

NOBIS 96-1-13
EFFECTIVITEIT VAN BIOASSAYS BIJ
HET MONITOREN EN BEOORDELEN
VAN HET MILIEURENDEMENT VAN IN-
SITU BIORESTAURATIE

Eindrapportage

drs. J.J. van der Waarde (Bioclear BV)
ir. J.G.M. Derksen (AquaSense)
Dr. E.E. van der Hoek (KEMA)
Drs. B. Muijs (Witteveen + Bos)

maart 2001

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, "©"Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie - Eindrapportage", maart 2001, 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, "©" The use of bioassays in monitoring and assessing the environmental efficiency of in-situ bioremediation", March 2001, 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

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie

Eindrapportage

CUR/NOBIS rapportnummer

96-1-13

Project rapportnummer

96-1-13

Auteur(s)

drs. J.J. van der Waarde
ir. J.G.M. Derksen
dr. E.E. van der Hoek
drs. B. Muijs

Aantal bladzijden

Rapport: 37
Bijlagen: 0

Uitvoerende organisatie(s) (Consortium)

Bioclear BV (drs. J.J. van der Waarde)
AquaSense (ir. J.G.M. Derksen)
KEMA (dr. E.E. van der Hoek)
Witteveen + Bos (drs. B. Muijs)
Vrije Universiteit Amsterdam
Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam
Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen

Uitgever

CUR/NOBIS, Gouda

Samenvatting

In NOBIS kader is een haalbaarheidsstudie uitgevoerd naar de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Op basis van een literatuurstudie is een methode voor bereiding van waterig extract geselecteerd zijn acute (7) en chronische bioassays (4) getest. In veldmonsters van een met olie verontreinigd industrieterrein bleken de meeste acute bioassays niet te voldoen omdat ze ongeacht het verontreinigingsniveau een zeer sterke of helemaal geen respons gaven. Alleen de acute bioassays Microtox en Daphnia en verder alle geteste chronische bioassays (sla, regenworm, springstaart, Bait lamina) lieten negatieve effecten zien die toe te schrijven zijn aan de aanwezige verontreinigingen. Biologische sanering van de grond in kolomproeven resulteerde in een afname in verontreiniging en volledig verdwijnen van toxische effecten in de geselecteerde bioassays. Dit betekent dat bioassays geschikt zijn om de ecotoxicologische effecten van bodemverontreinigingen te monitoren en als indicator voor bodemkwaliteit te dienen.

Trefwoorden**Gecontroleerde termen:**

biologische afbraak, biomonitoring, ecotoxicologie, olie, toxische effecten

Vrije trefwoorden:

bioassay, biosparging, bioventing, ecotoets

Titel project

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie

Projectleiding

Bioclear BV
drs. J.J. van der Waarde
tel. 050-571845

Dit rapport is verkrijgbaar bij:

CUR/NOBIS, Postbus 420, 2800 AK Gouda

Report title

The use of bioassays in monitoring and assessing the environmental efficiency of in-situ bioremediation

CUR/NOBIS report number

96-1-13

Final report

Project report number

96-1-13

Author(s)

drs. J.J. van der Waarde
ir. J.G.M. Derksen
dr. E.E. van der Hoek
drs. B. Muijs

Number of pages

Report: 37
Appendices: 0

Executive organisation(s) (Consortium)

Bioclear BV (drs. J.J. van der Waarde)
AquaSense (ir. J.G.M. Derksen)
KEMA (dr. E.E. van der Hoek)
Witteveen + Bos (dr. B. Muijs)
Vrije Universiteit Amsterdam
Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam
Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen

Publisher

CUR/NOBIS, Gouda

Abstract

A feasibility study was performed in the NOBIS framework to the use of bioassays to monitor toxic effects of soil contaminants. Based on literature study a method for the preparation of water extracts and acute (7) and chronic bioassays (4) was selected. Tests with environmental samples from an industrial site contaminated with oil showed that most acute bioassays showed maximum or no low toxicity levels, regardless of the contaminant levels. Only the acute bioassays Microtox and Daphnia and all the tested chronic bioassays (lettuce, worm, springtail, Bait lamina) showed negative effects that could be explained with the contaminants present in the samples. Biological remediation of the soil in column tests showed a decrease in contaminant levels and a complete disappearance of toxic effects in selected bioassays. This showed that bioassays are suitable to determine the ecotoxicological effects of soil contamination and can serve as indicators of soil quality.

Keywords**Controlled terms:**

biodegradation, biomonitoring, ecotoxicology, oil, toxic effects

Uncontrolled terms

bioassay, biosparging, bioventing, ecotoxicity test

Project title

The use of bioassays in monitoring and assessing the environmental efficiency of in-situ bioremediation

Projectmanagement

Bioclear BV
drs. J.J. van der Waarde
tel. 050-571845

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 project is tot stand gekomen met de medewerking van een groot aantal personen. Een aantal van hen willen wij speciaal noemen. De stagiairs Sandra Bouwens en Ben Rusch hebben onder begeleiding van Kees van Gestel de chronische bioassays in het project uitgevoerd en daarmee een zeer belangrijke bijdrage geleverd aan de conclusies in dit rapport: dank jullie wel.

De leden van de begeleidingscommissie, Kees van de Guchte, Peter van Mullekom, Frits Keuning, Carl Denneman, Peter Doelman, Ragna Kroes, Michiel Rutgers, Trudie Crommentuijn en Angeline Heijna danken wij voor de tijd, energie en belangstelling die zij het project hebben gegeven om de wetenschappelijke en maatschappelijke waarde van het project te waarborgen.

maart 2001

INHOUD

		SAMENVATTING	V
		SUMMARY	VI
Hoofdstuk	1	INLEIDING	1
Hoofdstuk	2	OPBOUW VAN HET PROJECT	5
Hoofdstuk	3	RESULTATEN	7
	3.1	Literatuurstudie	7
	3.2	Veldscreening	10
	3.3	Biorestatatieproeven	16
	3.4	Risicobeoordeling en evaluatie	19
	3.5	Pilotproef	20
	3.6	Conclusies proefsanering	20
Hoofdstuk	4	DISCUSSIE	22
Hoofdstuk	5	CONCLUSIES	26
		LITERATUUR	27

SAMENVATTING

Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie

In het kader van NOBIS wordt een haalbaarheidsstudie op de locatie Petroleumhavenweg te Amsterdam uitgevoerd naar de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Dit onderzoek sluit aan bij de NOBIS doelstelling om een betere onderbouwing te geven aan het bepalen van risico's van bodemverontreiniging.

Op basis van een literatuurstudie zijn bioassays geselecteerd voor toepassing in verontreinigde bodems. Acute bioassays worden uitgevoerd op waterige extracten van de grond en zijn vaak afgeleid van toetsen voor de beoordeling van (afval)water. Voor deze testen is een extractiemethode geselecteerd en getest. Chronische bioassays worden uitgevoerd in de grond en maken gebruik van organismen die van nature voorkomen in grond. Chronische testen duren langer maar zijn vaak gevoeliger.

De bioassays zijn toegepast in een veldscreening op de locatie Petroleumhaven in Amsterdam die is verontreinigd met minerale olie. Enkele acute bioassays bleken niet te voldoen omdat ze in alle monsters sterk negatieve effecten of juist helemaal geen effecten aantoonde, terwijl een duidelijke variatie in verontreinigingsniveau's aanwezig was. De Microtox bioassay en de Daphnia toets leverden resultaten die goed verklaard konden worden met de gevonden verontreinigingsniveau's. De acute algenbioassay is eveneens geselecteerd als vertegenwoordiger van primaire producenten (planten). Ook de chronische bioassays lieten negatieve effecten zien die toe te schrijven zijn aan de aanwezige verontreinigingen. Dit betekent dat deze bioassays geschikt zijn om de ecotoxicologische effecten van bodemverontreinigingen te monitoren en als indicator voor bodemkwaliteit kunnen dienen.

In de laatste fase van het project is verontreinigde grond van de locatie middels bioventing gereinigd in kolomproeven in het laboratorium. Deze biologische sanering leidde tot biologische verwijdering van de olieverontreiniging maar een restfractie van 300-700 mg/kg bleek persistent. Monitoring gedurende de proef met bioassays liet zien dat biologische sanering leidde tot een snelle en volledige afname van negatieve effecten van de verontreiniging. De restfractie die overbleef na sanering is niet of slecht biologisch beschikbaar en veroorzaakt geen actuele ecotoxicologische effecten. Hoewel deze restfractie rond de tussen- en interventiewaarde ligt zijn de actuele risico's van deze restfractie acceptabel gezien de slechte biologische beschikbaarheid en afwezigheid van toxische effecten. Dit betekent dat de grond op de locatie Petroleumhaven in principe goed kan worden gereinigd middels in-situ biorestauratie en dat deze sanering leidt tot een niet-toxische restfractie. Volgend op deze sanering is een vorm van actief bodembeheer gewenst om verdere afbraak van deze restfractie mogelijk te maken en eventuele toekomstige risico's van deze verontreiniging te voorkomen.

Bioassays zijn een geschikt instrument gebleken voor het monitoren van in-situ biorestauratie en geschikt voor het bepalen van het milieurendement van in-situ biorestauratie en daarmee is de belangrijkste doelstelling van dit project behaald.

In een tweetal vervolgprojecten is inmiddels gestart met de implementatie van de resultaten van dit project. De haalbaarheid van in-situ biorestauratie op de locatie Petroleumhaven is bepaald in een pilotsanering op locatie. Het milieurendement van deze pilotsanering wordt eveneens gemonitord middels bioassays in het NOBIS TRIADE project.

SUMMARY

The use of bioassays in monitoring and assessing the environmental efficiency of in situ bioremediation

Within the framework of the NOBIS research programme, a feasibility study to the use of bioassays in monitoring and assessing the environmental efficiency of in situ bioremediation was performed on the Petroleumharbour site in Amsterdam. This research fits in the NOBIS goal of improving risk assessment of soil pollution.

Based on literature study bioassays applicable to polluted soil have been selected. Acute bioassays are performed on aqueous soil extracts and are derived from (waste)water assessment tests. Methods for the preparation of these extracts have been selected and tested. Chronic bioassays are performed in soil with organisms that live in soil. Chronic tests last longer but are often more sensitive than acute tests.

The bioassays are performed on a field screening on the Petroleum harbour site in Amsterdam, which is polluted with mineral oil. Some of the acute bioassays were not sufficient because regardless of the contaminant concentration only strong negative effects or no negative effects at all were found. The results of the Microtox test and the Daphnia test did correlate fairly well with the reported contaminant levels.

The acute algal test was also selected as a representative of primary producers.

Results of chronic bioassays also correlated fairly well with contaminant levels. This means that these bioassays are suitable for monitoring ecotoxicological effects of soil pollution and can be used as indicators of soil quality.

In the last phase of the project polluted soil has been remediated by means of bioventing on laboratory scale. This bioremediation led to a significant reduction of the oil pollution. However, 300 – 700 mg/kg mineral oil appeared to be persistent. Monitoring during the test by means of bioassays showed that bioremediation reduced the negative effects of the oil pollution. The remaining pollution after remediation caused no ecotoxicological effects in the bioassays and therefore is hardly bioavailable. Although the concentration of the remaining pollution is somewhere around the Dutch Intervention Level, the risks are acceptable due to reduced bioavailability and the absence of toxic effects.

This means that soil on the Petroleum harbour site can be remediated by means of in situ bioremediation, which leads to a non-toxic residual fraction. Following to this remediation active soil management can stimulate further remediation of the remaining concentration and prevent possible future risks of the pollution.

Bioassays appeared to be suitable tools for monitoring in situ bioremediation and the assessment of the environmental efficiency of in situ bioremediation. This means that the most important goal of this project has been reached.

In two follow-up projects the results of this project are already being used. The efficiency of in situ bioremediation on the Petroleum harbour site has been determined in an on-site pilot remediation. The efficiency of this remediation is being monitored by means of bioassays in the NOBIS TRIAD project.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

Algemene inleiding

Bij bodemsanering ontstaat steeds meer behoefte aan locatiegerichte prognoses van actuele risico's die voortvloeien uit de aanwezigheid van verontreinigende stoffen in de bodem. Chemische analyses geven op een indirecte wijze inzicht in de (potentiële) risico's. Als zodanig vormen chemische analyses een eerste lijnbenadering. Met behulp van biologische analyses (bioassays) kunnen wel directe waarnemingen over actuele risico's worden verkregen. Met name bij in-situ biologische bodemsanering vormen biologische analyses het gereedschap om de effectiviteit van het proces en het restrisico van het eindproduct te beoordelen.

Door het Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS) het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam (GHA) en de Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen (SBNS), is aan Bioclear b.v., KEMA Nederland b.v., Witteveen+Bos b.v. en de Vrije Universiteit Amsterdam opdracht verleend om de haalbaarheid te onderzoeken van het gebruik van bioassays bij het bepalen van actuele ecotoxiciteitsrisico's van verontreinigde grond voor, tijdens en na biologische in-situ sanering.

Dit onderzoek dient antwoord te geven op de volgende vragen:

1. Wat is het (eco)toxicologische risico van verontreinigde grond voorafgaande aan een sanering?
2. Kan het blootstellings- en verspreidingsrisico tijdens een sanering mede worden gebaseerd op een meetbare toxiciteit?
3. Wat is het (eco)toxicologische eindresultaat van een (in-situ) sanering?

Het onderzoek wordt gekoppeld aan de biologische sanering van een met minerale oliën verontreinigde locatie aan de Petroleumhavenweg te Amsterdam, die onder de verantwoordelijkheid valt van het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam. Op deze locatie is behoefte aan aanvullende informatie over actuele milieurisico's van de verontreiniging en van de restverontreiniging na een biologische sanering. Deze locatie is door op- en overslagactiviteiten over een periode van meer dan 100 jaar verontreinigd met diverse minerale oliën tot een diepte van circa 4 m-mv en met concentraties van gemiddeld enkele honderden tot enkele duizenden mg olie per kg ds.

Het project omvat het vooronderzoek ten aanzien van de te gebruiken methoden en technieken, de karakterisatie van toxische effecten van de bodemverontreiniging op de locatie en het toetsen van bioassays in een biorestauratieonderzoek in het laboratorium.

Probleemstelling

In Nederland is de bodem op een groot aantal plaatsen verontreinigd geraakt met organische en anorganische verbindingen. De overheid heeft zich tot doel gesteld de meest ernstige gevallen van bodemverontreiniging op te ruimen voor 2025. Aangezien het totale aantal verontreinigde locaties in Nederland erg groot is wordt onderscheid gemaakt tussen meer en minder verontreinigde locaties. Deze afweging is samengevat in de urgentiesystematiek: ernstig verontreinigde locaties die actuele risico's voor mens, ecosysteem of verspreiding opleveren, dienen als eerste te worden gesaneerd. De basis voor deze afweging is telkens een chemische analyse van het bodemmateriaal. De getallen die hiermee worden verkregen worden op verschillende manieren gebruikt om ernst en risico van de verontreiniging te bepalen. Of deze risico's daadwerkelijk aanwezig zijn en of negatieve effecten van de bodemverontreiniging op het bodemecosysteem waarneembaar zijn wordt meestal niet getoetst.

Chemische analyses hebben een aantal beperkingen bij het vaststellen van actuele risico's. In de eerste plaats is de informatie die wordt verkregen met chemische analyses beperkt tot het toegepast analysepakket. De bodem kan met veel stoffen zijn verontreinigd, maar alleen die stoffen waarvoor in het historisch onderzoek aanwijzingen zijn gevonden worden geanalyseerd. Ten tweede kunnen de actuele effecten van verontreinigingen worden beïnvloedt door de aanwezigheid van andere verontreinigingen: combinatietoxiciteit kan in de praktijk optreden zonder dat chemische analyses hiertoe inzicht geven. De belangrijkste tekortkoming van chemische analyses is echter dat de biologische beschikbaarheid en het gedrag van de verontreiniging niet wordt bepaald middels chemische analyses terwijl deze eigenschappen in belangrijke mate bepalend zijn voor het effect van de verontreiniging.

Dit is op twee momenten beperkend bij het saneren van bodems. Ten eerste verdient het de voorkeur de prioritering van saneringen mede te baseren op gemeten actuele risico's. De keuze of wordt gesaneerd en op welke wijze wordt gesaneerd zou mede gebaseerd kunnen worden op de mate waarop de verontreiniging negatieve effecten in het milieu veroorzaakt.

Ten tweede treedt bij in-situ biorestauratie vaak een persistente restfractie op, die niet of slechts zeer langzaam wordt verwijderd bij voortdurende sanering. Waarschijnlijk is deze restfractie gebonden aan grond en slecht biologisch beschikbaar. Dit zal betekenen dat deze fractie ook minder negatieve effecten kan hebben op het bodemecosysteem en dat uitspoeling en risico's van verspreiding laag zijn.

Beter inzicht in deze processen maakt het mogelijk een betere onderbouwing voor locatiespecifieke saneringsdoelstellingen te geven. Ook het toepassen van zogenaamde bodemgebruikswaarden kunnen locatiespecifieke effecten van de verontreiniging worden meegenomen in de besluitvorming. Dit kan bijdragen aan een betere acceptatie en begrip voor de gekozen saneringsvariant, doelstelling van sanering en bodembeheersplan van de locatie.

Bioassays

Door de voornoemde beperkingen van chemische analyses bij de beoordeling van het milieurendement van sanering, is er behoefte aan een aanvullend meetinstrument. Eén van deze aanvullende meetinstrumenten zijn bioassays. Bioassays zijn gestandaardiseerde laboratoriumexperimenten waarin levende testorganismen worden blootgesteld aan een milieumonster(extract) om negatieve effecten van aanwezige verontreinigingen op deze organismen te bepalen. Het doel van deze bioassay is het meten of de potentiële aanwezigheid van één of meer verontreinigingen in dit monster negatieve effecten veroorzaken bij dit organisme.

Risico-evaluatie

Indien sprake is van een zogenaamd "ernstig geval van bodemverontreiniging", dan is er sprake van een saneringsnoodzaak. De urgentie van sanering is afhankelijk van de risico's. Ten aanzien van het vaststellen van dergelijke risico's is er de zogenaamde Urgentiesystematiek ontwikkeld [Koolenbrander, 1995]. Binnen deze systematiek wordt onderscheid gemaakt tussen humane risico's, ecologische risico's en het risico van verspreiding.

De methodiek is tamelijk mathematisch van aard en kent derhalve een groot aantal rekenregels. Een belangrijke nuancering die in de methodiek is aangebracht betreft de mogelijkheid om door middel van specifiek gericht onderzoek (bijvoorbeeld het uitvoeren van metingen) een meer genuanceerde risico-inschatting te geven. Het bevoegd gezag beoordeelt de uitgevoerde risico-beoordeling en betreft het resultaat hiervan op de beschikking inzake "ernst en urgentie".

In het kader van het onderhavige project is tevens een (complete) risico-evaluatie uitgevoerd conform de Urgentiesystematiek. Hierbij zijn zowel humane als ecologische risico's bepaald gerelateerd aan de aanwezige (olie)verontreiniging. Het verspreidingsrisico is in dit project niet bepaald omdat hiervoor onvoldoende basisgegevens aanwezig zijn. Deze beoordeling is

uitgevoerd om te komen tot een vergelijking tussen de uitkomsten van de bioassays en de gangbare werkwijze om humane en ecologische risico's te bepalen.

Doelstelling van het project

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

De subdoelen van het project zijn als volgt:

1. Identificeren van geschikte, routinematig toepasbare bioassays. Criteria hierbij zijn:
 - gevoeligheid;
 - kosten;
 - ontwikkelingsstatus van de methode;
 - referentieinformatie;
 - type organismen;
 - toepasbaarheid voor bodem;
2. Identificeren van geschikte extractieprocedures voor toepassing bij bioassays. Criteria hierbij zijn:
 - herhaalbaarheid van de extractie;
 - extractieduur;
 - simulatie van werkelijke opname uit de bodem;
 - gevoeligheid van het organisme t.o.v. het extractant (pH, extractiemiddel);
 - aansluiting bij ontwikkelde en genormaliseerde uitloogtesten;
3. Geschikte deellocaties identificeren en karakteriseren waar het (vervolg)onderzoek zal worden uitgevoerd;
4. Een toxisch signaal aantonen met behulp van een of enkele bioassays op deze locaties;
5. Aantonen van een respons van bioassays op biologische activiteit en verlaagde concentratieniveaus ten gevolge van biologische sanering op laboratoriumschaal.

Het project is gefaseerd uitgevoerd. In eerste instantie is een literatuurstudie uitgevoerd met als doel een selectie te maken van geschikte bioassays en extractiemethoden voor het maken van grondextracten voor acute bioassays. Vervolgens is een veldscreening uitgevoerd op de Petroleumhaven locatie om de geselecteerde methoden te testen en een indruk te krijgen van de toxiciteit van de bodem op de locatie. Op basis hiervan is de set monitoringsinstrumenten verder beperkt. Tenslotte is biologische reiniging van grondmonsters van de locatie uitgevoerd op laboratoriumschaal en is de chemische en biologische bodemkwaliteit gevolgd met de geselecteerde set monitoringsinstrumenten. Bij de beoordeling van de biologische reiniging is ook een conventionele risicoanalyse uitgevoerd en vergeleken met aanvullende informatie afkomstig van bioassays. Op basis van dit onderzoek is de effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie bepaald.

Leeswijzer

Hoofdstuk 2 beschrijft de opbouw en uitvoering van het project. In hoofdstuk 3 worden de resultaten van de literatuurstudie naar bioassays en extractiemethoden, de resultaten van de veldscreening en van de kolomproeven beschreven. Tevens wordt in dit hoofdstuk de uitgevoerde risico-evaluatie besproken. In hoofdstuk 4 worden de resultaten bediscussieerd en relaties ge-

legt tussen de uitkomsten van de bioassays en de risico's bij aanvang en na afloop van het saneringsproces. Tenslotte geeft hoofdstuk 5 de conclusies en aanbevelingen van dit project.

HOOFDSTUK 2

OPBOUW VAN HET PROJECT

Dit project is verdeeld in een tweetal fasen. De eerste fase, bestaande uit een tweetal deelonderzoeken, betreft een selectie van bioassays en monsterlocaties. In het eerste onderzoek (fase 1.1) is een literatuurstudie verricht naar en selectie van geschikte bioassays voor het beoordelen van verontreinigde bodems en naar geschikte extractiemethoden om extracten te verkrijgen voor het uitvoeren van acute bioassays met aquatische organismen. In deze fase zijn tevens monsterlocaties geselecteerd op een met minerale olie verontreinigd bedrijfsterrein aan de Petroleumhavenweg in Amsterdam voor een veldscreening met acute- en chronische bioassays.

Vervolgens is een veldscreening uitgevoerd met de geselecteerde bioassays en extractiemethoden op de geselecteerde monsterlocaties. Op basis van de resultaten van de bioassays en van de chemische analyses, volgde een tweede, definitieve selectie van geschikte bioassays, monsterlocaties en noodzakelijke (fysisch-) chemische analyses voor beoordeling van het reinigingsproces van minerale olie.

In fase 1.2 zijn monsters genomen op de geselecteerde monsterlocaties en op laboratoriumschaal gereinigd middels bioventing in kolomproeven. Het verloop en het resultaat van deze biologische reiniging is beoordeeld met de in fase 1.2 geselecteerde bioassays en (fysisch-) chemische analyses.

Figuur 1 geeft schematisch de opbouw van het project weer.

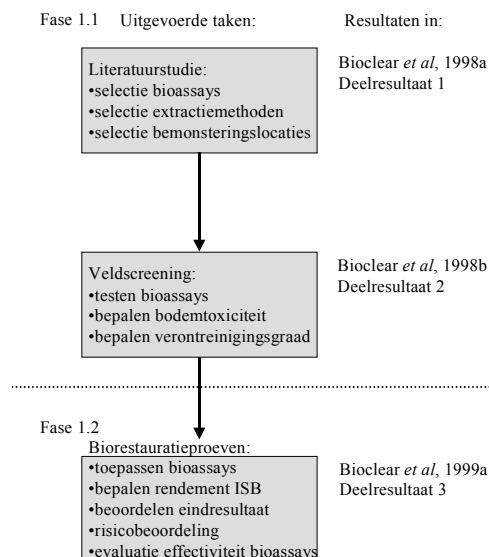


Fig. 1. Opzet van het project.

De met minerale olie verontreinigde testgronden zijn afkomstig van een locatie aan de Petroleumhavenweg, in beheer van het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam. Sinds eind vorige eeuw is het terrein in gebruik als op- en overslaglocatie voor brandstoffen. In de oorlog is het terrein gebombardeerd waardoor op grote schaal verontreiniging is opgetreden. Momenteel is het terrein op veel plaatsen verontreinigd met minerale olie tot een diepte van circa 4 meter beneden maaiveld (m-mv).

HOOFDSTUK 3

RESULTATEN

3.1 Literatuurstudie

Bioassays

In de literatuurstudie is een inventarisatie gemaakt van het gebruik van bioassays bij het beoordelen van verontreinigde landbodems. Uit deze inventarisatie is een selectie gemaakt van bioassays die toegepast kunnen worden voor het beoordelen van verontreinigde landbodems.

Hierbij zijn de volgende selectiecriteria aangehouden:

- De bioassays betreffen laboratoriumtesten;
- De bioassays maken gebruik van organismen in zijn geheel. Organismen worden niet opgewerkt voor bijvoorbeeld bepaling van enzymactiviteit of biomarkers;
- Met de bioassays worden uitsluitend toxische effecten gemeten, mutageniteitstesten en bioaccumulatiebepalingen worden buiten beschouwing gelaten;
- De bioassays betreffen single-species testen;
- De bioassays maken gebruik van terrestische organismen. Bioassays met aquatische organismen voldoen alleen indien deze regelmatig zijn gebruikt voor het beoordelen van verontreinigde bodems;
- Verschillende blootstellingsroutes (voedselopnameroutes) worden getest en zowel bioassays met waterige extracten als bioassays met grond dienen vertegenwoordigd te zijn.

Uit het literatuuronderzoek blijken grote verschillen te bestaan tussen de gevoeligheid van organismen voor contaminanten. Het blijkt niet mogelijk te zijn om het gevoeligste organismen aan te wijzen, doordat organismen verschillend reageren op verschillende verontreinigingen. Bovendien hebben verschillende organismen verschillende functies in het ecosysteem en verschillen organismen in de manier waarop zij verontreinigingen opnemen. Hierdoor is het noodzakelijk om te beschikken over een testbatterij van bioassays met meerdere soorten organismen. De in de literatuur gevonden bioassays die voldoen aan de hierboven gestelde criteria zijn daarom verder geselecteerd volgens onderstaande criteria:

- hoge gevoeligheid voor een verontreiniging met minerale olie;
- protocol beschikbaar voor de uitvoering van de bioassays;
- voldoende achtergrondinformatie beschikbaar;
- geringe complexiteit van de bioassays;
- vertegenwoordigers van verschillende trofische niveaus;
- lage kosten.

Op basis van de bovengenoemde selectiecriteria is gekomen tot een selectie welke in tabel 1 staat vermeld. Deze testen reageren gevoelig op een verscheidenheid aan verontreinigingen, waaronder zware metalen, PAK en minerale olie. Daarnaast voldoen deze bioassays aan wetenschappelijke criteria [Van Straalen en Verkleij, 1993; Van Straalen en Van Gestel, 1993]. De soorten hebben een taxonomische verscheidenheid, beslaan verschillende trofische niveaus en contaminanten worden opgenomen via verschillende routes.

De testen omvatten zowel acute als chronische bioassays. Acute bioassays testen directe effecten van de verontreiniging op toetsorganismen zoals sterfte of verminderde activiteit. Deze testen duren over het algemeen relatief kort (uren tot dagen) en worden doorgaans uitgevoerd op een (grond)watermonster of een waterig extract van bodemmateriaal. Chronische bioassays tes-

ten over het algemeen effecten die pas over langere termijn meetbaar zijn zoals groei en voortplanting. Deze bioassays worden doorgaans uitgevoerd met grond en duren langer dan acute bioassays.

Aangezien bij de Bait lamina test geen testorganismen worden toegevoegd aan de grond is de test in principe geen bioassay. Omdat in de test de activiteit van organismen in het laboratorium wordt onderzocht in combinatie met chronische bioassays is de test toch als bioassay opgenomen in de tabel. Als de analyse direct in het veld wordt uitgevoerd kan de test beter als veldinventarisatie worden gekarakteriseerd. Naast bekende, goed beschreven bioassays, zijn ook enkele relatief nieuwe bioassays, de acute bioassay met springstaart en nematoden, getest omdat deze met relevante organismen werken en veelbelovend leken.

Tabel 1. Geselecteerde bioassays voor veldscreening.

Test	Testorganisme	Testduur	Effectparameters
Acute bioassays			
Wortelgroeitest sla	<i>Lactuca sativa</i>	96 uur	afname wortelgroei
ECHA-enzymactiviteit	Bacteriën (<i>Bacillus</i> sp.)	24 uur	bacteriële groeiremming
Mobiliteit nematode	<i>Plectus acuminatus</i>	96 uur	immobiliteit
mobiliteit springstaart	<i>Folsomia candida</i>	96 uur	immobiliteit
ALGENTEST	<i>Raphidocelis subcapitata</i> ²⁾	72 uur	afname populatiegroei-snelheid
Microtox	Marine bacterie (<i>Vibrio fischeri</i>) ¹⁾	30 min	afname bioluminescentie
Mobiliteit watervlo	<i>Daphnia magna</i>	48 uur	immobiliteit
Chronische bioassays			
Chronische test met sla	<i>Lactuca sativa</i>	4 weken	kieming, groei
Reproductietest regenworm	<i>Eisenia fetida</i>	4 weken	overleving, groei, reproductie
Reproductietest springstaart	<i>Folsomia candida</i>	4 weken	overleving, groei, reproductie
Bait lamina	Bodemfauna	24 dagen	Substraatafbraaksnelheid

1) Voorheen *Photobacterium phosphoreum*

2) Voorheen *Senelenastrum capricornutum*

Extractiemethode

Acute bioassays met aquatische organismen worden uitgevoerd op waterig extract van de grond of op poriewater. Het doel van de literatuurstudie was om een geschikte extractiemethode te selecteren voor het verkrijgen van een extract waarin deze acute bioassays kunnen worden uitgevoerd. Verschillende parameters hebben invloed op het resultaat van de extractie en beïnvloeden daardoor de resultaten van de bioassays. Extractiemethoden voor organische verontreinigingen zijn in de literatuur echter nauwelijks beschreven.

De te selecteren extractiemethode dient te voldoen aan onderstaande criteria:

- De extractie moet herhaalbaar zijn;
- De extractie moet geschikt zijn voor verschillende bodems en verschillende soorten verontreinigingen en in ieder geval voor minerale olie;
- De mate van extractie moet relevant zijn voor de (biologische) beschikbaarheid van verontreinigingen in de praktijk;
- De extractie en/of het extractiemiddel mag geen effect hebben op het toetsorganisme;
- De resultaten van de bioassays moeten goed interpreteerbaar zijn;
- De extractie moet eenvoudig uit te voeren zijn;
- De extractie moet voldoende extract opleveren voor al de voorziene bioassays.

Uit de literatuur blijkt dat er geen gestandaardiseerde methoden bestaan voor het verkrijgen van bodemextracten. De gevonden methoden zijn divers voor wat betreft extractiemiddelen en benodigde tijd. Het meest gebruikte extractiemiddel is water waar al dan niet zouten aan zijn toegevoegd. Het onttrekken van poriewater is een goede methode, omdat bodemorganismen voornamelijk via het poriewater aan contaminanten worden blootgesteld. De hoeveelheid poriewater is echter afhankelijk van het vochtpercentage in de bodem. Door seizoensinvloeden fluctueren de vochtgehalten van gronden en bemonstering van poriewater en beoordeling met bioassays zijn daardoor slechts momentopnamen. Daarom is (porie)water geen geschikt medium voor het reproduceerbaar uitvoeren van acute bioassays.

In tegenstelling tot extractiemethoden bestaan er wel gestandaardiseerde uitloogtesten. Deze zijn echter ongeschikt voor routinematige toepassing vanwege een lange tijdsduur om extracten te verkrijgen.

Omdat er in de literatuur geen gestandaardiseerde methoden bestaan voor extractie, is voor dit project een nieuwe extractiemethode ontwikkeld die zoveel mogelijk bestaat uit een combinatie van toegepaste en bewezen technieken en tevens zoveel mogelijk de werkelijkheid benadert. De extractieprocedure die is opgesteld sluit zoveel mogelijk aan bij bestaande en gevalideerde normen voor extractie van vaste materialen. De methode extractie wordt uitgevoerd met 1mM calciumnitraat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) in de verhouding L/S 1 : 1 om het uitlokken van organisch materiaal en het daarmee gepaard gaande verlies van contaminanten te voorkomen. Deze verhouding is gekozen om de concentraties in het extract zo hoog mogelijk te krijgen en het uitschudden handelbaar te houden. De in poriewater opgeloste zouten zijn direct afkomstig vanuit de grond en zullen dan ook in het verkregen extract aanwezig zijn. Er is gekozen voor een tweestaps schudproef om naleveringseffecten op te nemen. Om adsorptie aan de wanden van de extractievaatjes en fotodegradatie van organisch materiaal te voorkomen, is gebruik gemaakt van bruine glazen potten, die helemaal zijn gevuld om tijdens het schudden geen lucht in het extractiemengsel te krijgen. De uitvoering van de extractiemethode staat gedetailleerd beschreven in deelresultaat 2 [Bioclear *et al.*, 1998b].

Op basis van deze literatuurstudie is een opzet gemaakt voor de uitvoering van de veldscreening. De veldscreening is uitgevoerd op 12 monsters van de locatie Petroleumhaven. De monsterpunten zijn geselecteerd op basis van eerder verricht bodemonderzoek [OMEGAM, 1996] en bereikbaarheid van het monsternamepunt.

De grondmonsters die tijdens deze veldscreening worden gebruikt, moeten aan de volgende selectiecriteria voldoen:

- Er dient een range aan concentraties getest te worden, van streefwaarde tot boven de interventiewaarde;
- Er dient een locale schone referentie te worden meegenomen;
- De monsters mogen alleen verschillen in verontreinigingsgraad en dienen overigens zoveel mogelijk vergelijkbaar te zijn (bodemsamenstelling, diepte etc.).

Voor meer details over de inventarisatie en selectie van bioassays, extractiemethoden en monsterlocaties wordt verwezen naar deelresultaat 1 [Bioclear *et al.*, 1998a].

Tijdens de veldscreening is in aanvulling op de geselecteerde bioassays een groot aantal (fysisch-) chemische parameters bepaald:

- bepaling concentratie minerale olie;
- bepaling concentratie minerale olie in extract;
- bepaling concentratie zware metalen;
- bepaling concentratie Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (PAK);
- bepaling concentratie Extraheerbare Organohalogenenverbindingen (EOX);

- bepaling percentage lutum;
- bepaling organisch stof gehalte.

Monitoring van de voortgang van in-situ biorestauratie kan daarnaast worden gevolgd middels een aantal biologische veldmetingen. In dit project zijn bacterietellingen en de dehydrogenase activiteit bepaald. Bij bacterietellingen is geteld volgens de MPN methode (Most Probable Number), waarbij zowel de totale hoeveelheid als het aantal specifieke olieafbrekende bacteriën is geteld. De bacterieaantallen reageren op in-situ biorestauratie en vormen daarmee een indicator voor het succes van de saneringsmaatregelen. Met de dehydrogenase activiteit, een enzym dat betrokken is bij de aërobe ademhaling van bacteriën, wordt een indruk gekregen van de aërobe ademhaling van de bodem gemeten. Deze is afhankelijk van de aantallen en activiteit van de bacteriën in de bodem.

3.2 Veldscreening

De resultaten van de veldscreening staan samengevat in tabel 2. Een volledige beschrijving van alle analyseresultaten staat in deelresultaat 2 [Bioclear et al, 1998b]. Alle monsters zijn afkomstig van diepten tussen 0,5 en 1,5 m–mv. Binnen de serie monsters is een gradiënt aan verontreiniging aanwezig. De belangrijkste verontreiniging is minerale olie. De lager verontreinigde monsters bevatten met name de hogere (C₃₀-C₄₀) fractie, terwijl sterker verontreinigde monsters ook met lagere fracties (C₁₂-C₂₂) zijn verontreinigd. In enkele monsters is daarnaast een co-verontreiniging (zware metalen, PAK) aanwezig. Van een aantal locaties is de concentratie minerale olie in de grondextracten bepaald. Deze concentraties zijn laag, 0,028, 0,081 en 0,064% voor respectievelijk locatie 11, 3 en 5. Het extract van locatie 3 is het meest verontreinigd en bevat de hoogste concentraties van de lagere oliefracties. De fractie C₃₀-C₄₀ is nauwelijks extraheerbaar.

Op basis van deze bemonstering zijn monsters 9, 10 en 11 geschikt als lokale referentie, omdat in deze monsters lage concentraties minerale olie, PAK en/of zware metalen aanwezig zijn.

De monsters zijn tevens geanalyseerd met een groot aantal bioassays. De resultaten van de bioassays zijn op twee manieren beoordeeld. In eerste instantie zijn de bioassays beoordeeld ten opzichte van het resultaat in een 'schoon' monster, de blanco. Dit monster bestond bij de acute bioassays uit het extractiemiddel en bij de chronische bioassays uit OECD kunstgrond, een standaardgrond welke veelal wordt gebruikt bij standaard toxiciteitstesten. Deze vergelijking geeft aan in hoeverre de bioassay anders reageert in milieumonsters dan in kunstmatige schone monsters. Effecten van bijvoorbeeld bodemtype, pH en nutriënten worden op deze manier aangetoond.

Vervolgens is een beoordeling van effecten van de verontreinigingen uitgevoerd door resultaten van de bioassays in monsters van de locatie onderling te vergelijken met een zogenaamde lokale referentie. Deze referentie bestaat uit een monster van de locatie dat niet tot licht is verontreinigd en geen tot weinig negatieve effecten laat zien in de bioassays. Op deze manier worden locatiespecifieke effecten van bodemtype e.d. uitgesloten en wordt gericht beoordeeld op effecten van de verontreiniging op de betreffende locatie. Aangezien locatie 11 de minste negatieve effecten veroorzaakte in de bioassays en zeer licht is verontreinigd werd deze locatie geselecteerd als lokale referentie. Een volledige beschrijving van de resultaten van de bioassays en de vergelijking met de blanco's staat beschreven in deelresultaat 2 [Bioclear et al., 1998b].

Tabel 2. Resultaten van de veldscreening van de Petroleumhaven locatie met chemische analyses en bioassays, beoordeeld ten opzichte van lokale referentie 11.

Locatiecode	11	10	9	6	7	12	8	4	2	1	1	3	5
										(herh)			
acute bioassays													
wortelgroei test sla (96u)	-	±	±	±	±	±	±	-	-	-	±	-	±
ECHA enzymact. (24u)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
mobilititeit nematode (96u)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
reproductie nematode (120u)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
mobilititeit springstaart (72u)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alg oppervlakte A (72u)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alg groeisnelheid µ (72u)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	±
Microtox (15min)	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+
mobilititeit watervlo (48u)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Chronische bioassays													
Sla kieming	-	-	-	-	±	-	-	-	+	+	n.b.	+	+
Sla biomassa	-	+	-	-	+	-	±	-	+	+	n.b.	+	+
Worm overleving	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.b.	-	-
Worm biomassa	-	-	-	±	-	-	-	-	-	+	n.b.	-	+
Worm reproductie	-	-	-	-	±	-	±	-	±	+	n.b.	+	+
Springstaart overleving	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.b.	+	+
Springstaart biomassa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.b.	+	+
Springstaart reproductie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.b.	+	+
Bait lamina	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	n.b.	+	±
Chemische/fysische analyses													
olie (mg/kg ds)	470	< 50	280	590	880	900	920	1050	2300	2800	2800	3200	3300
koper (mg/kg ds)	7	11	8	12	195	11	< 5	13	7	7	7	< 5	10
zink (mg/kg ds)	93	270	450	175	410	110	58	175	75	67	67	83	200
lood (mg/kg ds)	47	140	73	110	210	83	21	65	52	48	48	32	84
totaal 10 PAK (mg/kg ds)	1,8	1,4	12,0	2,9	3,8	89,0	3,4	4,7	0,8	2,8	2,8	5,7	3,7
EOX (mg/kg ds)	0,2	0,4	0,2	0,5	0,5	< 0,1	< 0,1	1,2	0,6	0,6	0,6	0,4	0,3
fractie < 2 µm (%)	4,6	2,0	3,4	4,5	4,8	4,7	5,9	3,4	4,0	4,7	4,7	4,1	6,1
Organische stof (%)	2,0	3,8	3,3	3,4	6,9	3,2	2,3	3,8	2,5	3,0	3,0	2,2	2,3

-: geen negatieve effecten;
 ±: matig negatieve effecten;
 +: sterk negatieve effecten;
 2300: boven interventiewaarde
 n.b. niet bepaald

Acute bioassays

Alle resultaten zijn beoordeeld ten opzichte van effecten die zijn gemeten in de lokale referentie monster 11. Dit betekent dat locatiespecifieke effecten zoals bodemtype e.d. geen rol spelen bij de waargenomen verschillen tussen de monsters.

In alle monsters groeiden de worteltjes van de slaplantjes slechter dan in de lokale referentie en er is geen duidelijk verband tussen groei en graad van olieverontreiniging. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door de grote spreiding van de meetgegevens. Ook gevoeligheid voor zware metalen [AquaSense, 1997] kan een rol gespeeld hebben. Noch in de mobiliteitstest met nematoden als de mobiliteitstest met springstaarten zijn negatieve effecten van de verontreiniging waargenomen. Met beide bioassays zijn effecten gemeten, maar door de grote spreiding zijn deze effecten niet significant en konden niet worden geassocieerd. Wel zijn er significante ef-

fecten waargenomen bij de reproductie van de nematode, maar dit onderdeel van de test is nog relatief nieuw en er zijn geen referentiegegevens. Verder onderzoek van deze parameter is gewenst.

De ECHA-test reageert zeer gevoelig op de bodemextracten. Alle locaties inclusief de lokale referentie 11 veroorzaken een sterk negatief effect. Dit betekent dat ten opzichte van locatie 11 geen effecten meetbaar zijn en de test niet onderscheidend is ten opzichte van de lokale referentie, daarom staat in de tabel aangegeven dat de ECHA test in geen van de monsters een negatief effect meet. Waarschijnlijk reageert de test in alle monsters op andere componenten dan de verontreiniging.

De algentest blijkt gevoelig te reageren op de aanwezigheid van verontreinigingen. Er is geen relatie tussen het gemeten effect en de olieconcentraties. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door de aanwezigheid van zware metalen en/of tijdens de veldscreening onbekende verontreinigingen of afbraakproducten. De algentest laat geen negatieve effecten zien op locatie 11.

Zowel de Microtox als de watervlooiëntest zijn onderscheidend. De Microtox vertoont een duidelijke relatie tussen effect en verontreiniging (figuur 2). Toenemende concentraties minerale olie leiden tot een toenemend toxisch effect. Bij de watervlooiëntest wordt op het meest verontreinigde monster (locatie 5) geen toxiciteit gemeten, terwijl op locatie 2, 3 en 7 sterk negatieve effecten worden gevonden. Van het extract afkomstig van locatie 3, 5 en 11 zijn de concentraties in het extract gemeten. De olieconcentraties in het extract van locatie 3 zijn hoger dan dat van locatie 5, wat de gevonden effecten kan verklaren. De sterk negatieve effecten die zijn gevonden op locatie 7 worden vermoedelijk veroorzaakt door de hoge concentraties zware metalen (niet bepaald in extract). Bekend is dat watervlooiën hiervoor zeer gevoelig zijn [STOWA, 1997a].

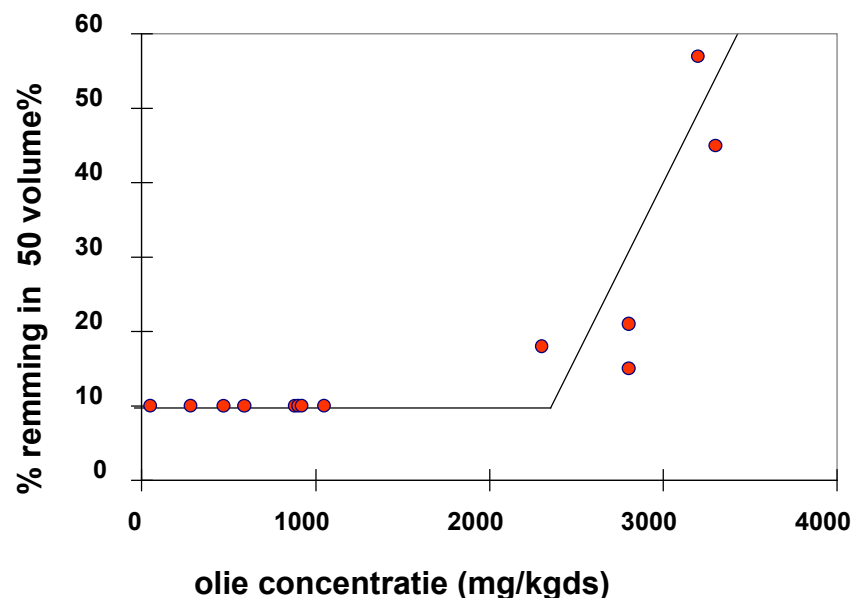


Fig. 2. Relatie tussen olieconcentratie en remming in de Microtox test in monsters van de locatie Petroleumhaven.

Chronische bioassays

De kieming van slazaden wordt negatief beïnvloed door hoge concentraties minerale olie (≥ 2300 mg/kg ds) en het kiemingspercentage neemt af bij toenemende olieconcentraties. Kieming van slazaden is op locatie 3 lager dan op de meest verontreinigde locatie 5. Het drooggewicht van slaplanten wordt beïnvloed door de verontreiniging met minerale olie, slaplanten worden minder groot bij toenemende olieconcentraties.

De overleving van regenwormen is maximaal en wordt niet beïnvloed door verontreiniging met minerale olie. Er is geen duidelijke relatie zichtbaar tussen olieverontreiniging en gewichtstoename van regenwormen. Groei is met name op de locaties met een olieconcentratie ≥ 2.300 laag tot negatief, maar ook op minder verontreinigde locaties is groei minimaal. Coconproductie vertoont wel een duidelijke trend met de olieverontreiniging (figuur 3). Tevens is de coconproductie op locatie 7 laag ten gevolge van de verontreiniging met zware metalen. De coconproductie op locatie 6 is hoog. Omdat op deze locatie de groei minimaal was, bestaat het vermoeden dat de regenwormen hun energie hebben gestoken in reproductie in plaats van groei. Op locatie 8 is het omgekeerde waargenomen, een lage coconproductie gaat gepaard met een forse gewichtstoename.

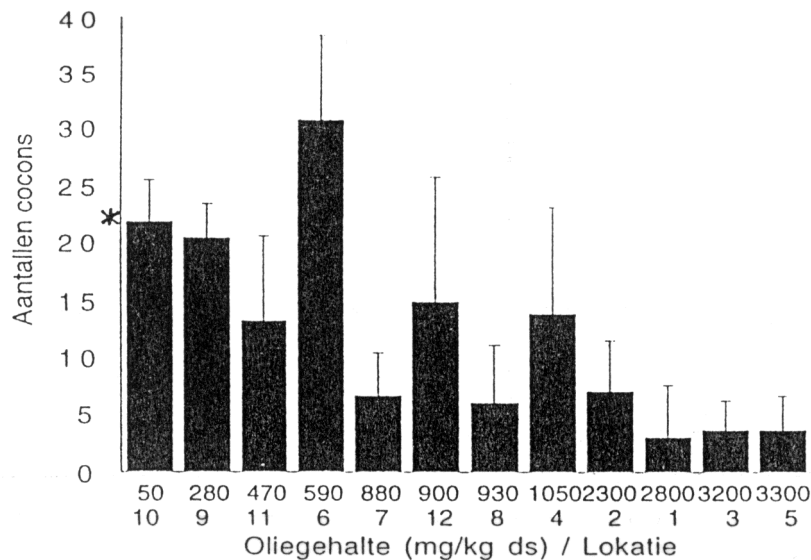


Fig. 3. Coconproductie (reproductie) per 10 regenwormen na 4 weken in monsters van de locatie Petroleumhaven.

* Coconproductie in de blanco OECD grond.

Nauwelijks tot geen van de springstaarten hebben de bioassays op de twee meest verontreinigde locaties 3 en 5 overleefd. De overleving op de overige locaties is gemiddeld 90% en vertoont nauwelijks variatie. De gewichtstoename is voor alle locaties gelijk. De enkele overlevende springstaarten op locatie 5 zijn duidelijk minder gegroeid dan op de overige locaties. Er zijn geen juvenielen geproduceerd op de locaties 3 en 5. Reproductie op de overige locaties neemt af met toenemende olieconcentraties, maar deze verschillen zijn niet significant.

Locatie 11 is in de screening geselecteerd als locatiespecifieke referentie. Deze locatie bevat lage concentraties verontreinigingen en veroorzaakt in de meeste bioassays (afgezien van de ECHA test) geen negatieve effecten. Als de overige locaties worden vergeleken met deze referentie blijkt dat er bij de meeste bioassays de effecten toenemen met toenemende verontreini-

gingsniveau en dat sterke negatieve effecten worden waargenomen op locaties 1, 2, 3 en 5. Deze locaties zijn van alle monsters ook het sterkst verontreinigd met minerale olie. Negatieve effecten op locatie 7 worden waarschijnlijk veroorzaakt door de verhoogde concentratie zware metalen.

De snelheid waarmee het substraat van de Bait lamina test wordt afgebroken, neemt af bij toenemende verontreiniging met minerale olie. De substraatconsumptie na 24 dagen is significant lager bij olieconcentraties ≥ 2300 mg/kg ds. Afbraak van het substraat in de OECD-kunstgrond is vergelijkbaar met consumpties op de locaties met een olieverontreiniging tot en met 1050 mg/kg ds.

Het aantal bacteriën ligt tussen 10^6 en 10^8 per gram drooggewicht en ligt binnen de range die normaal wordt gevonden in bodems (Bioclear, resultaten niet gepubliceerd). De aantallen olie afbrekende bacteriën maken een gering (0,01 – 1%) deel uit van de totale populatie. Er bestaat geen verband tussen de verontreiniging met minerale olie en het aantal bacteriën, wat er op duidt dat de bacteriepopulatie in de bodem niet is geadapteerd aan biologische afbraak van de verontreiniging.

Metingen van de dehydrogenase activiteit geven voor de meeste monsters een lage activiteit en de activiteit is niet gecorreleerd met de olieverontreiniging. Ook dit duidt op een niet-geadapteerde bacteriepopulatie. Zowel de aantallen bacteriën als de dehydrogenase activiteit zal naar verwachting toenemen indien biologische afbraak wordt gestimuleerd middels in-situ biorestauratie.

Selectie bioassays en biologische inventarisaties

Met de veldscreening zijn bioassays geselecteerd voor de kolomproeven in fase 2 volgens onderstaande selectiecriteria:

- De bioassays geven een meetbaar toxisch signaal ten opzichte van de blanco (1mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ bij de acute bioassays en OECD kunstgrond bij de chronische bioassays);
- Er bestaat een correlatie tussen de resultaten van de bioassays en de olieverontreiniging;
- Er dient een bioassay opgenomen worden die gevoelig reageert op zware metalen om een indicatie te verkrijgen van de overall toxiciteit van de bodem;
- De toxische signalen in de bioassays moeten voor de meeste monsters verklaarbaar zijn;
- De Microtox bioassay, de acute bioassay met Daphnia en verder alle chronische bioassays geven een toxisch signaal dat verklaard kan worden door de verontreiniging met minerale olie of zware metalen. Deze testen zijn gevoelig voor olieconcentraties tot 3.300 mg/kg ds en zijn daarmee geschikt om het effect van verontreinigde grond tijdens en na in-situ biorestauratie te monitoren en beoordelen;
- De acute bioassay met algen is opgenomen als vertegenwoordiger van primaire producenten;
- De immobiliteitstesten met de nematode en springstaarten zijn te ongevoelig voor monitoring van het reinigingsproces van met minerale olie verontreinigde gronden. Tijdens de veldscreening zijn met deze bioassays geen toxische signalen waargenomen;
- De bioassays met de nematoden (reproductie) en wortellengte groei van sla geven weliswaar een toxisch signaal, maar dit signaal is moeilijk interpreteerbaar omdat er geen correlatie bestaat tussen dit signaal en de verontreiniging met minerale olie. Deze onverklaarbare toxische signalen zijn wel ecologisch relevant, omdat ze bijvoorbeeld duiden op een verontreiniging met zware metalen of onbekende contaminanten. Wanneer deze testen leiden tot een zinvolle uitbreiding van de testbatterij kunnen zij worden opgenomen en gebruikt als instrument voor monitoring van het reinigingsproces van olieverontreinigde gronden.

Omdat de ECHA-test in alle grondmonsters, inclusief de schone referentie, een ernstig toxisch signaal afgeeft is deze test niet opgenomen in de testbatterij.

Uiteindelijk is de volgende set van bioassays geselecteerd om het effect van biorestauratie te monitoren in kolomproeven:

- Acute bioassays:
 - Algentest; oppervlakte onder groeicurve en groeisnelheid;
 - Watervlooiëntest; immobiliteit;
 - Microtox; bioluminescentie;
- Chronische bioassays:
 - Sla; kieming en biomassa;
 - Regenworm; groei en reproductie;
 - Springstaart; overleving en reproductie;
 - Bait lamina test.

De geselecteerde bioassays omvatten verschillende groepen organismen en trofische niveaus. In de Microtox worden bacteriën gebruikt. Bacteriën zijn in alle ecosystemen aanwezig en vervullen onder andere functies als primaire producenten (energielevering) en vormen een belangrijke schakel in stofkringlopen. Algen en planten zijn belangrijke primaire producenten. Zij zijn in staat licht om te zetten in biologische bruikbare energie door fotosynthese en vormen daardoor een belangrijke voedselbron. Het menu van watervlooien bestaat voornamelijk uit algen en zijn de volgende schakel in de voedselketen. Springstaarten zijn voedselconsumenten en voeden zich onder andere met algen, bacteriën, gist en schimmels. Regenwormen functioneren in de bodem als substraat omzetters en als afvaleters. Bovendien vervullen regenwormen belangrijke functies voor de beluchting van de bodem en zijn een belangrijke voedselbron voor vogels en zoogdieren (doorvergiftiging). Zowel regenwormen als springstaarten zijn in grote getallen in bodems te vinden. Ook de Bait lamina test maakt gebruik van een scala aan organismen die van nature voorkomen in de bodem en vormt daarmee een geschikt instrument voor het beoordelen van bodemkwaliteit.

Alle aquatische en terrestrische organismen worden blootgesteld via (porie)water. Daarnaast hebben wormen en springstaarten een additionele opname van contaminanten door voedselopname via de grond. Ook watervlooien kunnen verontreinigingen opnemen via het voedsel, maar zij worden gedurende de bioassays niet gevoerd met verontreinigd materiaal.

Op deze manier is een testbatterij samengesteld die model staat voor het bodemecosysteem. Effecten die worden gemeten in deze bioassays kunnen vertaald worden naar effecten die de verontreinigingen in het milieu veroorzaken en vormen daarmee een goede maat voor de actuele risico's van de bodemverontreiniging.

Bij de monitoring van het reinigingsproces tijdens de kolomproeven worden daarnaast de volgende biologische inventarisaties verricht :

- Bacterietellingen;
- Dehydrogenase activiteit.

Tijdens de kolomproeven wordt zowel het totale aantal bacteriën als het aantal olieafbrekende bacteriën geteld als maat voor de biologische activiteit en afbraak van minerale olie in de grond. Dehydrogenase activiteit is een maat voor de activiteit van bacteriën en is daarom een maat voor de biologische afbraak van minerale olie. Tijdens de kolomproeven wordt de Bait lamina test als screeningstest opgenomen, dat wil zeggen de resultaten van de test zijn gebruikt als indicator voor effecten op de wormentoets en zelf niet afzonderlijk meegenomen in de beoordeling.

Op basis van de resultaten van de bioassays wordt is een locatie specifieke referentie en een tweetal verontreinigde locaties gekozen voor biologische reiniging tijdens kolomproeven. Als referentie is locatie 10 ongeschikt. Deze locatie is weliswaar niet verontreinigd met minerale olie, maar een aantal geselecteerde bioassays geven op deze locatie een toxisch signaal af (sla, groei van wormen en algentest). Locatie 9 is voor chronische bioassays met uitzondering van groei van sla, niet toxisch. Deze locatie veroorzaakt wel sterk negatieve effecten in de algentest en wordt daarom niet gebruikt voor de kolomproeven. Locatie 11 blijkt het meest geschikt te zijn als referentie. Deze grond kent een lage verontreiniging met olie en heeft alleen bij de groei van slaplanten negatieve effecten.

De olieconcentraties in de monsters moeten hoog genoeg zijn om bij aanvang van de kolomproeven toxische effecten te veroorzaken, zodat een afname van de olieconcentraties en de daaruit voortkomende afname van de toxiciteit kan worden aangetoond. Als testgronden voor de biologische reiniging zijn locaties 3 en 5 geselecteerd. Deze locaties bevatten relatief hoge concentraties verontreiniging en duidelijk meetbare toxische effecten. De bodemeigenschappen van de drie locaties zijn vergelijkbaar zodat verschillen in toxiciteit kunnen worden toegeschreven aan effecten van de bodemverontreiniging.

3.3 Biorestauratieproeven

Afbraak van olie

De kolomproeven zijn ingezet met de restanten van de monsters uit de veldscreening, deze waren opgeslagen bij 4°C. De olieconcentraties blijken bij aanvang van de kolomproeven aanzienlijk afgenomen ten opzichte van de concentratie in de veldscreening. De afname van de olieconcentratie is waarschijnlijk het gevolg van verlies (afbraak, verdamping) van de minerale olie gedurende de opslag van de monsters tussen het moment van monsterneming in januari 1998 en het inzetten van de kolomproeven in augustus 1998.

Gedurende het verblijf in de kolommen nemen de concentraties minerale olie af. De resultaten van kolom 5 zijn als voorbeeld weergegeven in figuur 4. Na 12 weken zijn voor de beginconcentraties minerale olie voor locaties 11, 3 en 5 van respectievelijk 270, 1000 en 1700 mg/kg ds met respectievelijk 52, 69 en 54 % afgenomen.

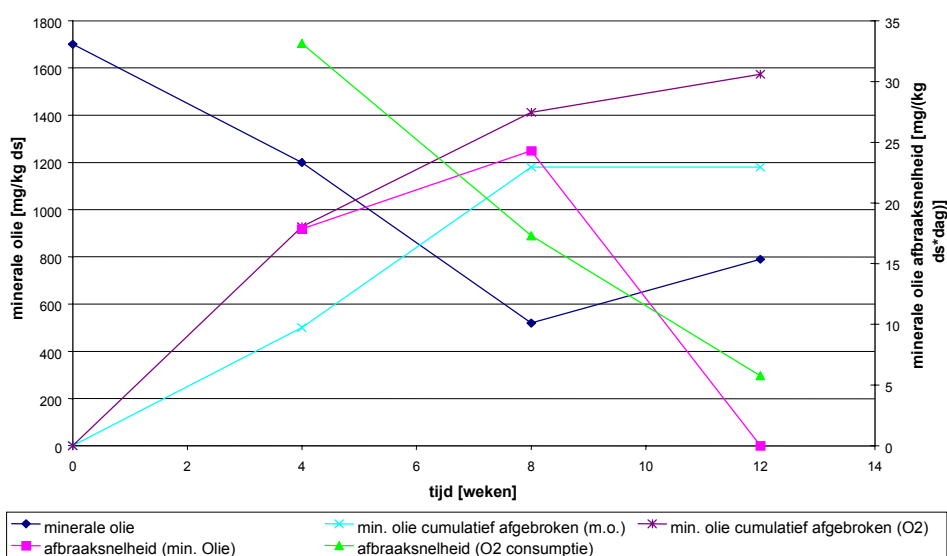


Fig. 4. Biologische afbraak van minerale olie middels bioventing in kolomproeven met monster 5 van de locatie Petroleumhaven.

Deze afname is het gevolg van biologische afbraak zoals aangetoond met de verhoogde bodemademhaling tijdens de kolomproeven. Bij aanvang van de kolomproef liggen de olieconcentraties van de locaties 3 en 5 boven de interventiewaarde. De biorestauratie heeft tot gevolg dat de olieconcentraties afnemen tot beneden de interventiewaarden, maar liggen nog altijd ruim boven de streefwaarde. De afbraaksnelheid van minerale olie zoals bepaald middels bodemademhaling (O_2 consumptie, CO_2 productie) neemt toe bij toenemende olieconcentraties. Gedurende de kolomproeven neemt de afbraaksnelheid af door zowel afname van de concentratie als door fractieverschuivingen. Lichtere oliefracties zijn makkelijker afbreekbaar dan zwaardere fracties. Doordat lichtere fracties snel uit de grond verdwijnen, blijven de moeilijk afbreekbare zwaardere fracties over en daalt de afbraaksnelheid. De biorestauratie leidt niet tot volledige verwijdering van de minerale olieverontreiniging en een restfractie blijft aanwezig. Deze restfractie is gedurende het experiment niet verwijderd en zal waarschijnlijk slechts langzaam in concentratie afnemen.

Resultaten bioassays

De toxiciteit van de monsters was bij aanvang van de proeven lager dan in de eerdere veldkarakterisatie was aangetoond. Dit hangt hoogstwaarschijnlijk samen met de lagere concentraties olie die zijn bepaald.

Het niet verontreinigde referentiemonster 11 gaf in geen van de bioassays een negatief effect. Dit betekent dat de niet-verontreinigde grond op de Petroleumhaven locatie van nature een geschikt leefmilieu vormt voor de testorganismen en in principe geschikt is voor een normaal ontwikkeld bodemecosysteem.

Toxiciteit werd met name in monster 5 gemeten, dit is eveneens het monster met de hoogste verontreinigingsgraad, en in mindere mate in monster 3. Negatieve effecten werden bepaald met de Microtox assay, de algentest, kieming en groeiopbrengst sla, groei regenwormen en de Bait lamina test. De acute bioassay met Daphnia, de overleving van regenwormen en de chronische bioassay met springstaarten lijken geen negatieve effecten te ondervinden in de verontreinigde grond van monster 3 en 5. Biologische sanering leidt tot verlaging of geheel verdwijnen van negatieve effecten in de bioassays. Zo verdwijnen de toxische effecten in de acute bioassays, verbetert de groei van regenwormen tijdens de sanering van kolom 5. De Bait lamina test laat eveneens een zeer duidelijk positief effect zien van biologische sanering op de uitkomst van de test, waarbij met name de kwaliteit van kolom 5 sterk toeneemt tijdens sanering.

De eventuele toxische effecten in de slatest worden in de eerste meetronde al volledig tenietgedaan door een aanzienlijke kwaliteitsverbetering van de grond in alle monsters, waarschijnlijk veroorzaakt door het bemestingseffect ten gevolge van de doorspoeling met nutriënten. Dat betekent dat slaplanten in grond van de Petroleumhaven niet zozeer te lijden hebben van de olie als wel van een tekort aan anorganische voedingsstoffen.

Tijdens de sanering zijn nog wel olieconcentraties boven de interventiewaarde aangetroffen (1200 mg/kg ds) maar deze concentratie leidde niet tot negatieve effecten in de bioassays. Waarschijnlijk wordt tijdens de sanering als eerste de makkelijk biologisch afbreekbare (en toxische) fractie afgebroken waardoor de toxiciteit van de bodem snel afneemt.

De uiteindelijke restfractie na afloop van de sanering vertoont ook geen toxische effecten in de bioassays, aangezien met geen van de geteste bioassays een negatief effect wordt gevonden in grond uit de kolommen na afloop van het experiment. De resultaten zijn in beide verontreinigde kolommen vergelijkbaar met die uit de referentiekolom 11.

De resultaten van de bioassays zijn beoordeeld ten opzichte van de locatiespecifieke referentie kolom 11 (tabel 3). De classificatie van de verschillende testen naar geen, matig en ernstig effect is per test verschillend, deze classificaties staan beschreven in de deelresultaat 2 [Bioclear *et al.*, 1998b].

Tabel 3. Bodemkwaliteitsverbetering ten opzichte van referentiekolom 11 door bioventing in kolomproeven zoals bepaald met chemische analyses en bioassays.

Locatie		t=0 weken	t=4 weken	t=8 weken	t=12 weken
11*	Olieconcentratie (mg/kg ds)	270	130	<25	130
	Referentie Alg	-	n.b.	n.b.	-
	Watervlo	-	-	-	-
	Microtox	-	-	-	-
	Sla kieming	-	-	-	-
	Sla biomassa	-	-	-	-
	Regenworm overleving	-	-	-	-
	Springstaart overleving	-	-	-	-
	Springstaart groei	-	-	-	-
	Springstaart reproductie	-	-	-	-
3	Olieconcentratie (mg/kg ds)	1000	360	220	310
	Alg	±	n.b.	n.b.	-
	Watervlo	-	-	-	-
	Microtox	±	-	-	-
	Sla kieming	±	n.b.	n.b.	-
	Sla biomassa	-	-	-	-
	Regenworm overleving	-	n.b.	n.b.	-
	Springstaart overleving	-	-	-	-
	Springstaart groei	-	-	-	-
	Springstaart reproductie	-	-	-	-
5	Olieconcentratie (mg/kg ds)	1700	1200	520	790
	Alg	+	n.b.	n.b.	-
	Watervlo	-	-	-	-
	Microtox	-	-	-	-
	Sla kieming	±	-	-	-
	Sla biomassa	±	-	-	-
	Regenworm overleving	-	-	-	-
	Springstaart overleving	-	-	-	-
	Springstaart groei	-	-	-	-
	Springstaart reproductie	-	-	-	-

* Locatie 11 dient als lokale referentie, effecten die hier zijn waargenomen zijn daarom als referentie genomen.

- geen negatieve effecten,
- ± matige negatieve effecten,
- + sterk negatieve effecten,
- n.b. Niet bepaald.

De acute bioassays op bodemextracten van monsters uit de kolomproeven geven in tegenstelling tot de eerdere veldscreening niet tot nauwelijks negatieve effecten te zien van de minerale olie verontreiniging. De belangrijkste reden hiervoor is dat de concentraties minerale olie een stuk lager liggen dan in de eerdere analyseronde. Gedurende de kolomproeven verdwijnt de gemeten toxiciteit volledig, wat waarschijnlijk wordt veroorzaakt doordat de wateroplosbare en biologisch beschikbare fractie het eerste afgebroken is. Acute bioassays vormen derhalve een goed instrument voor het monitoren van bodemkwaliteit tijdens biorestauratie, waarbij meetbare toxische effecten duiden op hogere concentraties van biologisch beschikbare verontreiniging.

De acute bioassays op bodemextracten van monsters uit de kolomproeven geven in tegenstelling tot de eerdere veldscreening niet tot nauwelijks negatieve effecten te zien van de minerale olie verontreiniging. De belangrijkste reden hiervoor is dat de concentraties minerale olie een stuk lager liggen dan in de eerdere analyseronde. Gedurende de kolomproeven verdwijnt de gemeten toxiciteit volledig, wat waarschijnlijk wordt veroorzaakt doordat de wateroplosbare en

biologisch beschikbare fractie het eerste afgebroken. Acute bioassays zijn vormen derhalve een goed instrument voor het monitoren van bodemkwaliteit tijdens biorestauratie, waarbij meetbare toxische effecten duiden op hogere concentraties van biologisch beschikbare verontreiniging. De chronische bioassays geven net als de acute bioassays weinig respons op de aanwezige verontreiniging. De minerale olie verontreiniging veroorzaakt voorafgaande aan de sanering in enkele bioassays negatieve effecten, tijdens de sanering verdwijnen deze negatieve effecten volledig.

In vergelijking met de veldscreening lijkt het dat negatieve effecten in de kolomproeven al verdwijnen bij concentraties waarbij veldmonsters nog wel toxiciteit bezitten. Deze vergelijking wordt bemoeilijkt doordat de concentratierange in de kolomproeven geen goede overlap heeft met de concentratierange in de veldscreening. De matig toxische effecten die zijn gemeten in de veldscreening worden tijdens de kolomproeven niet meer gemeten. Dit kan betekenen dat er verschillen zijn in bodemsamenstelling tussen de monsters die in beide analyseronden zijn gebruikt, maar kan ook duiden op een verschil in toxiciteit van de olieverontreiniging. Dit laatste is interessant omdat dit een aanwijzing kan zijn dat een concentratieniveau alleen geen goede indicatie is van de toxiciteit en risico van een olieverontreiniging en dat bioassays inderdaad een meer gevoelige maat zijn voor actuele risico's.

De bioassays met de regenworm *Eisenia fetida*, zoals is uitgevoerd door Van den Munckhof [Van den Munckhof *et al.*, 1998], vertonen een gereduceerde groei ten opzichte van een schoon referentiemonster (geen detecteerbare olieverontreiniging) bij een olieconcentratie van 370 mg/kg ds. De regenwormen in dit experiment groeien goed bij een olieconcentratie van 790 mg/kg ds en groei is vergelijkbaar met het schone referentiemonster en OECD-kunstgrond. Ook deze verschillen kunnen enerzijds verklaard worden door mogelijke verschillen in samenstelling van de olie en anderzijds door verschillen in biologische beschikbaarheid en locatiespecifieke effecten.

De springstaarten bleken in het geheel niet gevoelig voor de aanwezige olieverontreiniging. Overleving is maximaal en groei en reproductie varieerde niet tussen de referentiemonsters, verontreinigde monsters en OECD-kunstgrond. In de experimenten van Van den Munckhof [Van den Munckhof *et al.*, 1998] vertonen springstaarten wel verminderde reproductie ten opzichte van een schoon referentiemonster (geen detecteerbare olieverontreiniging) bij olieconcentraties van 53 mg/kg ds en hoger. Ook deze verschillen kunnen veroorzaakt zijn door verschillen in samenstelling van de olie en locatiespecifieke effecten.

De groei van slaplanten wordt in alle monsters sterk gestimuleerd gedurende de reiniging. Dit is echter geen effect van afnemende olieconcentraties, maar een effect van toevoeging van nutriënten om een optimaal milieu te creëren voor olieafbrekende bacteriën.

3.4 Risicobeoordeling en evaluatie

Ter vergelijking van de bepaling van actuele risico's van de bodemverontreiniging middels bioassays is eveneens de conventionele risicobeoordeling uitgevoerd conform de saneringsurgentie systematiek. [Koolenbrander, 1995]. De humane risico's zijn afgeleid middels modelsimulatie met het computerprogramma C-soil versie 6.3 [Tauw Milieu b.v., 1996]. Voor de afleiding van actuele humane risico's is het noodzakelijk een aantal aannames te maken. De eerste aanname is de keuze van industrie als scenario voor het bodemgebruik, waarin is gerekend met de standaard waarden voor dit scenario. Het is over het algemeen niet bekend in hoeverre de standaardwaarden voor dit scenario de werkelijke situatie op de locatie benaderen. De tweede aanname is de keuze van de verontreiniging. Omdat de modellen niet kunnen rekenen met minerale olie als parameter, dient de olie gespecificeerd te worden. Gekozen is voor dieselolie,

omdat deze verontreiniging op grond van het gebruik van de locatie is te verwachten. Eveneens zijn ter verificatie enkele modelruns uitgevoerd met benzine als oliesoort en met meer gevoelige vormen van bodemgebruik zoals wonen. Bij de afleiding van ecologische risico's is de oppervlakte van de gehele locatie als inputparameter gekozen, hoewel er slecht op een klein gedeelte is bemonsterd. Overigens kan bij de afleiding van actuele ecologische risico's wel worden gemodelleerd met minerale olie.

Uit deze analyse blijkt dat in de huidige situatie (industrieel gebruik) geen sprake lijkt te zijn van actuele humane risico's. De aangetroffen olie is zelfs zwaarder (naar verwachting minder toxisch) dan de gemodelleerde diesilverontreiniging. Alleen indien sprake zou zijn van een verontreiniging met een lichtere oliesoort (benzine) kan er volgens het model sprake zijn van actuele humane risico's. Uit de modellering blijkt tevens dat momenteel geen sprake is van een actueel ecologisch risico. Alleen in het geval dat het terrein wordt heringericht als natuurgebied en daardoor een hoge ecologische doelstelling krijgt, treden ecologische risico's op.

Na de gesimuleerde biologische reiniging is er met uitzondering van een modellering met lichtere oliesoorten (benzine) geen sprake van actuele ecologische risico's conform de saneringsurgentie systematiek. Bovendien breken de toxische lichtere oliefracties ten gevolge van de lagere biologische beschikbaarheid sneller af dan de minder toxische zwaardere fracties.

Wanneer de resultaten van de simulaties worden geëxtrapoleerd naar de veldsituatie, dan kan worden geconcludeerd dat een biologische in-situ techniek zal leiden tot het wegnemen van actuele risico's.

3.5 Pilotproef

In een separaat project dat is uitgevoerd in opdracht van het Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam is op deze locatie een pilotproef van een in-situ biorestauratie uitgevoerd door middel van een combinatie van air sparging en bioventing. Deze pilot proef had ten doel om de effectiviteit van een biologische in-situ sanering op deze locatie te bepalen. De resultaten van deze pilot proef zijn beschreven in een aparte rapportage [Proefsanering locatie Petroleumhavenweg Amsterdam, Bioclear bv, 1999]. Tijdens deze pilot proef is de minerale olie concentratie tot op een diepte van 2 m – mv gesaneerd.

3.6 Conclusies proefsanering

Proefsanering

- Tijdens de proefsanering zijn de minerale olie concentraties in grond op een diepte van 0,5 – 1,0 m-mv in 62 dagen afgenomen van gemiddeld 2200 mg/kg ds tot gemiddeld 360 mg/kg ds.
- Na 153 dagen bleken aan de westelijke zijde van het proefvlak op twee plaatsen nog hoge gehalten aan minerale olie voor te komen (4400 en 2100 mg/kg ds). Dit wordt mogelijk veroorzaakt door een slechtere doorlatendheid op dit gedeelte van het proefvlak.
- De concentraties aan minerale olie in grond op 1,5 – 2,0 m-mv zijn afgenomen van gemiddeld 500 mg/kg ds bij aanvang van de proefsanering tot gemiddeld 280 mg/kg ds na 153 dagen.
- De concentraties aan minerale olie in het grondwater zijn gedurende 153 dagen afgenomen van 1800 tot 21 ug/l op een diepte van 1,0 – 1,5 m-mv en van 890 tot 430 ug/l op een diepte van 2,2 – 3,2 m-mv (gemiddelde concentraties).
- De afname van de minerale olie concentraties correleerde met een toename van de zuurstof gehalten in het grondwater en een toename van de minerale olie afbrekende bacteriën in zowel grond als grondwater.
- De hoogst geconstateerde biologische afbraaksnelheid is 19 mg/kg ds/dag.

- Als gevolg van persluchtinjectie wordt het grondwater niveau op de locatie met circa 1,5 m verlaagd door het middels aanbrengen van overdruk weg te drukken van het water.

Kolomproeven

- In de kolom waarin de verontreiniging boven in de kolom aanwezig was werd ongeveer de helft van de verontreiniging verwijderd via stripping en de andere helft via biologische afbraak.
- In de kolom waarin de verontreiniging met name onder in de kolom aanwezig was trad nauwelijks stripping van de verontreiniging op.
- De resultaten van de kolomproeven zijn vergelijkbaar met die van de proefsanering.

Perspectieven voor full scale sanering

- Vanwege het sterke grondwaterstand verlagende effect van de persluchtinjectie en de met name ondiep gelegen verontreiniging kan de locatie effectief worden behandeld met behulp van persluchtinjectie, grondwateronttrekking is hierbij niet benodigd.
- Bodemluchtextractie ter voorkoming van vervluchtiging van minerale olie naar de buitenlucht is waarschijnlijk niet strikt noodzakelijk, aangezien de relatief onverontreinigde toplaag kan fungeren als een biologisch luchtfilter. Voorgesteld wordt om bij een full scale sanering pas bodemluchtextractie toe te passen wanneer metingen aangeven dat vervluchtiging naar de buitenlucht optreedt.
- Gezien de heterogeniteit van het bodempakket is een debietregeling en een voortdurende controle van de debieten voor ieder afzonderlijk injectiefilter van groot belang.

Flexibiliteit bij zowel de plaatsing van de filters als bij de uitvoering van de sanering is van doorslaggevend belang voor het welslagen van een full-scale sanering.

Op deze locatie zijn tevens monsters genomen voor bioassays in het kader van het NOBIS TRIADE project, de resultaten hiervan zullen worden beschreven in de eindrapportage van dit project.

HOOFDSTUK 4

DISCUSSIE

Dit onderzoeksproject is opgezet om de effectiviteit van bioassays te bepalen bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Hierbij is een aantal methoden en technieken voor het uitvoeren van bioassays getest met verontreinigd bodemmateriaal en is op basis van de uitkomsten van dit onderzoek een methodiek voorgesteld voor het toepassen van bioassays bij het beoordelen van de kwaliteit van verontreinigde grond.

Om een betrouwbaar beeld te krijgen van het actuele ecologisch risico van bodemverontreiniging, dienen bioassays bij voorkeur uitgevoerd te worden met ecologische relevante organismen [Kamerman en Van Gestel, 1991]. Onder ecologische relevante organismen worden organismen verstaan waarvan redelijkerwijs kan worden aangenomen dat deze van nature op de desbetreffende locaties aanwezig zijn of kunnen zijn.

Uit de literatuurstudie kwam naar voren dat er relatief weinig bioassays beschreven zijn die zich specifiek richten op verontreinigde grond. De set bioassays die is getest in de veldscreening bevatte daarom naast bekende, goed beschreven bioassays, ook enkele relatief nieuwe bioassays die echter gebruik maakten van relevante bodemorganismen. Vooral de acute bioassay met springstaart en nematoden leken in dit opzicht veelbelovend. Uit de screening bleek dat niet alle geteste bioassays geschikt zijn voor toepassing in extracten van grond. Hierdoor zijn uiteindelijk de bekende acute bioassays Microtox en Daphnia geselecteerd voor toepassing. Hoewel de testorganismen in deze bioassays minder relevant zijn voor verontreinigde grond bleken ze toch reproduceerbare en interpreteerbare resultaten op te leveren in het onderzoek.

De chronische bioassays bleken allen goed toepasbaar te zijn voor het analyseren van toxische effecten in verontreinigd bodemmateriaal en maken gebruik van relevante bodemorganismen. De regenworm *Eisenia fetida* komt weliswaar alleen voor in composthoppen en andere rijk organische substraten [Sims en Gerard, 1985], de springstaart *Folsomia candida* in strooisellagen en organisch rijke bodems en slaplanten in agrarische gebieden en zijn dus geen algemene vertegenwoordigers van bodems, maar deze organismen vertegenwoordigen wel ecologische relevante groepen. Regenwormen vervullen belangrijke ecologische functies in bodemecosystemen, het aantal springstaarten in bodems kunnen oplopen tot een miljoen individuen per vierkante meter en planten zijn aanwezig in elk terreestisch ecosysteem. Bovendien zijn deze soorten handelbaar, makkelijk te kweken en is ruime ervaring met deze organismen opgedaan.

Bodemorganismen worden voornamelijk blootgesteld aan in het poriewater opgeloste verontreinigingen [Van Gestel, 1997; Van de Guchte *et al.*, 1996]. Deze worden door de huid opgenomen, terwijl moeilijk oplosbare verontreinigingen voornamelijk via het voedsel worden opgenomen [Belfroid *et al.*, 1996]. Mits het extractiemiddel een goede benadering is van het poriewater, dan zijn gezien de blootstellingsroute aquatische organismen relevant. Immers de oplosbaarheid bepaald de biologische beschikbaarheid en daardoor toxiciteit.

Er is daarom gekozen voor een testbatterij bioassays die gebruik maakt van zowel acute als chronische bioassays.

De geselecteerde extractiemethode leverde in combinatie met de Microtox en Daphnia bioassay bruikbare resultaten. De methode lijkt daarom geschikt voor het bereiden van extracten voor acute bioassays. De methode is relatief eenvoudig en sluit goed aan bij andere gestandaardiseerde en genormaliseerde extractiemethoden. In de toekomst kan bepaald worden in hoeverre

de methode aansluit bij andere methoden voor het extraheren van verontreinigde grond, zoals de bijvoorbeeld extractiemethode ten behoeve van de door Oranjewoud ontwikkelde oliekaracterisatiemethode.

De gebruikte bioassays bieden een meerwaarde aan chemische analyses van minerale olie. Dit blijkt allereerst uit het vooronderzoek waar bioassays toxiciteit vertonen die niet verklaard kon worden op basis van alleen minerale olie. Enkele locaties die nauwelijks verontreinigd waren met minerale olie, vertoonden wel toxiciteit door de aanwezigheid van zware metalen.

Een goede referentie is noodzakelijk bij het uitvoeren van bioassays. Om met bioassays uitspraken te kunnen doen over het actueel ecologisch risico van bodems, moeten de resultaten worden vergeleken met een referentie. Binnen de test wordt altijd een positieve controle meegenomen om te zien of de test voldoende heeft gefunctioneerd. Tijdens de uitvoering van de acute bioassays is het uitschudmedium of een standaardblanco als referentie gebruikt. Bij de chronische bioassays is een OECD kunstgrond als controle gebruikt. Hoewel deze controles aangeven in hoeverre de grond vergelijkbare eigenschappen bezit als de referentie, blijft het vaak onduidelijk waardoor eventuele verschillen worden veroorzaakt. Deze verschillen kunnen zijn veroorzaakt door de verontreiniging maar verschillen in nutriëntensamenstelling, pH en andere eigenschappen die bodemspecifiek zijn en niets te maken hebben met de verontreiniging kunnen ook leiden tot effecten.

Daarom is tijdens alle testen een eventueel negatief effect bepaald ten opzichte van een locale referentie. Deze referentie is bepaald als het monster met de minste negatieve effecten in de bioassays. Dit monster bleek ook op basis van chemische analyses zeer lage concentraties verontreinigingen te bevatten. Deze strategie lijkt goed bruikbaar in een meer algemene opzet, omdat op deze manier de beoordeling minder afhankelijk wordt van welke chemische analyses zijn uitgevoerd en meer wordt gekeken naar de daadwerkelijke biologische bodemkwaliteit.

Zowel de acute- als chronische bioassays tonen aan dat in-situ biorestauratie een verbetering oplevert van de ecologische bodemkwaliteit. Tijdens het reinigingsproces is een afname waarneembaar van de toxiciteit voor de gebruikte toetsorganismen. De bioassays vertonen geen duidelijke relatie met de olieconcentraties tijdens het reinigingsproces hetgeen waarschijnlijk aan de lage aanvangsconcentraties is te wijten.

Het eindproduct van de biologische reiniging, met concentraties tussen de streef- en interventiewaarden, leverde geen aantoonbare toxiciteit voor de gebruikte toetsorganismen op. Geconcludeerd kan worden dat de reiniging het beoogde einddoel, een verbetering van de ecologische bodemkwaliteit, heeft bereikt. Tijdens het reinigingsproces is geen toename van toxiciteit, mogelijk veroorzaakt door toxische metaboliëten, waargenomen en is ook geen sprake van toegenomen biologische beschikbaarheid ten gevolge van het reinigingsproces. De bioassays bevestigen hierbij de resultaten van de chemische analyses.

Dit betekent dat biologische sanering van de grond leidt tot een zodanige verbetering van de bodemkwaliteit dat testorganismen die model staan voor een normaal bodemecosysteem weer in de bodem kunnen functioneren. De actuele ecologische effecten van de restfractie na sanering zijn daarmee acceptabel. De restfractie kan in de loop van de tijd na sanering wel leiden tot een langzame desorptie van de verontreiniging waardoor verspreiding kan optreden en actuele effecten gaan optreden. Om dit te voorkomen zou een vorm van actief bodembeheer kunnen worden toegepast. Dit beheer zou moeten leiden tot een biologische afbraak van verontreiniging die biologisch beschikbaar komt zodanig dat risico's van verspreiding en blootstelling minimaal zijn. Dit kan op de locatie redelijk eenvoudig worden gerealiseerd door bijvoorbeeld een periodieke grondwaterpeilverlaging waardoor de bodem aëroob wordt of door periodieke persluchtinjectie. Continue persluchtinjectie zoals tijdens de actieve in-situ biorestauratie is dan niet nodig. De

mogelijkheden voor praktische implementatie van in-situ biorestauratie en actief bodembeheer op de locatie Petroleumhaven kunnen nu verder worden bepaald.

Momenteel is een beoordeling van actuele ecologische risico's middels bioassays nog niet ingebed in een wettelijk kader. In het kader van onderhavig project is een daarom een risicoevaluatie uitgevoerd volgens de huidige systematiek zoals beschreven in de Urgentiesystematiek [Koolenbrander, 1995].

Uit de modelstudie blijkt dat in de huidige (niet gesaneerde) situatie en bij het huidig gebruik er geen humane en/of ecologische risico's aanwezig zijn. Enkele indicatief uitgevoerde modelberekeningen laten zien dat bij een meer kritisch terreingebruik sprake zou kunnen zijn van ernstige risico's voor mens of ecosysteem. De bioassays laten zien dat de actuele risico's in de meest verontreinigde delen van het terrein groot zijn en er sterk negatieve effecten aanwezig zijn op het ecosysteem.

Op basis van de risicobeoordeling conform de saneringsurgentie systematiek [Koolenbrander, 1995] zou derhalve besloten kunnen worden (voorlopig) geen sanering uit te voeren, terwijl de actuele ecologische risicobeoordeling met bioassays laat zien dat een normaal functionerend ecosysteem ter plaatse sterke negatieve effecten van de aanwezige verontreiniging zal ondergaan. Het omgekeerde is het geval na sanering. De risicobeoordeling geeft aan dat nog steeds risico's aanwezig zijn indien wordt uitgegaan van benzine als oliesoort en ook de chemische analyses geven aan dat de grond niet schoon is: de concentraties variëren rond de tussenwaarde en interventiewaarde. De bioassays echter geven aan dat de actuele ecologische effecten vrijwel nihil zijn geworden. Dit betekent dat de bioassays zowel voor als na de sanering gevoelig meten en specifiek informatie geven over de ecologische bodemkwaliteit en dat bioassays in principe geschikt zijn voor het bepalen van actuele ecologische risico's.

Bioassays hebben daarmee bewezen een zeer bruikbaar instrument te zijn bij het beoordelen van de kwaliteit van verontreinigde grond. Acute bioassays leveren snel resultaat op en zijn daarmee geschikt als snelle screeningsmethode voor de aanwezigheid van toxisch effecten in bodemmateriaal. Voor het beoordelen van de ecologische effecten van een restverontreiniging lijken chronische bioassays meer geschikt. Deze bioassays bepalen langdurige effecten en zijn meer representatief voor processen in het bodemecosysteem.

Het beoordelen van het eindresultaat van in-situ biorestauratie kan daarom mede worden gebaseerd op de resultaten van chronische bioassays. Ook indien voor een locatie wordt overwogen om geen actieve ingreep te doen en natuurlijke afbraakprocessen te gebruiken om een bodemkwaliteitsverbetering te verkrijgen kunnen chronische bioassays worden ingezet om de actuele ecologische risico's van deze bodemverontreiniging te bepalen. In dit project is nog geen afweging gemaakt tussen het relatieve belang dat de verschillende bioassays hebben bij de uiteindelijke beoordeling van ecologische effecten. Zo kan geredeneerd worden dat acute sterfte van regenwormen zwaarder weegt dan een verminderde reproductie bij hetzelfde testorganisme. Ook tussen de verschillende testorganismen (bacteriën versus wormen) en testniveaus (acute bioassay versus chronische bioassays) kan een verschillende weging worden toegepast. Op dit moment echter zijn dermate weinig referentiegegevens beschikbaar dat het niet goed mogelijk is deze afweging te onderbouwen met veldgegevens.

Daarom wordt op dit moment het aantal bioassays dat een negatief effect vertoont als maat voor ecologische risico's beschouwd en worden alle bioassays gelijk gewogen. Op termijn als meer data beschikbaar komen zal het mogelijk worden om de beoordeling per test een wegingsfactor mee te geven waardoor de uiteindelijke risicobeoordeling gebaseerd is op een evenwichtige afspiegeling van effecten zoals gemeten in bioassays en daadwerkelijke risico's in het ecosysteem.

Voor een evenwichtige inschatting van de daadwerkelijke risico's voor een ecosysteem zullen naast bioassays ook metingen aan organismen in het veld uitgevoerd moeten worden. Deze benadering staat bekend onder de naam TRIADE benadering en is reeds met succes toegepast bij de beoordeling van waterbodems.

Het opzetten en testen van een TRIADE beoordeling van verontreinigde grond is onderwerp van het NOBIS TRIADE project dat als vervolg op het huidige NOBIS BIOASSAYS project recentelijk is gestart.

HOOFDSTUK 5

CONCLUSIES

- Bioassays zijn een effectief instrument voor het monitoren van in-situ biorestauratie en voor het bepalen van het milieurendement.
- Bioassays hebben duidelijk meerwaarde boven de huidige modelmatige afleiding van actuele risico's als het gaat om het daadwerkelijk bepalen van actuele ecologische risico's.
- Bioassays kunnen worden gebruikt als bevestiging van risico's die zijn bepaald door middel van de modelmatige afleiding of in situaties waarbij de modelmatige afleiding niet goed toepasbaar is: bodem dieper dan 0,5 meter en locaties kleiner dan 5000 m² of locaties waarbij de verontreinigingsgraad niet goed bekend is.
- Een extractiemethode voor het maken van waterige extracten ten behoeve van acute bioassays is geselecteerd en gevalideerd in veldmonsters en laboratorium experimenten.
- De acute bioassays Microtox, Daphnia, alg, en de chronische bioassays, uitgevoerd met grond, met worm (reproductie en groei), sla (kieming en biomassa), springstaart (overleving en reproductie) en Bait lamina (consumptie) sla (kieming), worm (reproductie) zijn geschikt voor het bepalen van ecologische effecten van bodemverontreiniging.
- Monsters met vergelijkbare totaal gehalten voor minerale olie bezaten verschillende toxiciteit hetgeen een aanwijzing is dat een concentratieniveau alleen geen goede indicatie is van de toxiciteit en het risico van een olieverontreiniging en dat bioassays inderdaad een meer gevoelige maat zijn voor actuele risico's.
- De resultaten van de bioassays dienen te worden beoordeeld ten opzichte van een niet of licht verontreinigd monster van de locatie met vergelijkbare eigenschappen, bij voorkeur is een concentratiegradiënt aanwezig in de monsters.
- Full scale biologische sanering zal waarschijnlijk leiden tot de vorming van een restfractie in de buurt van de tussen- en interventiewaarde.
- Deze restfractie na sanering in kolomproeven had geen toxische effecten in de geteste bioassays.
- Full scale in-situ biorestauratie lijkt een goed instrument om de bodemkwaliteit op de locatie Petroleumhaven te verbeteren en te komen tot acceptabele risico's van de restverontreiniging.
- Na implementatie van in-situ biorestauratie is een vorm van actief bodembeheer gewenst om de restfractie te beheersen.

LITERATUUR

AquaSense (1997). Beoordeling saneringsurgentie verontreinigde bodems met bioassays. In opdracht van: VROM / DGM Directie Bodem en AquaSense, Amsterdam. Rapportnummer: 97.0859b. Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS). Rapportnummer: 99.0881c.

Belfroid, A.C., Slijm, D.T.H.M., Gestel, C.A.M van. (1996). Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Reviews* 4, 279-299.

Bioclear (1999). Proefsanering locatie Petroleumhavenweg Amsterdam, projectnummer 97.889.

Bioclear, AquaSense, Kema, Witteveen+Bos, Vrije Universiteit Amsterdam, Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen en gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam (1998a). Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Deelresultaat 1: Inventarisatie en selectie van bioassays en extractiemethoden voor grond verontreinigd met minerale olie. Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS). Projectcode 96-1-13.

Bioclear, AquaSense, Kema, Witteveen+Bos, Vrije Universiteit Amsterdam, Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen en gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam (1998b). Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Deelresultaat 2: Resultaten van de veldscreening met bioassays, chemische en biologische parameters. Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS). Projectcode 96-1-13.

Bioclear, AquaSense, KEMA, Witteveen+Bos, Vrije Universiteit Amsterdam, Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen en gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam 1999. Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Deelresultaat 3: Biorestauratieproeven. In opdracht –van Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS). Bioclear projectcode 96-618.

Gestel, C.A.M., van, 1997. Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bioassays. In: Van Straalen, N.M. & Løkke, H. (eds.). 1997. *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil*. Chapman & Hall, London, 1997.

Guchte, C. van de, H. Eijsackers, P.J. den Besten, C.A.M. van Gestel, T. Aldenberg, T.P. Traas & Gunkel, J., K. Rönnpagel and W. Ahlf. 1993. Eignung mikrobieller Biotests für gebundene Schadstoffe. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 21: 215-220.

Kamerman, J.W., Gestel, C.A.M van. (1991). Beoordeling van gereinigde grond. III. De ontwikkeling van bioassays. RIVM rapportnummer 216402003.

Koolenbrander, J.G.M. (1995). Urgentie van bodemsanering, de handleiding. SDU Uitgeverij Den Haag.

Munckhof, G.P.M., van den, Veul, M.F.X., Gestel, C.A.M., van., Bloem, J. (1998). Bodemkwaliteitsparameters – Stimulering gebruik ecotesten. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 14. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, Wageningen.

OMEGAM (1996). Bodemonderzoek op het Landfarmterrein aan de Petroleumhavenweg te Amsterdam, in opdracht van het Gemeentelijk Havenbedrijf / Ingenieursbureau Amsterdam, kenmerk 11034807, mei 1996.

Sims, R.W., Gerard, B.M. (1985). Earthworms. Synopses of the British fauna (New series) no. 31. the Linnean Society of London and the Estuarine and Brachisch Water Science Association.

STOWA - Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (1997) Biomonitoringtechnieken voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 2: Keuzesysteem en praktijktoetsing.

Straalen, N.M. van, Gestel, C.A.M. van. (1993). Ecotoxicological test methods using terrestrial arthropods. Discussion paper for the OECD Test Guidelines Program. Vrije Universiteit, november 1993.

Straalen, N.M. van, Verkleij, J.A.C. (redactie) (1993). Leerboek ecotoxicologie. VU Uitgeverij, Amsterdam.

Tauw Milieu b.v. (1996). Csoil versie 6.3 1996. Lay-out aangepast door Witteveen+Bos Raadgevende ingenieurs b.v.

Overige literatuur

De volgende artikelen zijn in één of meerdere van de deelrapportages geciteerd:

Adema, D.M.M., de Boer, J.L.M., Gestel, C.A.M van, de Jong, P. (1987). De invloed van bodemreiniging op de biologische beschikbaarheid van metalen. (R 87/120) (TNO), 738507 001 (RIVM)): TNO/RIVM.

Ahlf, W., Gunkel, J., Rönnpagel, K. (1993). Toxicologische bewertung von Sanierungen. In: Hupe, K. (redaktion). Bodenreinigung. Biologische und chemisch-physikalische Verfahrensentwicklung unter Berücksichtigung der bodenkundlichen, analytischen und rechtlichen Bewertung. Dokumentation des 2. SFB 188-Seminars in Hamburg 1993. Economica Verslag.

Alef (1991). Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Ecomed. ISDN 3-609-65960-2.

Ankley, G.T.1991. Predicting the toxicity of bulk sediment to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs. elutriate. Environ. Tox. Chem. 10:1359-1366.

AquaSense (1995). Chronische en acute toxiciteitstesten met de terrestrische springstaart *Folsomia candida*. AquaSense, Amsterdam. Stageverslag.

AquaSense (1996). Acute bioassay met de terrestrische springstaartensoort *Folsomia candida*. Verbetering van de methode en onderzoek naar de toepasbaarheid. AquaSense, Amsterdam. Rapportnummer 96.0859a.

AquaSense. 1997a. Beoordeling toxiciteit van verontreinigde grond uit uiterwaarden. Beoordeling met behulp van bioassays met de terrestrische springstaart *Folsomia candida*. In opdracht van Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling. AquaSense, Amsterdam.

ASTM. 1990. Standard guide for conducting seed germination and root elongation soil elutriate chronic toxicity bioassay (Draft). Annual Book of ASTM Standards. 20p.

Baun, A., N. Nyholm, J.V. Stoyanov & K.O. Kusk. 1997. Application of algal test on soil suspensions for assessing potential bioavailable toxicity, In-situ and On site Bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28- may 1, volume 4, 1-3.

BBA. 1994. BBA Guideline. Part VI, 2-2.

Becker van Slooten, K, D. Rossel, A. Kunze, C. Pecoud, M. Gruber, J. Tarradallas & P. Vioget (1996). Ecotoxicological risk assessment of landfills. Presentation at the 4th European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, SECOTOX '96, Metz, 25. - 29.8.96.

Belfroid, A.C. 1994. Toxicokinetiek en biologische beschikbaarheid van organische contaminanten voor de regenworm in Vogelmeerpoldergrond, Bodembreed 6^e National Symposium Bodemonderzoek, Programmabureau Bodemonderzoek, Wageningen.

Bierkens, J., G. Klein & G. Schoeters (Eds.). 1997. De gevoeligheid van 20 bioassays voor bodem: een vergelijkende studie. Eindverslag. Rapportnr. TOX.RB97001, Project Natuurgebieden. Vlaamse Instelling voor Technol. Onderzoek VITO, Mol, België. 120p.

Bioclear, AquaSense, KEMA Environmental Services & Witteveen+Bos. 1997. Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Nobis basisprojectplan. Versie 1.2. Projectnr. 96-1-13.

Botterweg, J. (red.) (1996). RIZA Handboek: Toxicologie en lozingsvergunningen (concept). Hoofdafdeling Emissies-procestechnologie, Hoofdafdeling Watersystemen-ecotoxicologie. RIZA, Lelystad. Notanr. 96.045, ISBN-nr. 903695004X.

Bouwens, S. (1998). Bioassays ter beoordeling van het ecologisch risico in olieverontreinigde grond. Stageverslag Vrije Universiteit, vakgroep Ecologie en Ecotoxicologie, afdeling Dier-ecologie, Amsterdam.

Bowers, N., J.R. Pratt, D. Beeson & M. Lewis. 1997. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. Environmental Toxicology and Chemistry. 16(2): 207-213.

Brils, J.M. (1991). Opname van cadmium door *Folsomia candida* (W) (Collembola). Scriptie, Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie van Dieren, Vrije Universiteit, Amsterdam, december 1991, 14p.

Brils, J.M., den Besten, P.J. (1997). Bioassays: Het orakel van de ecotoxicologie? In opdracht van: Programma Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems (POSW) fase II (1992-1996). RIZA Nota 97.048.

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

C.A. Callahan & J.C. Geene. 1986. Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 487-501.

De Pauw, N., C. Janssen & G. Persoone. 1992. Biologische en toxicologische monitoring van het aquatische milieu. *Verhandelingen van de Fac. L & TBW, Univ. Gent*, 32, 7/1-21, PUO, 2 december.

De Sloovere, A. (1995). Ontwikkeling van een kosten-effectieve toxiciteitstest met de springstaart *Folsomia candida*. Universiteit Gent, faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen, Gent. 124p.

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

DECHEMA 1995. Biologischer Testmethoden für Böden. Adhoc-Arbeitsgruppe " Methoden zur Toxicologischen/Ökotoxicologischen Bewertung von Böden. Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA). Interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie - Boden". 4, Frankfurt am Main, 46p.

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

ECHA (1997). Biocide monitor II. ECHA Microbiology LTD. Microbiological Testing and Advisory Services Suppliers of ECHA products, Cardiff U.K.

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

Forge, T.A., M.L. Berrow, J.F. Darbyshire & A. Warren. 1993. Biology and fertility of soils 16: 282-286

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

Gälli, R., C.D. Munz & R. Scholz. 1993, Evaluation and application of aquatic toxicity test, use of the Microtox test for the prediction of toxicity based upon concentrations of contaminants in soils, *Hydrobiologica* 275, 179-189.

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

Gestel, C.A.M., van, Dirven-van Breemen, E.M. & Kamerman, J.W., 1992a. Beoordeling van gereinigde grond. IV. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegronden. RIVM, Bilthoven. 79p.

Gestel, C.A.M., van, Dirven-van Breemen, E.M. & Kamerman, J.W., 1992b. Beoordeling van gereinigde grond. V. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op verontreinigde en gereinigde gronden. RIVM, Bilthoven. 79p.

Gezondheidsraad (1991). Kwaliteitsparameters voor terrestrische en aquatische bodemecosystemen. Een selectie van hanteerbare ecotoxicologische toetsen. Advies uitgebracht door de Gezondheidsraadcommissie Kwaliteitsparameters voor terrestrische en aquatische bodemecosystemen. No. 1991/17. Den Haag. 161p.

Giesy, J.P., C.J. Rosiu & R.L. Graney. 1990. Benthic invertebrate bioassay with toxic sediment and pore water. *Environmental toxicology and Chemistry* 9: 233-248.

Green A.S., G.T. Chandler & E.R. Blood. 1993. Aqueous-, porewater- and sediment-phase cadmium: toxicity relationships for a meiobenthic copepod, *Environ. Tox. Chem.* 12:1497-1506.

Greene, J.C., C.I. Bartels, W.J. Warren-hicks, B.R. Parkhurst, G. Linder, S.A. Peterson & M.J. Miller. 1989. Protocol for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA 600/3-88-029. 102p.

Griest, W.H., A.J. Stewart, R.L. Tyndall, J.E. Caton, D.H. Ho, K.S. Ironside, W.M. Caldwell & E. Tan. 1993. Chemical and toxicological testing of composted explosives-contaminated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1105-1116.

Guchte, C. van de, Eijsackers, H., den Besten, P.J., van Gestel, C.A.M., Aldenberg, T., Traas, T.P., Ruiter, P.C. de. (1996). Ecotoxicologische risico-beoordeling van verontreinigde (water) bodems. Hoe verder? . Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 2. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, Wageningen.

Gunkel, J., W. Ahlf, K. Rönnpagel. 1993. Toxikologische Bewertung von Sanierungen. **In:** Bodemreinigung. Biologische und chemische-physikalische Verfahrensentwicklungen unter Berücksichtigung der bodenkundlichen, analytischen und rechtlichen Bewertung. (ed. R. Stegman), Economica Verlag, Bonn. p275-286.

Gupta, S.K. 1991. Soil Interaction Assessment of ecotoxicological risk of accumulated metals in soils with help of chemical methods standardized through biological tests. In *Heavy Metals in the Environment*, Ed.

Haanstra, L., P. Doelman & J.H. Oude Voshaar. 1985. The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. *Plant Soil*, 84:293-297.

Harkley, G.A., P.F. Landrum & S.J. Klaine. 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays, *Environ. Tox.*

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

Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (editors). (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the "workshop on sediment toxicity assessment", held at Slot Moermond congresscentrum, Renesse, The Nether-

lands, 8-10 november. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe (SETAC-Europe).

Hsu, F.C., M. Singh & S. Cunningham. 1997. Ecotoxicological and human toxicology studies on weathered petroleum-contaminated soils, Situ and On site Bioremediation, Papers of the fourth international symposium, New Orleans, april 28- may 1, volume 4, 17.

Hulzebos, E.M., E.M. van Breemen, W.A. van Dis, C.A.M. van Gestel en H.A. Herbold. 1988. De toxiciteit van een aantal prioritaire stoffen voor sla. Interimrapportage van het RIVM aandeel in het project Fytotoxiciteit 2. RIVM rapportnummer 718710001.

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

ISO (1998) Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. International Standardization Organisation.

ISO 6341 (1996). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Acute toxicity test.

ISO 8692 (1989). Water Quality – Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

ISO NNI. 1991. Bodem - Bepaling van het effect van chemische stoffen op de reproductie bij regenwormen. (Ontwerp NEN voorschrift / draft NEN guideline Ontwerp NEN 5797). Delft, Nederlands Normalisatie Instituut.

ISO NNI. 1997. International standard ISO FDIS 11268-2. Soil quality - Effect of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Delft.

ISO NNI. 1998. International standard ISO DIS 11267. Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Delft.

ISO. 1993a. ISO 11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.

ISO. 1993b. ISO 11269-1: Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of root growth

ISO. 1995. ISO 11269-2: Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.

ISO. in prep. C. ISO/TC 190/SC 4 N 126: Bioassays using soil algae.

IWACO. 1991. Evaluatie van de bruikbaarheid van uitloogextracten voor het uitvoeren van biologische test, Rapportnr 10.23180.

Jenner, H.A. 1995. Assessment of ecotoxicological risks of element leaching from pulverized coal ashes proefschrift. Landbouw Universiteit Wageningen.

Kammenga, J.E. (1995a). Phenotypic plasticity en fitness consequences on nematodes exposed to toxicants. Proefschrift, Landbouwuniversiteit, Wageningen. 112p.

Kammenga, J.E. (1995b). Cursushandleiding nematoden in milieustudies. G100-203. Landbouw Universiteit Wageningen, vakgroep Nematologie.

Kammenga, J.E. 1995. Phenotypic plasticity en fitness consequences on nematodes exposed to toxicants. Proefschrift, Landbouwuniversiteit, Wageningen. 112p.

Kampbell, D.H. en J.T. Wilson. 1991. Bioventing to treat fuel spills from underground storage tanks. *J. Hazard. Mat.* 28:75-80.

Keddy, C., J.C. Greene & M.A. Bonnell (1994). A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada. Scientific Series No. 198. Ecosystem conservation directorate evaluation and interpretation branch. Ottawa, Ontario, Canada. 185p.

Kehres, B., R.Gottschall & H. Vogtmann. 1994. Bestimmung und Bewertung der Pflanzenverträglichkeit von Kompost mit Sommergerste. *Müll und Abfall* 4/94: 238-243.

KEMA. 1996. Ontwikkeling van een snelle detectiemethode voor de verontreinigingsgraad van bodemonsters met behulp van een directe toxiciteitsmeting, rapportnr 64780-KES/WBR 96-3119.

Keuning, S., J.J. van der Waarde (1997). Bodem

Klepka, S., M. Groer, R. Petto, C. Rutschmann-Fröhlich & S. Schmitzer. 1997. Ökotoxikologische Prüfverfahren in der Sanierungsbegleitung. Presentation at the 'Zweite deutschsprachige SETAC Tagung', Aachen, 24 & 25 februari.

Krantzberg, G. & D. Boyd. 1992. The biological significance of contaminants in sediment from hamilton harbour, Lake Ontario, *Environ Toxicol Chem* 11, 1527-1540.

Kratz, W. 1998. The bait-lamina test - general aspects, applications and perspectives. *Pedobiologia* (submitted).

Larink, O. 1993. Bait lamina as a tool for testing feeding activity of animals in contaminated soils. In Donker, M.H., Eijsackers, H., Heimbach, F. (Eds.), *Ecotoxicology soil organisms*, Lewis Publishers, Baton Rouge, p. 339-345.

Leeuwen, C.J., van & Hermens, J.L.M. (eds.). 1995. *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. Kluwer Academic Publishers.

Liu, D. 1981. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull. Environ. Contam.*

Loehr R.C. & M.T. Webster. 1997. Changes in toxicity and mobility resulting from bioremediation processes. *Bioremediation Journal* 1(2): 149-163.

Loehr, R.C., Webster, M.T. (1997). Changes in toxicity and mobility resulting from bioremediation processes. *Bioremediation Journal* 1, 149-163.

Løkke, H & C.A.M. van Gestel (1998). *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester (in press).

Ma, W.Ch., H.Siepel & J.H. Faber. 1997. Onderzoek naar mogelijke ecotoxicologische effecten van bodemverontreiniging in de uiterwaarden op de terrestrische invertebratenfauna. IBN-rapport 289. Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek IBN-DLO, Wageningen.

Ma, W.Ch, Immerzeel, J., Bodt, J. (1995) Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: Studies on phenanthrene and fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 226-232.

Maas, J.L. & Grootelaar, E.M.M. 1992. Triade ringonderzoek. Operationele uitwerking. Het bepalen van de toxiciteit van sediment en poriewater m.b.v. bioassays. Rijkswaterstaat en RIZA AOCE nr 92-08.

Maas, J.L. (1995). Interne memo Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, RIZA, Lelystad. WSC Ecotoxicologie.

Maas, J.L., Guchte, C., van de & Kerkum F.C.M. (1993). Methode beschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering. Methodebeschrijvingen voor enkele bioassays, bioaccumulatiemetingen en veldstudies. Notanr. 93.027, Rijkswaterstaat RIZA, juli 1993.

Marwood, M.T., Knoke, K., Yau, K., Lee, H., Trevors, J.T., Suchorski-Tremblay, A., Flemming, C.A., Hodge, V., Liu, D.L., Seech, A.G. (1998). Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environmental Toxicology and water quality* 2, 117-126.

Meier, J.R., L.W. Chang, S.Jacobs, J.Torsella, M.C. Meckes & M.K. Smith. 1997. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Envir. Toxicol.Chem.* 16(5): 928-938.

Meinerling, M. 1997. Wirkungsprüfung kontaminierter Böden auf wirbellose Bodemorganismen. Presentation at the 'Zweite deutschsprachige SETAC Tagung', Aachen, 24 & 25 februari 1997. In Zusammenarbeit mit IBACON GmbH, Rossdorf.

Ministerie van VROM. (1997). Circulaire bepaling saneringstijdstip voor gevallen van ernstige bodemverontreiniging waarvoor sanering urgent is. *Staatscourant* 7 maart 1997, nr. 47.

Muijs, B. 1997. Bruikbaarheid van bioassays ter beoordeling van de toxiciteit van verontreinigde bodems. Stageverslag Vrije Universiteit te Amsterdam, vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie, afdeling Dieroecologie

Munckhof, G.P.M. van den, Veul, M.F.X. (1994). Milieuhygiënische beoordeling van het biologisch reinigingsproces van met olieproducten verontreinigde grond door middel van uitloogproeven en bioassays. Samenvattingen Nationaal Symposium Bodem Breed. 6 en 7 december 1994. *De Blijde Wereld*, Lunteren, 142-144.

Munckhof, G.P.M. van den, Veul, M.F.X., Gestel, C.A.M van, Bloem, J. (1998). Bodemkwaliteitsparameters – Stimulering gebruik ecotesten. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 14. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, Wageningen.

Nebeker A.V. et al. 1984. Biological methods for determining of contaminated freshwater sediments to invertebrates *Environ. Tox. Chem.* 3: 617-630.

NEN 6501 (1980). Water. Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Daphnia magna*. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN 6506 (1984). Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van algen. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN. 1988. NEN 5794: Bodem - Bepaling van de acute toxiciteit van chemische stoffen voor regenwormen.

NEN. 1991. NEN 5797: Bodem - Bepaling van het effect van chemische stoffen op de reproductie bij regenwormen. In ontwikkeling.

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

Norusis, M.J. (1992). SPSS for Windows. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc. Chicago).

Noteboom, J. & L. Posthuma (eds.). 1995. Validatie toxiciteitsgegevens en risicogrenzen bodem: voortgangsrapportage 1994. RIVM-rapportnr. 719102045, TNO-rapportnr. MW-R 95/052.

NPR 6503 (1980). Water - Benodigdheden, Werkwijze en medium voor het kweken van *Daphnia magna* en van de hiervoor als voedsel benodigde algen.

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

OECD (1984a). OECD guideline for testing of chemicals 208: "Terrestrial Plants, Growth test". 4 April OECD Guideline 208. 6p.

OECD (1984b). OECD guideline for testing of chemicals 207: "Earthworm, Acute toxicity tests". OECD Guideline 207.

OECD (in prep). Enchytraeid Reproduction Test

OECD 201 (1984). Alga, growth inhibition test. OECD guideline for testing of chemicals. OECD, Paris, France, 201 adopted 7.07.84.

OECD 202 (1984). *Daphnia* sp., acute immobilization and reproduction test. OECD guideline for testing of chemicals. OECD, Paris, France, 202 adopted 04.04.84.

OECD 202 part II (1993). Draft OECD test guideline 202 part II, *Daphnia magna* reproduction test to be used in the final ring test. Paris, France.

P.C. de Ruiter (1996). Ecotoxicologische risico-beoordeling van verontreinigde (water)bodems. Hoe verder? Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek.

Persoone, G., M. Goyvaerts, C. Janssen, W.de Coen & M. Vangheluwe. 1993. Cost effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits. Final Report. Comm. of the Europ. Comm. Contractnr. ACE 89/BE 2/D3.

PGBO. 1997. Bodemkwaliteitsparameters stimuleren gebruik ecotesten. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek deel 14, Wageningen.

- Porcella, D.B. 1983. Protocol for bioassessment of hazardous waste sites. EPA 600/2-83-054. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis. OR.
- Pratt, J.R., M. Hummel & Z. Xu. 1996. Rapid estimation of toxicity using soil ciliates. Bull. Environ. Toxicol. Chem. (in press).
- Rijn, J.P. van, Straalen, N.M van., Willems, J. (1995). Handboek bestrijdingsmiddelen. Gebruik en Milieu-effecten. VU Uitgeverij, Amsterdam, 670 p.
- RIVM. 1993. Toxiciteitsmetingen m.b.v. de Microtox methode aan poriewater en poriewater-concentraten van sedimenten uit enkele regionale wateren in Noord -Holland, RIVM rapportnr 719102 024.
- RIVM. 1994. Beperkt ringonderzoek met de kolomproef voor polycyclische koolwaterstoffen (PAK),
- RIVM. 1995a. Emissie van polycyclische koolwaterstoffen (PAK) uit diverse bouwmaterialen en afval-stoffen, RIVM rapportnr 771402003.
- RIVM. 1995b. Verschil tussen centrifugeren en filtreren van eleuaten van uitloogproeven voor polycyclische koolwaterstoffen (PAK) organochloorbestrijdingsmiddelen (OCB) en plichloorbifenylen (PCB),
- RIVM. 1996a. Ontwikkeling van uitloogproeven voor minerale olie, RIVM rapportnr 771402 020.
- RIVM. 1996b. Uitloging van PCB's en EOX uit afvalstoffen met kolom, cascade, en aangepaste CEN-rpeof (materiaalonderzoek), RIVM rapportnr 771402 021.
- RIZA (1991). Interne Standaard Procedure, AOCE/03. Handleiding voor het kweken van de eencellige groenalgen.
- RIZA Interne Standaard Procedure, AOCE/02 (1991). Handleiding voor het kweken van de watervlo *Daphnia magna*.
- Römbke J. & T. Knacker. 1989. Aquatic toxicity test for enchytraeids. Hydrobiologia 180: 235-242.
- Ronday, R. & N.W.H.Houx. 1996. Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. Pedobiologia 40: 106-112.
- Ronday, R. 1996. Hoeveel last hebben bodemdieren van verontreinigde grond? Bodem 3: 120-122.
- Ronday, R., Kammen-Polman, A.M.M. van, Dekker, A., Houx N.W.H. & Leistra M. 1997. Persistence and toxicological effects of pesticides in topsoil: use of the equilibrium partitioning theory. Environmental Toxicology and Chemistry 16(4): 601-607.
- Rudolph, P. & R. Boje. 1986. Ökotoxikologie. Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung nach dem Chemikaliengesetz. Ecomed Verlag, Landsberg/Lech.

Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Heusemann, M.H., More, K.O., Rhodes, I.A., Rice Jackson, L.M., Vipond, T.E., Western, M.M., Wisniewski, H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicology assessment. *Environmental Science and Technology* 31, 1769-1776.

Sanchez. A. F.A & L. Postuma. 1995. Sublethal effects and kinetics of PAHs in *Eisenia andrei* Worms, Bodembreed 7^e National Symposium Bodemonderzoek, Programmabureau Bodemonderzoek, Wageningen.

Schouten, A.J. & I.R. van der Brugge (1989). Acute toxiciteit van aluminium en H⁺-ionen concentratie voor bodemnematoden uit een zuur en kalkrijk dennebos. 1) Ontwikkeling en toepassing van een toets in waterig medium. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne RIVM. Rapport nr. 718603001, 67p.

Simini. M et AL.1995. Evaluation of soil toxicity at joliet army ammunition plant, *Environ. Tox.*

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

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

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

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

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

STOWA-rapportnummer 97-27.

STOWA – Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (1997b). Ecotoxicologische risicobeoordeling van verontreinigde waterbodems. STOWA-rapportnummer 97-42.

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

Straalen, N.M., van & Verkleij, J.A.C., 1991. Leerboek Oecotoxicologie. VU Uitgeverij, Amsterdam 1991.

Tang, C.S. & A.C. Waiss, Jr. (1978). Short-chain fatty acids as growth inhibitors in decomposing wheat straw. *J. Chem. Ecol.* 4: 225 - 232.

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

Thomas, J.M., J.R. Skalski, J.F. Cline, M.C. McShane, J.C. Simpson, W.E. Miller, S.A. Peterson, Tidepool (1993). ToxCalc user's guide. Comprehensive toxicity data analysis and database

software. Version 4.0 for Microsoft Excel under Windows 3.1 or Apple Macintosh. Tidepool Scientific Software.

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

U.S. EPA - Environmental Protection Agency (1989). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.-EPA-600/4-89/001, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH.

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

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

Vernet, J.P., Elsevier, Amsterdam, 38-55.

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

Von Törne, E. 1990. Assessing feeding activities of soil living animals. I. Bait lamina tests. *Pedobiologia* 34, 89-101.

Waarde, J.J., van der, Dijkhuis, E.J., Heijs, S.K., Henssen, M.J.C. and Keuning, S. 1995b Monitoring and bioventing of soil contaminated with mineral oil. *In: R.E. Hinchee, R.N. Miller and P.C. Johnson (Eds.), In-situ Aeration: air sparging, bioventing and related remediation processes* 3(2), p. 409-417. Batelle press, Columbus.

Waarde, J.J., van der, Dijkhuis, E.J., Henssen, M.J.C. and Keuning, S. 1995a. Enzyme assays as indicators for biodegradation. *In: R.E. Hinchee, R.N. Miller and P.C. Johnson (Eds.), Monitoring and verification of bioremediation* 3(5), p. 59-63. Batelle press, Columbus.

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

Wenzel, A. 1997. Kurzzeit-Biotests zur Bodembeurteilung. Fruanhofer-Institut für Umweltchemie und ökotoxikologie, Abt. Biochemische ökotoxikologie, Bergholz Rehbrücke, D. Presentatie Zweite deutschsprachige SETAC Tagung, 24&25-02-1997, Aachen.

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

Witteveen+Bos. 1997. Bodemkwaliteitsparameters - stimulering gebruik ecotesten. Concept 02. In opdracht van: Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (PGBO). Witteveen+Bos Raadgevende ingenieurs, Deventer. 40p.