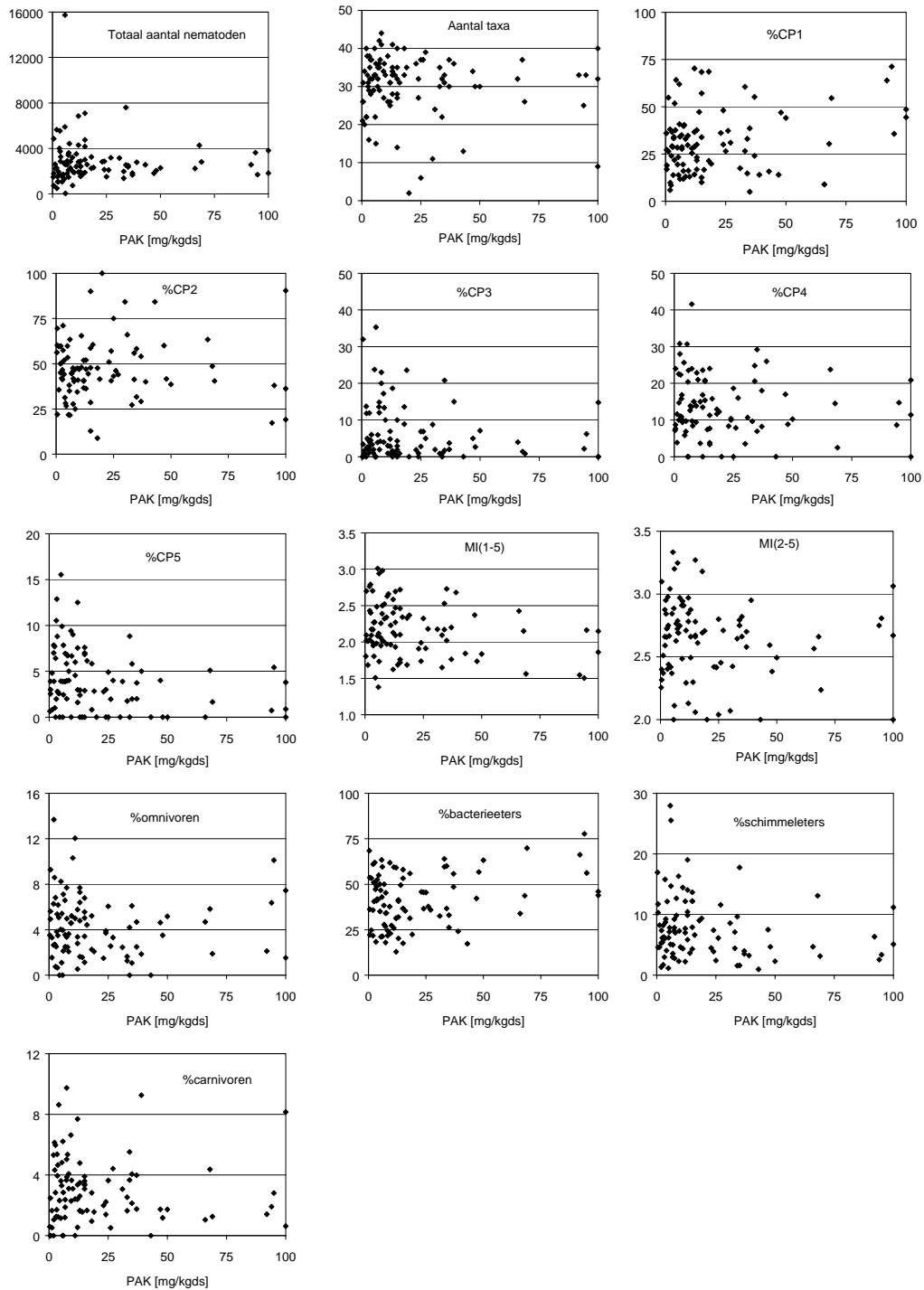


Fig. 5. Alle nematodenkarakteristieken in relatie tot de PAK-concentratie.

In het totale aantal nematoden is geen trend te zien. Het totale aantal nematoden per kilo varieert tussen 900 en 76.000. Het '900' monster is Kreekraksluizen-monster; dit is gebaggerd materiaal, dat nog niet of nauwelijks gerijpt is. Het '76000' monster (GrHO4) bevat circa 42.000 dauerlarven. In het algemeen varieert het aantal rondom de 15.000 a 30.000 per kilo en dit is normaal.

Vanuit de gegevens over de nematodenaantallen (zie bijlage A) is bepaald hoe groot het aantal taxa is. De diversiteit, op basis van taxa, varieert tussen de 20 en 40 families. Er zijn enkele lage uitzonderingen met 12 (GrL29) en 13 (GrL1) soorten. Tevens bevatten de Kreekraksluizen-mon-

sters weinig diversiteit: 2 tot 16 families c.q. soorten. Er zijn twee grondmonsters met iets hogere diversiteit: 43 (GrL35) en 44 (GrL38). Ook dit past in het algemene kader: 30 tot 50 taxa per grondmonster.

Kijkend naar aantallen en taxonomische verscheidenheid, lijken er 8 van de 96 grondmonsters een niet-normale bodemkwaliteit te hebben.

De trends in de CP-groepen en de functionele groepen zijn op het oog nergens duidelijk in een bepaalde richting. De CP-1 groep tendert naar positief gecorreleerd met de PAK-concentraties. Dit zou dan duiden op meer bacteriën bij een hogere PAK-concentratie. Daarmee aannemelijk makend dat PAK of begeleidende minerale olie afgebroken wordt of werd.

Het percentage bacterie-etters, schimmeleters, omnivoren en carnivoren schommelt rondom 30 - 40 respectievelijk 5 - 10, 3 - 6 en 2 - 3. Dit is gezamenlijk geen 100 %, maar na correctie met betrekking tot plantenparasieten en dauerlarven komt het geheel wel op 100 %. In het algemeen, op weer dezelfde uitzonderingen na, duiden de voedingsgroepen op normale gronden.

De CP-1 en CP-2 groep hebben een grote spreiding en zijn samen circa 75 %. De CP-3-5 groep heeft ook een grote spreiding en is gemiddeld hoog.

De berekende correlaties tussen de PAK-concentraties en de nematodenvariabelen zijn samengevat in tabel 7.

Tabel 7. Berekende correlaties.

	PAK (mg/kgds)
aantal niet-parasitaire nematoden	0,03
aantal plantenparasieten	-0,19
totaal nematoden, inclusief dauerlarven	-0,07
MI(1-5)	-0,27
MI(2-5)	-0,12
CP-1 (%)	0,21
CP-2 (%)	-0,04
CP-3 (%)	-0,12
CP-4 (%)	-0,13
CP-5 (%)	-0,27
CP-3-5 (%)	-0,06
bacterie-etters (%)	0,32
schimmeleters (%)	-0,16
carnivoren (%)	-0,09
algeneters (%)	-0,11
omnivoren (%)	-0,07
% plant (tot.)	-0,26

De correlatiecoëfficiënten zijn alle klein. Duidelijke trends met de PAK-concentraties zijn er niet. De resultaten van gedetailleerdere specifieke analyses, onder meer in relatie tot de verschillende organisch materiaal- en lutumconcentraties, zijn weergegeven in bijlage C, maar geven ook geen trends te zien. Ook het opsplitsen van de PAK in 3 ringen, 4 ringen en 5 ringen en het opsplitsen van de PAK-gronden in de groepen i) organische stofgehalte (o.m.) < 4 %; o.m. tussen 4 % en 6,5 %; o.m. tussen 6,5 % en 8,5 % en o.m. > 8,5 %; ii) lutumgehalte < 12 % lutum tussen 12 % en 15 %; lutum tussen 15 % en 20 % en lutum > 20 % geeft geen sterk significante tendensen.



Omdat er vooralsnog geen PAK-trend te ontdekken is, komen er een aantal fundamentele vragen zoals:

- is de bepaalde PAK-concentratie wel beschikbaar;
- is de PAK-concentratie wel toxisch;
- wat is de rol van de aanwezige zware metalen;
- welke rol speelt het organisch stofgehalte bij het meten van effecten van PAK;
- welke rol speelt het lutumgehalte bij het meten van effecten;
- welke rol speelt de vegetatie;
- wat zijn nu de referentiegronden;
- zijn nematoden wel goede bio-indicatoren voor PAK's.

Met behulp van extra analysewerk (zie 4.2), door middel van uitgebreider analyseren van tien PAK-gronden op biobeschikbaarheid (zie 4.4) en met behulp van het analyseren van referentiegronden (zie 4.5) is getracht een en ander duidelijk te krijgen.

## 4.2 Analyse van de gronden met PAK en zware metalen

### 4.2.1 *Analyse via CCA*

Via canonische correspondentie-analyse (CCA) [Jongman et al., 1987] is de dataset nader ont-rasfeld door dr. R.G.M. de Goede, LUW. De CCA is een methode voor het analyseren van levensgemeenschappen (zowel flora als fauna als bodemfauna) in relatie tot bepaalde karakteristieken van de terreinen of locaties. Het betreft het corresponderen van landschapseigenschappen met dominante groepen in de daar aanwezige levensgemeenschap. Het doel van deze analyse was te onderzoeken welke factoren een trendmatig effect zouden hebben op de nematodenfauna. Daartoe zijn 28 gronden beschouwd. Van die gronden was naast PAK-, organisch materiaal- en lutumgehalte ook de zware metalenbelasting bekend.

De zware metalen waren met name Cu, Pb, Zn en Cd. Om ze bijeen te voegen zijn de zware metalen opgeteld als toxiciteitequivalenten en uitgedrukt in Pb-equivalenten. Daarbij is 1 Cu omgezet tot 4 Pb, en 1 Cd of Zn tot 2 Pb. Enerzijds is dit arbitrair anderzijds is dit meer gedaan [Doelman en Elbers, 1989] bij het beoordelen van het risico van bodemvervuilingen in de Noordpunt Oostabtpolder. Het leidde eenvoudiger tot uitspraken. De maximale hoeveelheid Pb-equivalenten was 800 mg/kg.

Bij CCA wordt rekening gehouden met de kennis over de omgevingsvariabelen. Bij een ordinatie-analyse wordt daarmee geprobeerd de verschillen in taxonomische samenstelling tussen de monsters te verklaren. De som van alle verschillen tussen de monsters kan worden berekend en wordt uitgedrukt in de vorm van een getal (tracé) en wordt op 100 % gesteld. Van elke ordinatie-as kan worden aangegeven hoeveel deze verklaart van de totale aanwezige variatie.

### 4.2.2 *Resultaten en korte bespreking*

De 28 geselecteerde gronden zijn onderverdeeld in drie PAK-klassen en drie Pb-equivalent klassen. PAK: 0 - 10, 10 - 25 en 25 - 100 mg PAK/kgds; Pb-equivalent: 0 - 200, 200 - 400 en 400 - 800 Pb-eq. Dit resulteert in een monsterindeling zoals is weergegeven in tabel 8. Aan de hand van deze indeling is vervolgens onderzocht of de nematodenparameters zijn beïnvloed door PAK, zware metalen, dan wel een interactie van beide.

Tabel 8. Monsterpunten ingedeeld naar PAK-klassen en Pb-equivalent concentratie.

	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	totaal
PAK 0 - 10	4	5	3	12
PAK 10 - 25	2	5	1	8
PAK 25 - 100	0	5	3	8
totaal	6	15	7	28

Parameters die lijken te worden beïnvloed door PAK en zware metalen zijn weergegeven in tabel 9 tot en met 15.

Tabel 9. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op Maturity Index (1-5).

MI(1-5)	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	2,42	2,41	2,14	2,35
PAK 10 - 25	2,42	2,36	1,76	2,30
PAK 25 - 100	-	2,21	1,71	2,03
gemiddeld	2,42	2,33	1,90	2,24

Gemiddeld is hier sprake van zowel een negatief PAK-effect als een negatief Pb-equivalent effect op de Maturity Index (1-5). Met name de hoge (400 - 800 mg/kg) Pb-equivalent concentratie heeft invloed bij een PAK-concentratie boven 10 mg/kg.

Tabel 10. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op Maturity Index (2-5).

MI(2-5)	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	2,71	2,84	2,70	2,76
PAK 10 - 25	2,79	2,73	2,78	2,75
PAK 25 - 100	-	2,61	2,58	2,60
gemiddeld	2,74	2,73	2,66	2,71

Gemiddeld is hier een minimaal negatief effect te zien. Opmerkelijk is dat de MI(2-5)-waarde nauwelijks wordt beïnvloed, terwijl de minder gevoelig geachte MI(1-5) (zie tabel 9) duidelijk wordt beïnvloed.

Tabel 11. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op percentage CP-1.

CP-1	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	17,6	24,1	36,9	25,1
PAK 10 - 25	20,7	22,6	57,1	26,4
PAK 25 - 100	-	25,1	54,2	36,0
gemiddeld	18,6	23,9	47,2	28,6

Gemiddeld is hier sprake van een licht positief PAK-effect en een sterk positief Pb-equivalent effect. Dit lijkt geen enrichment effect te zijn, waardoor het aantal CP-1 nematoden toeneemt. Het feit dat door zware metalen het percentage CP-1 nematoden toeneemt, kan eigenlijk alleen maar liggen in de verklaring dat de CP-3-5 groepen afnemen, waardoor de CP-1 groep relatief toeneemt. Dit blijkt duidelijk in tabel 12: bij een hoge Pb-concentratie (400 - 800 mg/kg) en een hoge PAK-concentratie is het percentage CP-3-5 gedaald van circa 30 % naar circa 13%.

Tabel 12. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op percentage CP-3+4+5.

CP-3+4+5	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	31,6	33,5	31,2	32,3
PAK 10 - 25	40,4	29,8	14,3	30,5
PAK 25 - 100	-	23,1	13,2	19,3
gemiddeld	34,5	28,8	21,1	28,1

Gemiddeld is hier sprake van zowel een negatief PAK-effect als een negatief Pb-equivalent effect.

Tabel 13. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op % bacterie-eters.

% bacterie-eters	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	41,3	29,2	46,0	37,4
PAK 10 - 25	27,2	27,5	53,2	30,6
PAK 25 - 100	-	45,5	58,8	50,5
gemiddeld	36,6	34,1	52,5	39,2

Hier is niet bepaald sprake van een consistent effect. Zware metalen hebben een positief effect op het aandeel bacterie-eters en dit effect wordt versterkt indien er tevens sprake is van een grote PAK-verontreiniging. Het past met het beeld dat is verkregen uit tabel 11. Veel bacterie-eters behoren tot de CP-1 groep, hoewel er ook CP-3-5 bacterie-eters zijn. In detail is hier niet nader naar gekeken.

Tabel 14. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op % schimmeleters.

% schimmeleters	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	7,4	6,9	9,7	7,8
PAK 10 - 25	9,6	7,3	13,7	8,7
PAK 25 - 100	-	4,7	4,4	4,6
gemiddeld	8,1	6,3	8,0	7,1

Hier is geen sprake van een effect. PAK's hebben een negatief effect op het aandeel fungivoren, terwijl zware metalen geen effect hebben.

Tabel 15. Effect van PAK en Pb-equivalent concentratie op % plantenparasieten.

% plantenparasieten	Pb 0 - 200	Pb 200 - 400	Pb 400 - 800	gemiddeld
PAK 0 - 10	42,8	55,3	37,2	46,6
PAK 10 - 25	56,4	57,9	24,5	53,3
PAK 25 - 100	-	43,8	31,7	39,2
gemiddeld	47,3	52,3	33,3	46,4

Er lijkt een tendens aanwezig van een negatief effect van zware metalen op het aandeel plantenparasieten. Een hogere zware metalenbelasting heeft ook een negatief effect op de plantenparasitaire nematoden. Dit past in het beeld dat met name zware metalen een negatief effect hebben, maar uit het vervolg blijkt dat het metaleneffect maar iets sterker is dan het PAK-effect.

### *Conclusies ordinatie-analyse*

De twee assen van de CCA verklaarden een significant deel van de variatie in het voorkomen van nematodentaxa ( $p = 0,03$ ). Dit was echter slechts 10,5 % van de totale variatie in de dataset. De factoren % lutum en % organisch stof waren niet significant en zijn buiten de analyse gehouden. Het overgrote deel van de verschillen in taxasamenstelling tussen de monsters kan dus niet worden verklaard door de gemeten omgevingsfactoren. Pb-equivalent verklaart 5,8 % van de verschillen, PAK 10 verklaart 4,7 %.

Zware metalen en PAK hebben effect op het voorkomen van nematodentaxa en dus op de samenstelling van de nematodenfauna. Een groot deel, circa 90 %, van de variatie in de samenstelling van de nematodenfauna tussen de monsterpunten blijft echter onverklaard. Deze onverklaarde restvariatie kan samenhangen met ruis in de dataset (determinatieniveau en -fouten, monsternamefouten, bodemheterogeniteit, enz.), maar kan mogelijk ook verband houden met 'onbekende' omgevingsfactoren (vegetatie, pesticiden, vochtgehalte, bemesting, enz.) of gewoon met het niet aanwezig zijn van PAK's.

### **4.3 Samenstelling van PAK in gronden**

De invloed van de totale PAK-concentratie in de gronden op de structuur van de nematodenlevensgemeenschap was klein. Daar de PAK-concentratie is uitgedrukt als de som van 10 individuele PAK-componenten is geanalyseerd of er een relatie zou kunnen zijn met individuele PAK, zoals naftaleen of benzo(a)pyreen. Het bleek echter dat in het algemeen in alle gronden de onderlinge verhouding van de 10 PAK's ongeveer hetzelfde was. Voor de 2- en 3-ringverbindingen was dit niet exact het geval. In bijlage D is dit voor drie gronden weergegeven. De getrokken kromme geeft de verhouding weer tot BaP (Benzo(a)Pyreen). De gestippelde kromme geeft de verhouding weer tot de som van de 10 PAK's.

### **4.4 Analyse van extra PAK-gronden met extra bioassays**

Van twee sets gronden is bepaald wat de mogelijke biobeschikbaarheid van de verontreinigingen zou kunnen zijn. Uit de reeds geanalyseerde 96 gronden zijn 11 gronden nader geanalyseerd op de biologische beschikbaarheid van PAK (VITO-tox-toets) en op de biologische beschikbaarheid van zware metalen (BIO-met-toets). Tevens zijn 10 extra gronden, waarvan sommige met zeer hoge PAK-concentraties, geanalyseerd op nematodensamenstelling en op verschillende methoden van PAK-beschikbaarheid. Voor zware metalen is de BIOMET-methode gebruikt, zoals is beschreven door Corbisier et al. [1996]. Het principe berust op de mate van lichtgeving van een bacterie (*Alcaligenes entrophus*). Deze bioluminescentie is positief gecorreleerd aan de hoeveelheid beschikbare zware metalen. Voor PAK is de VITO-tox-toets gebruikt [Van der Lelie et al., 1997]. De mate van oplichting van de bacterie *Salmonella typhimurium* is een mate van beschikbaarheid van PAK in relatie tot de genotoxiciteit.

In tabel 16 zijn alle karakteristieken van deze 11 gronden weergegeven.

Tabel 16. Karakteristieken van grondmonsters in relatie tot VITOTOX en BIOMET.

monsterpunt	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.9	4.10	4.12	4.14
N (aantal nematoden)	2.850	2.877	2.693	1.373	2.860	2.580	4.753	2.567	3.627	2.863	2.407
X (aantal soorten/families)	41	35	33	35	38	33	32	34	27	27	35
% bacterie-eters	21,8	40,7	46,7	59,6	41,9	50,0	17,5	66,2	77,7	36,6	20,2
% schimmeleeters	9,8	10,4	7,1	7,1	8,7	5,0	7,9	6,3	2,5	7,4	5,9
% omnivoren	2,1	7,7	1,1	1,6	3,5	2,5	1,1	2,1	6,4	3,7	4,8
% carnivoren	3,1	1,6	3,3	1,6	4,7	1,9	3,4	1,4	1,9	1,4	4,8
% CP-1	13,0	30,0	23,4	26,6	21,8	27,7	10,0	63,9	71,2	48,1	16,8
% CP-2	47,0	51,8	56,1	51,6	52,5	60,4	52,0	25,9	17,3	40,6	39,6
% CP-3	20,0	1,8	10,3	10,9	6,9	1,0	3,0	3,7	2,2	0,9	9,9
% CP-4	15,0	11,8	9,3	7,8	14,9	10,9	26,0	4,6	8,6	10,4	24,8
% CP-5	5,0	4,5	0,9	3,1	4,0	0,0	9,0	1,9	0,7	0,0	8,9
MI(1-5)	2,52	2,09	2,08	2,09	2,27	1,95	2,72	1,55	1,5	1,74	2,69
MI(2-5)	2,75	2,56	2,41	2,49	2,62	2,32	2,91	2,51	2,75	2,42	3,04
PAK-concentratie	8,3	13	5,3	33	3,7	6,8	15	92	94	24	13
Pb-equivalent	69,3	242,6	362	108	176,9	166*	nb	359,3	nb	235,4	369,5
% organisch stof	3,0	5,0	7,8	7,0	3,7	4,7	5,9	9,8	12,0	9,0	12,0
% lutum	13,0	12,0	23,0	11,0	15,0	10,0	23,0	14,0	24,0	21,0	25,0
pH	6,7	7,3	6,9	7,0	6,9	6,9	nb	nb	nb	nb	6,5
VITOTOX**	tox	-	-	-	-	-	tox	tox	geno	-	tox
BIOMET**	tox	-	ltox	-	-	-	-	-	ltox	-	-

nb niet bepaald

\* alleen Pb en Zn bepaald

\*\* tox = toxisch, ltox = licht toxisch, geno = genotoxisch, - = geen significante toxiciteit

In twee gronden met hoge (92 en 94 mg PAK/kg) en drie gronden met lage (8, 13 en 15 mg PAK/kg) PAK-concentraties is een toxische reactie gemeten. De hoogste totale PAK-concentratie correleert niet eenduidig met de mate van toxiciteit. Dit geldt ook voor de BIOMET-toets.

Aan de hand van het totale beeld van de nematodengemeenschappen wordt geconcludeerd dat al deze gronden een goede kwaliteit hebben: hoge aantallen, grote verscheidenheid (27 - 41 families), hoge percentages omnivoren en carnivoren, goede percentages CP-3 en CP-4 en CP-5 groepen. Dit resulterend in hoge MI(2-5): variërend van 2,32 tot 3,04.

In tabel 17 zijn de karakteristieken weergegeven van tien gronden

Tabel 17. Samenvattingstabel van tien Nigtevecht-gronden, waaronder extreem hoge PAK-concentraties.

monsterpunt	54	55	56**	57**	58**	59**	60**	61**	62	63
N (aantal nematoden/100 g)	<b>450</b>	2.437	<b>663</b>	<b>303</b>	<b>263</b>	<b>570</b>	<b>497</b>	<b>603</b>	3.387	3.747
X (aantal taxa)	40	30	21	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	25	26	24
% bacterie-etters	69,1	75,0	84,6	39,0	5,7	2,8	12,5	14,7	91,6	86,0
% schimmeleters	6,2	3,1	0,0	0,0	2,3	2,8	0,0	4,4	1,2	3,5
% omnivoren	18,5	10,9	7,7	58,4	19,3	40,2	76,0	20,6	3,6	7,0
% carnivoren	6,2	10,9	7,7	2,6	72,7	54,2	11,5	60,3	3,6	3,5
% CP-1	21,0	45,0	34,7	11,8	0,0	0,0	4,8	0,0	64,5	60,2
% CP-2	51,0	29,0	42,9	34,3	5,9	5,6	7,7	17,8	26,2	25,2
% CP-3	2,0	0,0	4,1	1,0	2,0	0,0	1,0	1,1	1,9	1,9
% CP-4	9,0	12,0	6,1	18,6	85,1	94,4	19,2	76,7	3,7	2,9
% CP-5	17,0	14,0	12,2	34,3	6,9	0,0	67,3	4,4	3,7	9,7
MI(1-5)	2,50	2,21	2,18	3,29	3,93	3,89	4,37	3,68	1,56	1,77
MI(2-5)	2,90	3,20	2,81	3,60	3,93	3,89	4,54	3,68	2,58	2,93
PAK-concentratie (tot) (mg/kgds)	11	3	150	710	1.500	890	330	790	23	20
PAK-concentratie (schud) (µg/l)***	18	18	4.600	10.000	14.000	3.400	530	2.800	130	490
PAK-concentratie (emissie) (mg/kgds)***	0,0812	0,0781	19	40	57	14	2,1	11	0,51	1,9
% organisch stof	4,1	15	13	19	20	20	32	16	11	7,4
% lutum	14	24	25	8	7,3	16	33	8,6	9,8	11
pH	7,9	6,7	8,1	8,2	8,3	8	7,8	7,7	7,7	7,8
VITOTOX® *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Geen genotoxiciteit waargenomen.

\*\* Ten tijde van de monsternamen stonden de locaties van punten 56 t/m 61 onder water ten gevolge van hevige regenval. De locaties van de overige monsterpunten stonden droog, c.q. geen bovenstaand water aanwezig. Opgemerkt dient te worden dat alle monsters ten tijde van de monsternamen waterverzadigd waren.

\*\*\* De CEN-TC-292 toets; een schudtoets (L/S = 4) met een oplossing van 70 % azijnzuur. PAK 10-concentraties in µg/l kunnen met een L/S-factor van 4 worden omgerekend naar mg/kgds. Weergegeven concentraties in µg/l zijn echter afgeronde getallen en kunnen daarom andere uitkomsten geven bij omrekening.

Er bestaat een uiteenlopende range in PAK-concentraties. De referentiemetingen 54 en 55 laten de laagste PAK-gehalten zien: 3 en 11 mg/kg. Naar het midden van de PAK-vlek neemt de concentratie toe van 20 mg/kgds tot 1.500 mg/kgds. De variabiliteit in lutum- en organisch stofgehalte is relatief groot en kan worden verklaard vanwege het feit dat we met een voormalige illegale vuilstort te maken hebben. Opvallend aan deze gronden zijn de hoge pH-waarden voor Nederlandse begrippen. Dit valt te verklaren door wellicht het kalkrijke karakter van het stortmateriaal.

De resultaten van de VITO-tox-test laten nergens toxiciteit zien door de aanwezigheid van PAK. Zelfs niet bij het monster met 1.500 mg/kgds PAK. Als de getoetste bacteriestammen (VITO-tox) geen toxiciteit ondervinden van PAK, kan worden geconcludeerd dat het overgrote deel van de PAK in gebonden vorm voorkomt in de bodem en de beschikbare fractie klein is.

De resultaten van het schudexperiment, een soort geforceerde uitloogbepaling, tonen aan dat de vrijgekomen PAK-fractie positief correleert met de totale hoeveelheid PAK in het grondmonster. Op twee uitzonderingen na bedraagt de vrijgekomen fractie niet meer dan 6 % van de totale

PAK-concentratie. Gemiddeld ligt de beschikbare fractie op 4,1 %. De gemiddelde beschikbare PAK-fractie van de punten 57 tot en met 61 (met een gemiddelde PAK-concentratie van 844 mg/kgds) bedraagt echter 2,6 % van de totale PAK-concentratie. Kortom, in het kern van de PAK-verontreiniging is nauwelijks PAK beschikbaar.

De totale aantallen nematoden zijn klein in zeven gronden: daarin variërend van 2.600 tot 6.000 per kilo grond. Dit is laag in vergelijking met 15.000 - 30.000 gemiddeld. In vier van deze gronden is ook de verscheidenheid (het aantal taxa) betrekkelijk laag: variërend van 11 tot 18. Op basis hiervan zijn we geneigd te concluderen dat de monsters 57, 58, 59 en 60 ergens sowieso niet kloppen. Het percentage CP-3, CP-4 en CP-5 groepen in deze vier gronden is extreem hoog, evenals in grond 61. De MI(2-5)-waarden zijn uniek hoog!

#### *Concluderende opmerkingen*

Gezien de lage biobeschikbaarheid en het niet waarnemen van negatieve tendensen onder invloed van de PAK-concentraties is één van de conclusies dat de aanwezige PAK's geen negatief biologisch effect hebben. De uniek hoge MI(2-5)-waarden 'vragen' om nader onderzoek.

#### **4.5 Referentiewaarden**

Bij veldwaarnemingen naar daadwerkelijke of vermeende effecten of stresssituaties is er altijd de klassieke vraag hoe het resultaat zich verhoudt met blanco of referentiewaarnemingen. Bij experimenteel werk kan altijd een blanco worden meegenomen. Bij veldwaarnemingen ligt dat niet zo eenvoudig vanwege de grote heterogeniteit in het bodemmilieu.

De verwachting was dat door het analyseren van veel grondmonsters er vanzelf een referentie zou ontstaan: de grondmonsters met lage PAK-verontreiniging. Daar er zowel geen sterk significante positieve als negatieve correlaties zijn berekend, blijft het referentiesysteem discutabel.

Grof generaliserend zou kunnen worden gezegd dat met een aantal van boven de 20.000 nematoden per kilo grond een taxonomische verscheidenheid van meer dan 30 taxa over diverse functionele groepen en met een Maturity Index (2-5) van circa 2,3 er genoeg reden is aan te nemen dat de bodemkwaliteit in orde is. Daarmee is het echter nog geen eenvoudig hanteerbaar meetinstrument voor bodemkwaliteit. Immers, unieke stuifzanden (zeer voedselarm en nauwelijks vegetatie, en een zeer klein nematodenbestand) op deze manier beoordelen op bodemkwaliteit is fout. Het betrekken van onder meer bodemeigenschappen, vegetatie en vochtgehalte moet worden meegenomen. Dan moet echter bekend zijn welke invloed deze eigenschappen hebben op het nematodenbestand. Kwalitatieve algemeenheden zijn wel te noemen. Gronden met een hoger organisch stofgehalte en met een hoger lutumgehalte zullen in het algemeen een hogere nematodendiversiteit hebben.

Er zijn in Nederland een aantal locaties waarvan het nematodenbestand bekend is [Alkemade en Esbroek, 1994] en waar regelmatig (eens per 5 jaar) de nematodensamenstelling weer gemeten wordt. Dit is het Meetnet Bodemkwaliteit. Vanuit dit Meetnet zijn de nematodenanalyses van graslanden op veen en klei gebruikt om inzicht in referentiewaarden te krijgen.

In bijlage E zijn de basisgegevens weergegeven van grasland op veen, 1995 [RIVM, 1997]. In bijlage F zijn de basisgegevens weergegeven van grasland op klei, 1997 [RIVM, 1999]. Omdat de veengronden in 1995 zijn geanalyseerd op basis van de diversiteit van 100 à 170 geanalyseerde nematoden is er geen inzicht te krijgen in het totale aantal en in de MI. Vandaar de frequentieverdeling op basis van het aantal taxa.

In figuur 6 is de frequentie van het aantal taxonomische groepen van de PAK-gronden en de referentiveen- en referentiekleigronden weergegeven.

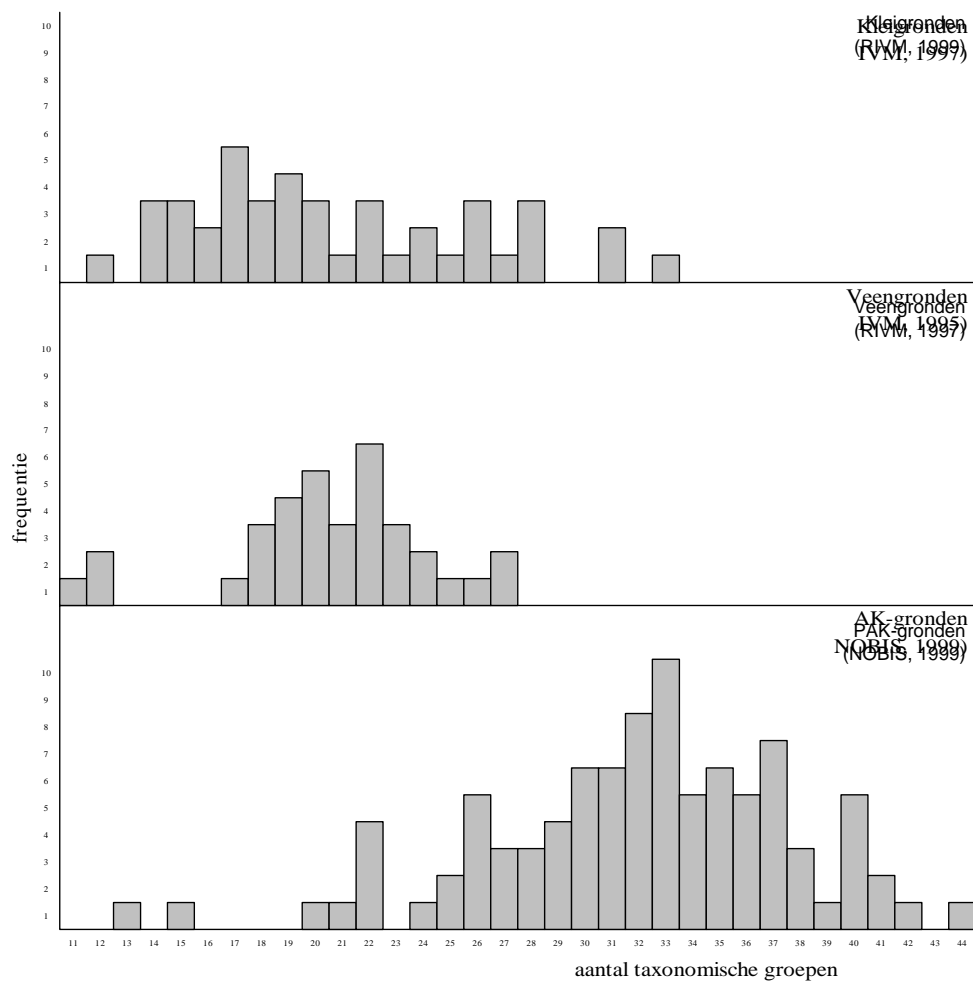


Fig. 6. Frequentie van het aantal taxa van de referentiekleigronden, van de referentieveengronden en van de PAK-gronden.

Hoewel het aantal gronden wat beschouwd wordt verschilt (96 jegens 42 en 34), wordt duidelijk dat in de PAK-gronden de taxonomische diversiteit gemiddeld 30 is en in de referentiegonden gemiddeld 20. Hieruit willen we concluderen dat de 'PAK-gronden' een betere bodemkwaliteit hebben dan de referentiegonden. Het zou kunnen dat de referentiegonden uit gebieden komen waar er stress zou kunnen zijn door verdroging, vermisting, verzuring of eventueel diffuse verontreiniging door zware metalen. Daar deze referentiegonden zijn verzameld in gebieden met intensieve melkveehouderij is de invloed van vermisting zeer aannemelijk. Dit leidt in principe tot verhoudingsgewijs veel CP-1 en taxa. In tabel 18 is het gemiddelde aantal taxa over de diverse groepen weergegeven en daaruit blijkt dat het aantal CP-1 en CP-2 in de drie gronden niet opvallend verschilt. Tevens zou het kunnen dat de methodiek van verzamelen van nematoden in de periode 1995 anders was dan in 1997 en 1998. Alle grondmonsters zijn geanalyseerd door 'Oosterbeek'. Een vergelijking is dus nog mogelijk. Vandaar dat we enigszins gereserveerd staan jegens de conclusie. Het is duidelijk dat een nadere beschouwing van de referentiemonsters een en ander duidelijk zal maken. Inmiddels blijkt dat: "de methode waarmee de RIVM-monsters zijn geanalyseerd is anders dan de PAK-monsters. Dit heeft met name te maken met de pakkans van grote nematoden. Voor het RIVM is voor het LMB nog de 'oude' techniek gebruikt, waarbij de grote nematoden (vaak dorylaimieden) niet apart zijn opgevangen. Deze methode wordt overigens ook in Wageningen gebruikt. Het missen van deze nematoden heeft nogal wat gevolgen, omdat ze vaak vertegenwoordigers zijn de CP-4 en CP-5 groepen. Daarom is al vrij vroeg be-



sloten om de techniek aan te passen en af te stemmen om ook de grote nematoden te kunnen vangen. Al het huidige onderzoek bij BLgg B.V. te Oosterbeek op het gebied van bio-indicatie gebeurt sinds 1994 met deze verbeterde techniek. Alleen op verzoek van het RIVM zijn de monsters voor het LMB met de oude methode gedaan. Overigens is nu ook het RIVM overgestapt op de verbeterde methode. Kort samengevat betekent dit dat met de 'oude' methode vaak lagere MI's worden gevonden en minder taxa. Met de verbeterde techniek wordt de werkelijkheid beter benaderd. Dit betekent wel dat het zonder meer vergelijken van de RIVM-monsters en de PAK-monsters niet goed mogelijk is" (Keidel 'Oosterbeek', 1999).

Tabel 18. Gemiddelde aantal taxa in klei-, veen- en PAK-gronden, verdeeld over de diverse groepen.

	klei	veen	96-PAK
gemiddeld aantal taxa	20,55	20,56	30,45
gemiddeld aantal plantenparasitaire taxa	7,02	4,76	9,74
gemiddeld aantal CP-1 taxa	3,14	4,44	3,14
gemiddeld aantal CP-2 taxa	7,93	8,79	8,77
gemiddeld aantal CP-3 taxa	0,76	0,91	2,90
gemiddeld aantal CP-4 taxa	1,91	1,47	4,22
gemiddeld aantal CP-5 taxa	0,45	0,18	1,77

## HOOFDSTUK 5

### EVALUATIE

In de evaluatie worden de verkregen resultaten gelegd naast het gestelde doel van het onderzoek:

*Het bepalen van de relatie tussen MI en PAK-concentratie, waarbij onderscheid wordt gemaakt naar de concentratie van zware metalen, de herkomst en het gebruik van grond, de fysisch/chemische karakterisatie van de gronden, de begroeiing op de grond en de vorm waarin PAK in deze grond voorkomt. Het project moet resulteren in een generiek toepasbare methodiek waarmee, op basis van de aangetoonde relatie en de reeds beschikbare kennis over referentiebodems, de effecten van verontreinigingen met PAK en zware metalen kunnen worden beschreven.*

De evaluatie vindt plaats aan de hand van de volgende onderdelen: geselecteerde gronden (zie 5.1), analyses (zie 5.2), invloed van PAK en onderscheid tussen PAK en zware metalen (zie 5.3), referentiegronden (zie 5.4), beschrijving van een generieke methodiek (zie 5.5) en hoe mogelijk verder (zie 5.6).

#### 5.1 Geselecteerde gronden

De geselecteerde PAK-gronden zijn voornamelijk afkomstig uit de provincie Utrecht. Getracht is ook PAK-gronden uit andere gebieden van Nederland te verzamelen. Dit is niet gelukt, omdat daar de contacten met probleembezitters nauwelijks bestonden. Het feit dat vooral Utrechtse gronden verzameld zijn duidt niet op een grotere PAK-problematiek, maar op betere contacten daar.

De referentiegronden van het Landelijk Meetnet zijn niet verzameld, maar daarvan mochten we de nematoden-data gebruiken.

Na de zeer moeizame start vanwege het vaak verkeerde aanbod van PAK-gronden (PAK-gronden afkomstig van Definitieve Opslag Plaatsen (DOP) of van Tijdelijke Opslag Plaatsen (TOP) bleken altijd van grotere diepten te komen, waar nauwelijks nematoden aanwezig zijn) zijn we uiteindelijk uitgekomen op 116 PAK-gronden en 76 referentiegronden. In het projectplan was uitgegaan van een studie over circa 200 gronden.

#### 5.2 Analyses

De analyseresultaten van de gronden zijn primair het nematodenbestand (de taxonomische verscheidenheid) en de PAK-concentratie. Daarnaast is veelal geanalyseerd op de zware metalenconcentraties, de fysisch/chemische karakteristieken zoals pH, organisch stofgehalte en lutumgehalte.

Van 28 geselecteerde gronden is geanalyseerd wat de rol van zware metalen naast de rol van PAK is in relatie tot het nematodenbestand. De mogelijk negatieve invloed van PAK en zware metalen op de nematodensamenstelling was zeer klein. Een mogelijke negatieve invloed zou voor circa 5,5 % kunnen worden verklaard door zware metalen en voor circa 4,5 % door PAK.

Van 21 gronden is naar de beschikbare fractie van PAK gekeken in relatie tot de totale concentratie. Met behulp van een specifieke bioassay, de VITO-tox-proef, is bepaald dat de PAK-concentratie niet beschikbaar was, zelfs niet bij drie monsters met concentraties van 700 - 1.400 mg PAK/kg grond. Via uitloogexperimenten (geforceerde beschikbaarheidsbepalen-

de) is de indruk verkregen dat circa 5 % van de totale PAK-concentratie beschikbaar zou kunnen worden. Zowel de remmingsanalyses als de beschikbaarheidsmetingen duiden dus op nauwelijks beschikbaar zijn van de PAK in de geanalyseerde gronden. Hoogst waarschijnlijk is dit het gevolg van 'aging' van PAK in grond. Gezien de chemische overeenkomst tussen PAK-moleculen en humussubstanties als lignine [Kirk en Farrell, 1987] en hun omzettingen is het aannemelijk dat PAK's in grond maar een korte periode effect kunnen hebben. Daarna zijn ze getransformeerd en inert co-valent gehumificeerd. De toxiciteit van PAK is altijd experimenteel gemeten bij verse toediening [Kalf et al., 1995] en nooit aan reeds langdurig in de grond aanwezige PAK's. De kortstondigheid van de directe toxiciteit in de aërobe grond van kleine PAK-moleculen als naftaleen wordt extra verklaard door de goede microbiologische afbreekbaarheid. Voor grote PAK-moleculen als benzo(a)pyreen draagt de slechte wateroplosbaarheid bij tot niet-direct toxisch zijn. De waarden voor Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau (MTR) van 10 PAK's in water en grond zijn weergegeven in tabel 19. Het MTR is gebaseerd op evenwichtspartitie en/of op toxiciteitsexperimenten met bodemorganismen, aangevuld met veiligheidsfactoren. Het feit dat chryseen, benzo(ghi)peryleen en indeno(1,2,3-cd)pyreen een factor 50 keer hoger in grond aanwezig zijn dan naftaleen, terwijl in water een factor 3 tot 30 minder aanwezig mag zijn, duidt op onmiddellijke binding aan grond. Het 'aging' of 'vergronden' (bound-residue) van PAK is een aspect waardoor directe toxiciteit in grond kort bestaat.

Tabel 19. Maximaal toelaatbaar risiconiveau (MTR) PAK in aquatische en terrestrische systemen [Kalf et al., 1995].

PAK	MTR in H <sub>2</sub> O (µg/l)	MTR in grond (mg/kg)
naftaleen	1,2	0,14
anthraceen	0,07	0,12
fenanthreen	0,30	0,51
fluorantheen	0,30	2,6
benzo(a)anthraceen	0,01	0,25
chryseen	0,34	10,7
benzo(k)fluorantheen	0,04	2,4
benzo(a)pyreen	0,05	0,26
benzo(ghi)peryleen	0,03	7,5
indeno(1,2,3-cd)pyreen	0,04	5,9

In de referentiegronden is de bemesting (het fosforniveau) altijd als extra analyse meegenomen, omdat het gebieden betrof van melkveehouderijen. In de PAK-gronden heeft dit niet plaatsgevonden.

Ter ondersteuning van de theorievorming (de beschrijving van een generieke methode!!) zou de bodemkundige analyse het volgende pakket moeten hebben: pH-grond, percentage organisch materiaal, percentage lutum, het bemestings- of eutrofiëringsniveau van de grond door middel van de C:N:P-verhouding van de grond. Daarnaast moet de dominante vegetatie worden beschreven. Deze gegevens moeten de basale bouwstenen zijn in relatie tot het nematodenbestand. Ten behoeve van het nematodenbestand moeten enkele technische aspecten, zoals nematodenextractieduur, omgaan met 'dauerlarven', omgaan met plantenparasitaire nematoden en 'voorvissen', exact worden geformuleerd. Immers om het nematodenbestand van het ene grondmonster te vergelijken met dat van een ander grondmonster is een NEN-nematodenbepaling nodig. Daar alle nematodenanalyses van dit project en ook van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit plaatsvonden door het BGGO was het mogelijk om te proberen tot een vergelijking te komen. Omdat bij diverse onderzoeksinstituten, zoals Nematologie te Wageningen, Bodembioogie te Wageningen, NIOO te Heteren, Experimentele Oecologie te Nijmegen, Plan-

tenzietekundige Dienst te Wageningen en anderen, ook nematodenextracties en analyses worden gedaan, is afstemming noodzakelijk. Dat de fysischchemische karakterisering ook standaard moet plaatsvinden is duidelijk.

### 5.3 Invloed van PAK en onderscheid tussen PAK en zware metalen

Het lijkt alsof de keuze van PAK-gronden uiteindelijk een zeer bijzondere is, daar PAK in deze gronden nauwelijks of geen invloed heeft op de nematodenpopulaties en ook niet op de bacteriën ter bepaling van de genotoxiciteit. Dit leidt dan tot de samenvattende vragen of PAK in de bodem niet beschikbaar is (I), of niet toxisch is (II), of nematoden ongevoelig zijn (III) en of nematoden de ongeschikte bodemrepresentanten zijn (IV).

De aspecten van biobeschikbaarheid zijn in 5.2 besproken en worden afwezig geacht en daarom wordt hier geconcludeerd dat in 95 van de 106 gronden de PAK-belasting de ecologisch bodemkwaliteit niet negatief beïnvloedt. Daar acute experimenten met naftaleen en benzo(a)pyreen hebben aangetoond dat deze twee PAK-verbindingen wel een toxisch effect kunnen hebben op bodemnematoden (in prep. De Goede et al., 1999) blijft de mening dat nematoden goede bio-indicatoren kunnen zijn. Benzo(a)pyreen heeft geen acuut effect bij concentraties in water van respectievelijk 0,05, 0,5 en 5 µg/l, maar wel bij 500 µg/l. Naftaleen geeft geen effecten te zien op het nematodenbestand bij concentraties van respectievelijk 70, 350, 700 en 7.000 µg/l. De acute toxiciteit (48 - 96 tussen blootstelling en 50 % effect) van naftaleen voor algen (chlorella) is circa 33.000 µg/l en voor daphnia's fluctueert het tussen 1.000 en 22.000 µg/l [Kalf et al., 1995]. Voor benzo(a)pyreen ligt de acute toxiciteit boven 5 µg/l voor algen en daphnia's. De gevoeligheid van nematoden voor PAK's blijkt, binnen dit beperkte overzicht, niet minder voor gangbare toetsorganismen als algen en watervlooien [Kalf et al., 1995].

De bodemtoxiciteit van PAK in grond is laag. Opnieuw wordt herhaald dat hiervoor een aantal redenen zijn te geven. Dit komt door sterke binding aan bodemdeeltjes, waardoor het niet beschikbaar is en ook niet toxisch kan zijn. Het aspect van niet-beschikbaar zijn van 'aging' wordt ondersteund door de uitgevoerde VITO-tox-proeven en door de 'uitloog'experimenten. De concentratie is er, maar de beschikbaarheid is zeer laag. De vochttoplosbare fractie is zeer gemakkelijk microbiologisch afbreekbaar, ook al omdat de bemonsterde bouwvoor in het algemeen oxidisch is, wat de afbraak ten goede komt. PAK's zijn toxisch bij hoge concentraties. Het gevaar van PAK schuilt met name in het humane risico, maar niet in de verspreiding via de waterfase en de toxische effecten. Literatuurgegevens over de effecten van verontreinigde PAK-gronden op wormen of andere representanten van de bodemfauna duiden op kleine of geen toxische effecten [Hund en Traunspurger, 1994]. Significante effecten (EC-50-waarden) worden veelal pas boven een concentratie van 1.000 mg/kg zichtbaar [Neilsson et al., 1998].

Ten aanzien van de genoemde opvattingen over beschikbaarheid en toxiciteit van PAK moet er nog wel een en ander worden gevalideerd, met name de gevoeligheid van nematoden. Behalve de reeds uitgevoerde experimenten over de acute toxiciteit zal ook de chronisch toxiciteit nader bestudeerd moeten worden, via dosiseffectexperimenten. De aspecten I) omgaan met heterogeniteit, II) bemonstering, III) bewaring, IV) extractietijd, V) minimale identificatie van het aantal, enzovoorts moeten ook in een nader onderzoek worden beschouwd of zeer exact worden geformuleerd.

De rol van zware metalen kon nauwelijks (circa 5,5 % in 28 geselecteerde grondmonsters) worden aangetoond in dit onderzoek. Het lijkt aannemelijk dat dit veroorzaakt wordt door de lage beschikbaarheid. Zodra metalen beschikbaar zijn, bijvoorbeeld bij lagere pH, is aangetoond dat er duidelijk negatieve invloeden zijn op het nematodenbestand.

In figuur 7 is de invloed van Cu en pH weergegeven op de MI(2-5). Deze resultaten zijn van een veldexperiment, waar in alle plots sprake is van dezelfde grondsoort. Deze waarnemingen vonden plaats in het veld, nadat de verontreinigingen reeds jaren aanwezig waren [Korthals et al., 1996b].

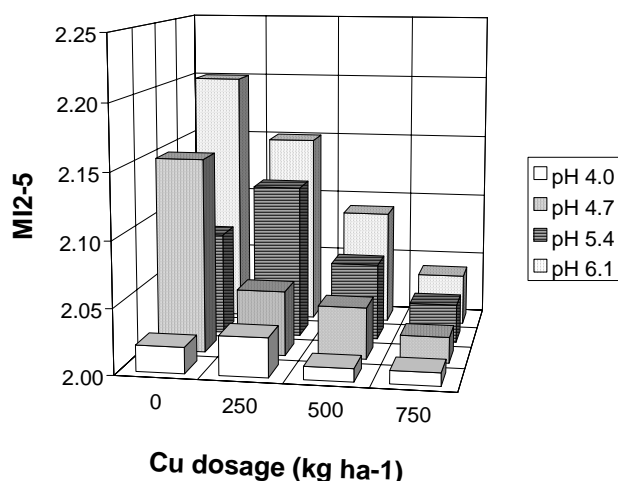


Fig. 7. Invloed van Cu en pH op de MI(2-5) [Korthals et al., 1996b].

Ook voor minerale olie wordt een duidelijke trend gezien. In figuur 8 worden de resultaten van een veldproef weergegeven [NOVEM, 1998]. Hier was sprake van vergelijkbare grondsoorten. Dit figuur geeft goed aan waar het om gaat bij het gebruik van de MI(2-5) als stressparameter. Als de olieconcentratie hoog is, is de MI(2-5) laag, dat wil zeggen dat de gevoelige nematoden verdwenen zijn. Is de olieconcentratie laag, dan kan de MI(2-5) hoog zijn (geen stress) maar in andere monsters ook nog laag (zie de punten rechtsonder), zodat er toch nog stress wordt geïndiceerd. Deze stress wordt echter niet veroorzaakt door de olie. Een analogie met het cadmiumgehalte in menselijk bloed kan het geheel wellicht beter demonstreren. Stel we vervangen de MI(2-5) door 'gezondheid' en de concentratie minerale olie door cadmiumgehalte. Een hoog cadmiumgehalte resulteert in een slechte gezondheid, een laag cadmiumgehalte wil niet zeggen dat een persoon gezond is, er kunnen nog tal van andere oorzaken zijn voor deze slechte gezondheid. Een effectparameter reageert op het totale effect, inclusief interacties tussen stoffen, reactieproducten en op stoffen die niet routinematig gemeten worden, niet gemeten kunnen worden of in het geheel nog niet bekend zijn. Ook is het mogelijk dat een stof snel wordt afgebroken (formaline), terwijl het effect nog lang waarneembaar is.

Duidelijkheid over 'hetzelfde bodemtype', zoals in het zware metalenonderzoek van Korthals [1997] en het minerale olieonderzoek [NOVEM, 1998], is noodzakelijk. Voor de theorievorming zou het opdelen van gronden in een aantal gedefinieerde ecotypen (met ranges van organisch materiaal, lutum, pH, voedselrijkdom en vegetatie) sterk kunnen bijdragen aan het uiteindelijke generieke beleidsinstrument.

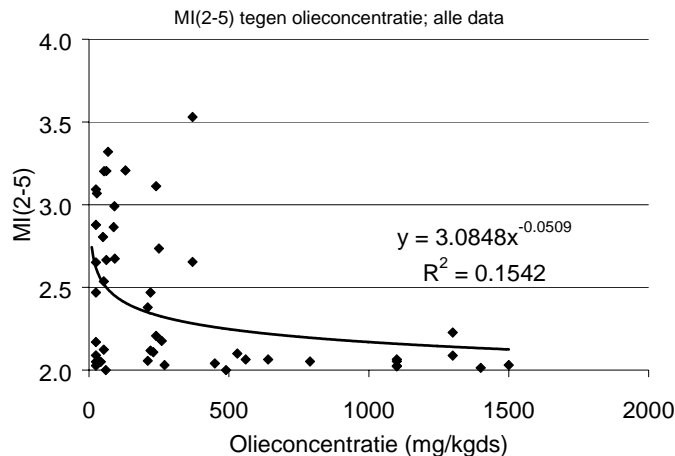


Fig. 8. Invloed van minerale olie op de MI(2-5) [NOVEM, 1998].

#### 5.4 Referentiegronden

Gronden met een lage PAK-concentratie (lager dan 10 mg PAK/kg grond) zijn bij de formulering van het project als referentiegronden gedefinieerd. Dit bleek tegen te vallen, veel van deze gronden vertoonden nog stress, hetgeen mogelijk kan worden toegeschreven aan methodologische aspecten en/of begeleidende stoffen.

Wat de methodologische aspecten betreft is er bij de mondelinge bespreking van het voorstel, voordat het project toegekend was, al gewezen op de mogelijkheid dat het wel eens moeilijk zou kunnen zijn om gronden te vinden waar PAK de enig mogelijke stressfactor zou kunnen zijn. Zoals onder 3.1 (en 5.1) al is aangegeven "bleek de verwachting, dat vanuit het consortium voldoende partijen grond verzameld konden worden, niet te kunnen worden gerealiseerd". De gronden die vervolgens werden geanalyseerd, in de verwachting dat als PAK's een dominant effect zouden hebben dit met multivariate technieken tot uiting zou kunnen worden gebracht, verschilden nogal in fysisch/chemische parameters. Dit had tot gevolg dat het effect van PAK's, voor zover dit invloed heeft op de nematodenfauna en gecorreleerd is met de CP-inschaling, overschaduwde werd door andere factoren, althans op het concentratieniveau zoals aanwezig in de bemonsterde gronden. Uit tabel 10 en 11 blijkt dat bij middeling van grote series monsters zowel Pb-equivalent als PAK's enige invloed hebben op de MI(2-5) en tevens de microbiële activiteit verhogen. Voor zware metalen is het effect op de MI(2-5) al overduidelijk aangetoond; het geringe effect van PAK's op de MI(2-5) wordt geweten aan het niet-beschikbaar zijn en aan begeleidende verontreinigingen, als olie en bemesting, waarvan de concentraties gecorreleerd zijn met de PAK-concentratie. De verhoging van de microbiële activiteit met toenemende PAK-concentratie (toename CP-1) kan worden verklaard door de hogere olieconcentraties, waarbij de gemakkelijk afbreekbare componenten resulteren in een toegenomen microbiële activiteit.

Door Bongers et al. [1989] is in het kader van VROM-project (BWS/Bo/82-6) een ontwerp gemaakt voor een ecologische typologie van bodems met als uiteindelijk doel om een referentiesysteem te ontwikkelen. Hiertoe werden een groot aantal natuurlijke habitats bemonsterd, de nematodenfauna werd geanalyseerd en er werden een tiental abiotische parameters bepaald. Het bleek dat er een aantal ecologische typen konden worden onderscheiden, gebaseerd op de nematodenfauna, die gecorreleerd bleken met bodem- en vegetatiekarakteristieken. Belangrijke parameters, die de samenstelling van de nematodengemeenschap bepaalden, waren textuur, pH, nutriëntengehalte en vegetatie. Dit onderzoek wees ook uit dat CP-1 onder stabiele omstandigheden slechts een fractie uitmaakt (< 5 %) van de hele populatie. Een blik op bijlage A (samenvattingstabel van analyses van PAK-gronden) geeft een totaal ander beeld; in de GrH-

monsters ligt het gemiddeld aantal enrichment opportunisten (CP-1) tussen de 20 en 30 %, bij de SIH-monsters ligt dit met 6 % aanmerkelijk lager. Dit duidt erop dat de GrH-monsters, in tegenstelling tot de SIH-monsters, ofwel zwaar bemest zijn of dat de grondmonsters niet koel bewaard zijn na bemonstering (een verstoring van de grond resulteert in verhoogde microbiële activiteit die geremd wordt door het monster bij 4 graden te bewaren).

Om de geanalyseerde gronden te kunnen vergelijken zijn de analyses naast de bestanden gelegd van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit van het RIVM (via, en met dank aan, drs. A. Schouten). Deze graslandgronden op veen en klei werden echter zwaar bemest, op een andere wijze bemonsterd, de nematoden op een andere wijze geïsoleerd en geanalyseerd. Dit verklaart het verschil in aantal taxa. Het percentage CP-1 is een indicatie voor verrijking en dient buitengesloten te worden voor het berekenen van de MI(2-5). Indien bij voorbaat 150 nematoden worden geïdentificeerd en het percentage CP-1 is hoog, dan wordt de MI(2-5) gebaseerd op minder individuen dan bij een laag CP-1-gehalte. Dit verklaart, naast het verschil in analyseniveau en eventueel meetellen van 'dauerlarven', de verschillen in het aantal taxa tussen de PAK-gronden en de RIVM-gronden. Enrichment resulteert niet alleen in een toename van CP-1 maar, met een vertraging, ook in een toename van CP-2 [Ettema en Bongers, 1993]. Dit houdt in dat de MI(2-5) in verrijkte gronden bij gelijk verontreinigingsniveau lager ligt dan in niet-verrijkte gronden!

De ontwikkelingen betreffende de verdere ontwikkeling van de nematodenfauna als indicator hebben sinds de initiatie van dit project niet stilgestaan (> 50 publicaties, zie [www.spg.wau/nema/MI\\_Lit.htm](http://www.spg.wau/nema/MI_Lit.htm)) en zal voorlopig ook nog doorgaan. Om optimaal gebruik te kunnen maken van recente en komende ontwikkelingen, en om de voorlopersfunctie van Nederland op dit gebied te behouden, is een meer intensief overleg tussen kennisontwikkelaar(s) en gebruiker noodzakelijk.

## 5.5 Beschrijving van een generieke methodiek

Om tot een generieke methodiek, als beleidsinstrument, te komen moet allereerst worden geaccepteerd dat nematoden de juiste biomonitors zijn van het bodemmilieu. Hiervan zijn we meer overtuigd dan voor de aanvang van het project en de argumenten zoals genoemd in hoofdstuk 2 blijven dit ondersteunen.

Voor het hanteerbaar maken van het instrument moet gebruik worden gemaakt van het nematodenanalyseschema (zie fig. 9).

Bij het opstellen van het plan om de bodemkwaliteit te definiëren is vooral aan de Maturity Index als uiteindelijk criterium gedacht. Na het analyseren van circa 190 gronden is de mening dat bij de criteria voor wel of niet verontreinigd, voor wel of geen stress, ook het totale aantal nematoden, de taxonomische verscheidenheid en de indeling naar de CP-waarden en de trofische groepen betrokken moeten worden.

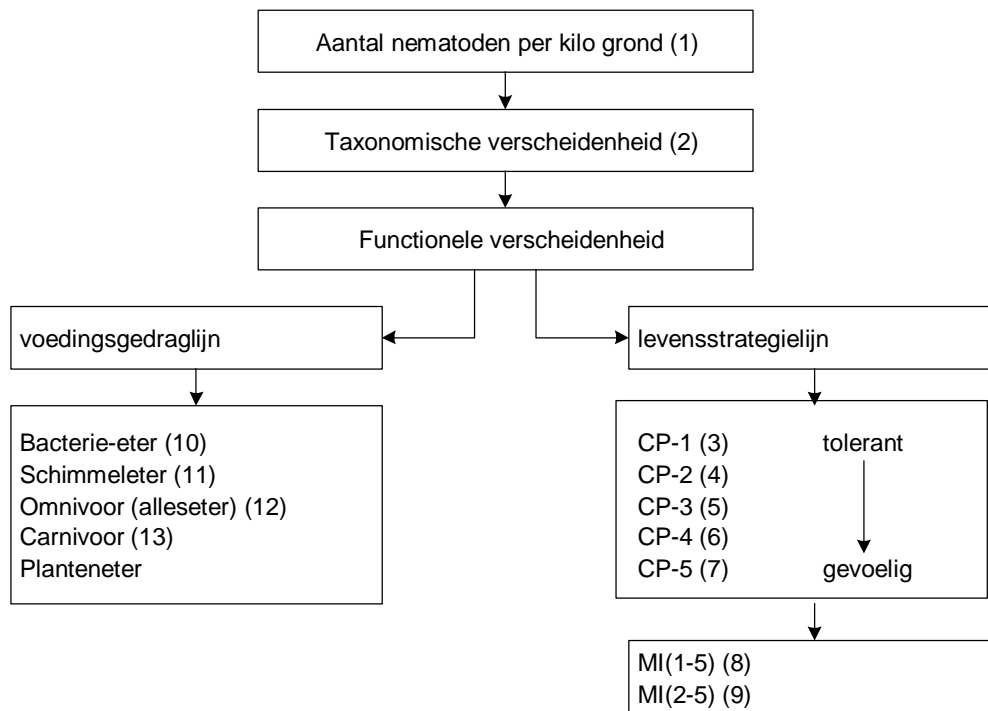


Fig. 9. Analyseschema van nematoden, opgesplitst in 13 karakteristieken/criteria.

De 13 criteria kunnen worden 'gedestilleerd' uit de nematodentelling en -classificatie van 'Oosterbeek' die slechts circa  $f$  400,- kost. Na herindelen volgens de 13 criteria, zoals in figuur 9 is weergegeven, kan de bodemkwaliteitsspecialist een uitspraak doen over de Biologische Bodemkwaliteit, mits onder meer voedingslijn en levensstrategielijn worden gecombineerd (zie fig. 10).

Op basis van de 190 geanalyseerde gronden zou voorgesteld kunnen worden dat de voorlopige hoekstenen voor het instrument Bodemkwaliteit zijn het aantal nematoden per kilo grond (**Z**), het aantal taxonomische groepen (**Y**) en de verdeling van de taxonomische groepen over de CP-waarden, resulterend in MI-waarden (**X1** en **X2**). Daarbij kan als exacte criteria voorgesteld worden: **5.000 voor Z, 18 voor Y en 2,3 voor X2**. In concreto betekent dit dat een grond ecologisch gezond is als zij 5.000 nematoden per kilo bevat, bestaande uit minimaal 18 taxonomische groepen, leidend tot een Maturity Index (2-5) van 2,3 of meer. Dus als aan deze minimale eis (5.000/18;2,3) niet is voldaan, is er kwalitatief iets mis in die bodem en is nader onderzoek nodig. Met deze nogal simplistische voorzet van een generiek instrument (**Z/Y;X2**) willen we niet het bodemecosysteem reduceren tot drie getallen. Het is een praktisch gerichte voorzet, waarachter alle nuances bekeken dienen te zijn.

De basis om te oordelen is dus het aantal nematoden per monster, uitgedrukt in volume (inclusief dauerlarven!), en de taxa-analyse, absoluut en in percentage op basis van totaal minus dauerlarven, resulterend in figuur 10; afhankelijk van het doel van het onderzoek kan de analyse worden beperkt of uitgebreid.



	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5	totaal in %
Plantenparasieten		xx	xx	xx	xx	pl %
Bacterie-etters	xx	xx	xx	xx	xx	ba %
Schimmeleters		xx	xx	xx	xx	fu %
Omnivoren			xx	xx	xx	om %
Carnivoren			xx	xx	xx	ca %
	$\Sigma\%CP-1$	$\Sigma\%CP-2$	$\Sigma\%CP-3$	$\Sigma\%CP-4$	$\Sigma\%CP-5$	(100 %)

Fig. 10. Identificatiediagram op basis van voedingspatroon en levensstrategie.

Is men uitsluitend geïnteresseerd in stress dan is het niet nodig om de plantenparasieten uit te splitsen. Is men geïnteresseerd in 'biodiversiteit' dan dient het aantal taxa, en bijvoorbeeld het aantal bacterie-etters in de CP-2 groep (Ba2), zeer nauwkeurig te worden bepaald. Is men geïnteresseerd in vooral de MI(2-5) dan dient die gebaseerd te zijn op identificatie van een bepaald aantal nematoden, bijvoorbeeld 100 (dus exclusief CP-1, plantenparasieten en dauerlarven). Mogelijk kan dit aantal in de toekomst worden gereduceerd, maar daar is verder onderzoek naar nodig. Op basis van de analyse, zoals is weergegeven in figuur 9, en het identificatiediagram (zie fig. 10) kunnen een groot aantal ecosysteemparameters worden berekend.

#### 5.6 Hoe mogelijk verder

Behalve de norm 5.000/18;2,3 worden meer mogelijkheden gezien om biologisch te karakteriseren. De ecologische informatie, die de taxonomische verscheidenheid combineert met de levensstrategie-indeling (de CP-groepen), kan ook letterlijk in beeld worden gebracht via een CP-vijfhoek. Een grafische presentatie vergemakkelijkt de interpretatie. Dit is analoog aan de CP-driehoek van De Goede [1993].

De Goede werkte met een driehoek waarin de CP-3, CP-4 en CP-5 groepen als één CP-3-5 groep en als één zijde van de driehoek gold, naast de CP-1 en de CP-2 als de twee andere zijden. De Goede drukte het geheel uit in percentages. Het verschuiven van de nematodenpopulatie naar meer CP-3-5 groepen (hoger percentage) wordt zo simpel zichtbaar. In CP-driehoeken wordt met percentages gewerkt en de CP-3-5 groepen worden samengevoegd, waardoor het gevoel voor ecologische diversiteit te grof wordt weergegeven. In figuur 11 is de klassieke CP-driehoek weergegeven naast de door ons voorgestelde CP-vijfhoek.

De CP-vijfhoek geeft op elke CP-as weer hoeveel taxonomische groepen er zijn van die bepaalde CP-karakteristiek, terwijl de lengte van de 'balk' een indicatie is voor het aantal individuen in deze specifieke soort. Het is een soort 'fingerprint', een soort amoëbe. Ook aan het beeld van de amoëbe zou direct te zien moeten zijn wat de gezondheidsstatus van de grond is. Door het in de tijd vergelijken van dezelfde grond op basis van de CP-vijfhoek is te zien hoe de kwaliteit bijvoorbeeld verbeterd is. In het kader van actief bodembeheer zou dit een goede 'meetlat' kunnen zijn. Ook biologische waterkwaliteit wordt wel gekarakteriseerd volgens een 'amoëbe-benadering'.

Het abstracte idee van de vijfhoek is niet nieuw. Daar er in Nederland diverse databestanden zijn van bodemnematoden zou het beschouwen van die bestanden volgens de CP-vijfhoek een breed ecologisch inzichtelijk overzicht geven van de huidige kwaliteit van de bovenste 30 cm van de Nederlandse bodem.

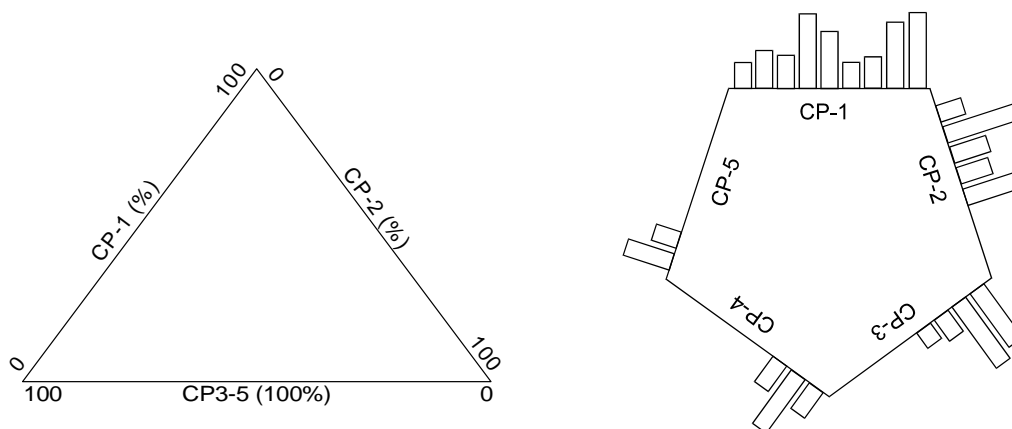


Fig. 11. De CP-driehoek naast de CP-vijfhoek.

## 5.7 En hoe verder met de fundamentele aspecten

### *Standaardisatietechnieken*

Eén van de zaken die geleerd zijn van het huidige project is dat, om analyseresultaten te mogen vergelijken, deze resultaten via een identieke methode verkregen moeten zijn. In het huidige project is de bodemlaag van 5 - 15 cm bemonsterd (zie 3.3), daarom zijn de resultaten moeilijk vergelijkbaar met monsters van de bovenste 10 cm, zoals ook wordt gedaan, waarbij de heterogeniteit hoger is. Dit komt omdat zich aan de oppervlakte groenalgen ontwikkelen waarmee dorylaimieden (CP-4 en CP-5) zich voeden. Ook moet aandacht worden besteed aan de extractiemethode, omdat de duur van de extractie (verblijf op filter) positief gecorreleerd is met de hoogte van de MI.

### *Betrouwbaarheid*

Een aspect dat aandacht verdient is de betrouwbaarheid van de parameters. Stel dat in monster A 30 % bacterie-etters gevonden worden en in monster B 40 %, verschillen deze dan significant? Hetzelfde geldt voor de andere ecosysteemp parameters. Er zijn plannen om binnen het SKB-kader aandacht te schenken aan de betrouwbaarheid en standaardisatie.

### *Referentiesysteem*

Eén van de grootste uitdagingen ligt in de ontwikkeling van een referentiesysteem. In tijdreeksen kan het monster van tijdstip  $T = 0$  als referentie worden gebruikt om de richting van veranderingen aan te tonen. Ook in proefvelden en experimenten kan de proefopzet zodanig worden gekozen dat de bodems vergelijkbaar zijn met slechts een enkele variabele. Er zijn in Europa duizenden monsters geanalyseerd. In een recent overzicht van Europese graslanden [De Goede en Bongers, 1998] zijn 1.400 monsteranalyses toegankelijk gemaakt die momenteel in bewerking zijn om tot een referentie te komen. De bossen zijn reeds relatief goed uitgewerkt door Bongers et al. [1989] en De Goede en Bongers [1994]. Deze analyses maken het mogelijk om in relatief extreme gevallen al te voorspellen of er iets met de bodem aan de hand is en zo ja, wat er aan de hand is. Het is een uitdaging om dit systeem te verfijnen, hoewel niet bij voorbaat vaststaat dat er duidelijk typen te onderscheiden zijn van soorten die gemeenschappelijk voorkomen; deze vraag is in de vegetatiekunde al decennia onderwerp van discussie en ook daar kan de vraag niet beantwoord worden hoeveel planten er op een gezonde bodem staan, de bedekking en de diversiteit.

### *Screening van stoffen*

Het vaststellen van de stressoren zou kunnen via de TIE-benadering (Toxicity Identification Extraction) en gevolgd door gerichte dosiseffectexperimenten

### *Identificatieniveau*

De huidige interpretatie van nematodengemeenschappen vindt plaats op familieniveau, enerzijds uit efficiëntieoverwegingen, anderzijds uit noodzaak bij gebrek aan up to date identificatietabellen. Vanuit natuurbehoudsstandpunt zou een analyse op soortniveau mogelijk extra informatie kunnen leveren.

## LITERATUUR

Alderberg, T. en W. Slob, 1993.

Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data.

Ecotoxicol. Environ. Safety 25: 48-64.

Alkemade, J.R.M. en M.L.P. Esbroek, 1994.

Towards a effect-prediction model for soilfauna: BOEF.

RIVM report 712901001.

Bongers, A.M.T., R.G.M. Kappers en R. Manger, 1989.

Ecologische typologie van de Nederlandse bodem op basis van vrijlevende nematodenfauna.

RIVM-rapport 718602002.

Bongers, A.M.T., 1990.

The Maturity Index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition.

Oecologia 83: 14-19.

Bongers, A.M.T. en M. Bongers, 1998.

Functional diversity of nematodes.

Applied Soil Ecology 318: 1-13.

Coleman, D.C., P.F. Hendrix en E.P. Odum, 1998.

Ecosystem health: an overview.

Soil chemistry and ecosystem health. Spec. publication no 52: 1-20.

Commission of the European Communities, 1992.

Council regulation on the evaluation and control of the environmental risk of existing substances.

European Communities, Brussel, België.

Corbisier, P., E. Thiry en L. Diels, 1996.

Bacterial biosensors for the toxicity assessment of solid wastes.

Env. Toxicol. Water Quality 11: 171-177.

Doelman, P. en M. Elbers, 1989.

Studie naar mogelijke effecten op flora en fauna als gevolg van de inrichting van de Noordpunt Oost-Abtspolder als definitieve opslagplaats voor verontreinigde grond.

RIN-rapport 90/11.

Doelman, P., G. Nieboer, J. Schrooten en M. Visser, 1984.

Antagonistic and synergistic toxic effects of Pb and Cd in a simple foodchain: nematodes feeding on bacteria or fungi.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32: 717-723.

EPA, 1994.

Technical protocol for evaluation natural attenuation.

Air Force Center for environmental excellence; Technology Transfer Division, San Antonio, Texas.

EPA, 1996.

Aquatic toxicity Information Retrieval database (AQUIRE), version 1996.  
US-EPA Environmental Research Laboratory-Duluth Scientific Outreach Program, Duluth, MN,  
USA.

Ettema, C.H. en A.M.T. Bongers, 1993.  
Colonization and nematode succession in fumigated and manured soils.  
Biol. Fertil. Soils 12: 71-85.

Gestel, C.A.M. van en W.C. Ma, 1988.  
Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bio-availability in soil.  
Ecotoxicol Environ. Safety 15: 289-297.

Gezondheidsraad, 1996.  
Risico, meer dan een getal.  
Den Haag, Gezondheidsraad publicatienr. 1996/03.

Goede, R.G.M. de, 1993.  
Terrestrial nematodes in a changing environment.  
Ph-D thesis Universiteit Wageningen, ISBN 90-5485-130-9.

Goede, R.G.M. de en A.M.T. Bongers, 1994.  
Nematode community structure in relation to soil and vegetation characteristics.  
Appl. Soil Ecology 1: 29-44.

Goede, R.G.M. de en A.M.T. Bongers, 1998.  
Nematode communities of northern temperate grass land ecosystems.  
Focus, Verlaag en Giessen.

Gould, J.S., 1991.  
Wonderful life.  
Penguin Books.

Hund, K. en W. Traunspurger, 1994.  
ECOTOX - evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PH-contaminated site.  
Chemosphere 29 (2): 371-390.

Hyvönen, R. en T. Persson, 1990.  
Effects of acidification and liming on feeding groups of nematodes in coniferous forest soils.  
Biol. Fertil. Soils 9: 205-210.

Jongman, R.H.G., C.J.F. Ter Braak en O.F.R. van Tongeren, 1987.  
Data analysis and landscape ecology.

Kalf, D.F., G.H. Crommentuijn, Posthumus en E.J. van de Plassche, 1995.  
Integrated environmental quality objectives for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs).  
RIVM report no. 679101018.

Kappers, F.I. en J.A.A.M. Wondergem-van Eyk, 1988.  
Effects of chlorophenols on soil mesofauna.  
In: A.A. Orio (ed.), Environmental Contaminating CEP, Consultance LTd, Edinburgh: 217-219.

Kirk, T.K. en R.L. Farrell, 1987.

Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignine.  
Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

Kooijman, S.A.L.M., 1987.  
A safety factor for LC 50 values allowing for differences in sensitivity among species.  
Water Res. Research 21: 269-276.

Korthals, G.W., A.D. Alexiev, Th.M. Lexmond, J.E. Kammenga en A.M.T. Bongers, 1996b.  
Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem.  
Environ. Tox. and Chem. 15 (6): 979-985.

Korthals, G.W., 1997.  
Pollutant-induced changes in terrestrial nematode communities.  
Ph-D thesis Universiteit Wageningen, ISBN 90-5485-720-x.

Leeuwen, K. van, 1990.  
Ecotoxicological effects assessment in the Netherlands: recent developments.  
Environ. Management 14: 779-792.

Lelie, D. van der, L. Regniers, B. Borremans, A. Provoost en L. Verschaeve, 1997.  
The vitotox-test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure geno-toxicity kinetics.  
Mutation Research 389: 279-290.

Neilsson, A.H. et al., 1998.  
PAHs and related compounds - Biology.  
The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3, Anthropogenic Compounds Part J, 386 pp.

NOVEM, 1998.  
Ecological recovery of landfarming.

Renner, R., 1996.  
Ecological risk assessment struggles to define itself: practioners are debating how to turn this young field into a rigorous discipline.  
Environ. Sci. Technology 30: 172-174.

RIVM, 1997.  
Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit: Nematodenfauna. Deel 4: Bemonstering 1995 (melkveehouderijbedrijven op veen).  
RIVM-rapport 714801016 (M.L.P. Esbroek en A. Schouten).

RIVM, 1999.  
Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit: Nematodenfauna. Deel 6: Bemonstering 1996 en 1997 (melkveehouderijbedrijven op rivierklei, zeeklei en tuinbouwbedrijven).  
RIVM-rapport 714801025 (M.L.P. Esbroek en A. Schouten).

Ruiter, P.C. de, A.M. Neutel en J.C. Moore, 1995.  
Modelling food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems.  
Trends in Ecological Evolution 9: 377-383.

s'Jacob, J.J. en J van Bezooijen, 1984.

A manual for practical work in nematology.  
Landbouw Universiteit Wageningen, 77 pp.

Smith, E.P. en J. Cairns, 1993.

Extrapolation methods for setting ecological standards for water quality: statistical and ecological concerns.

Ecotoxicology 2: 203-219.

Straalen, N.M. van en G.A.J. Denneman, 1989.

Ecological evaluation of soil quality criteria.

Ecotoxicol. Environ. Safety 18: 241-251.

*Geraadpleegde literatuur*

Bongers, A.M.T. en H. Ferris, 1999.

Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring.

Trends in Ecology. In press.

IWACO, 1998.

Alternative remediation option, location Kollum.

Korthals, G.W., R.G.M. de Goede, J.E. Kammenga en A.M.T. Bongers, 1996a.

The maturity index as an instrument for risk assessment of soil pollution.

In: N.M. van Straalen en D.A. Krivolutsky (eds.), Bioindicator systems for soil pollution, Kluwer: 85-93.

BIJLAGE A

**SAMENVATTINGSTABEL VAN ANALYSES VAN PAK-GRONDEN**



BIJLAGE B

**NEMATODENTELLINGEN**

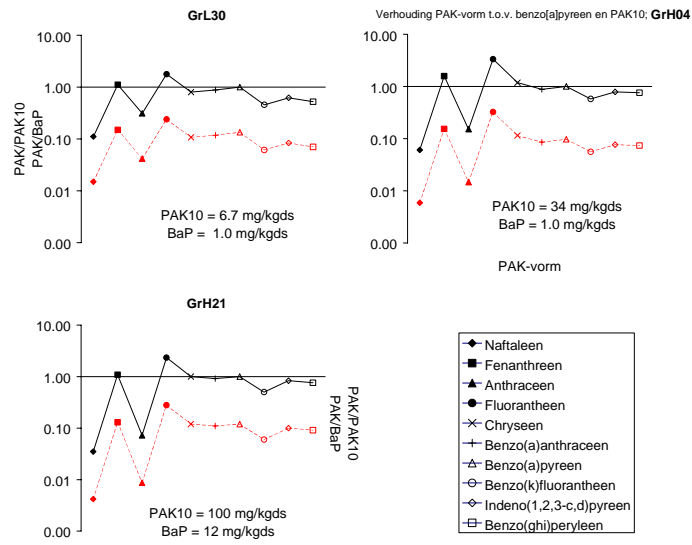
BIJLAGE C

**RESULTATEN VAN EXTRA ANALYSE**

BIJLAGE D

**VERHOUDING VAN INDIVIDUELE PAK'S**

Van drie gronden de verhouding van de individuele PAK's ten aanzien van benzo(a)pyreen en de som PAK 10.



BIJLAGE E

**BASISGEGEVENS VAN GRASLAND OP VEEN**

BIJLAGE F

**BASISGEGEVENS VAN GRASLAND OP KLEI**