

Ecologische risicobeoordeling van bodemverontreiniging met behulp van een Triade benadering

Deelrapportage bioassays

Ecologische risicobeoordeling van bodemverontreiniging met behulp van een Triade benadering

Deelrapportage bioassays

| | |
|------------------------|---|
| in opdracht van | Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS) |
|------------------------|---|

| | |
|-----------------------------|---|
| uitvoering | ing. C.M. Keijzers; ing. S. Lücker; ing. C. Swolfs; S. Dalloesing; F. Kaiouh; D. Brouwer; B. van der Lingen; ir. J.G.M. Derksen |
| namens opdrachtgever | ing. J.H.A.M. Verheul |

| | | |
|----------------------|---------------------------|---------------|
| rapportnummer | code opdrachtgever | status |
| 0881-4c | 98-1-28 | Eindrapport |



| | | | |
|--------------------|--------------------|---------------|--------------|
| autorisatie | naam | paraaf | datum |
| opgemaakt | ir. J.G.M. Derksen | | 01-11-00 |
| goedgekeurd | Dr. J.F. Postma | | 01-11-00 |

AquaSense

Kruislaan 411a
Postbus 95125
1090 HC Amsterdam
telefoon 020-5922244
telefax 020-5922249

Url=<http://www.aquasense.com>

Citeren als: AquaSense (2000). Ecologische risicobeoordeling van bodemverontreiniging met behulp van een Triade benadering. Deelrapportage bioassays - In opdracht van : Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering (NOBIS). Rapportnummer: 0881-4c.

© AquaSense - Het copyright van deze notitie is nadrukkelijk voorbehouden aan AquaSense. Niets uit dit rapport mag op enigerlei wijze worden vermenigvuldigd zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van AquaSense, noch mag het zonder dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander doel dan waarvoor het is vervaardigd. Het is de opdrachtgever toegestaan vrijelijk copieën van deze notitie te maken. Dit rapport is gedrukt op chloorvrij gebleekt papier. De omslag is gemaakt van PVC-vrije kunststof.

Inhoud

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Inleiding | 1 |
| 2. | Methode | 5 |
| 2.1. | Monsters en monstervoorbehandeling | 5 |
| 2.2. | Biologische bepalingen..... | 7 |
| 2.2.1. | Microtoxtest | 8 |
| 2.2.2. | Kiemings- en groeitest met sla (Lactuca sativa) | 9 |
| 2.2.3. | Regenwormenreproductietest | 10 |
| 2.2.4. | Bait lamina test..... | 11 |
| 2.3. | Uitwerking en interpretatie..... | 12 |
| 2.3.1. | Uitwerking | 12 |
| 2.3.2. | Statistische analyse | 14 |
| 2.3.3. | Classificatie | 14 |
| 3. | Resultaten | 17 |
| 3.1. | Geldigheidscriteria..... | 17 |
| 3.2. | Locatie Bornia | 18 |
| 3.2.1. | Microtoxtest..... | 18 |
| 3.2.2. | Slatest | 19 |
| 3.2.3. | Regenwormenreproductietest | 19 |
| 3.2.4. | Bait lamina test..... | 22 |
| 3.3. | EPON locatie | 23 |
| 3.3.1. | Microtoxtest..... | 23 |
| 3.3.2. | Slatest | 25 |
| 3.3.3. | Regenwormenreproductietest | 26 |
| 3.3.4. | Bait lamina test..... | 28 |
| 3.4. | Locatie NAM Schoonebeek..... | 28 |
| 3.4.1. | Microtoxtest..... | 30 |
| 3.4.2. | Slatest | 30 |

| | | |
|------|---|----|
| | 3.4.3. Regenwormenreproductietest..... | 31 |
| | 3.4.4. Bait lamina test..... | 32 |
| 3.5. | Locatie SBNS - Kerkrade West..... | 33 |
| | 3.5.1. Microtoxtest..... | 34 |
| | 3.5.2. Slatest | 34 |
| | 3.5.3. Regenwormenreproductietest..... | 37 |
| | 3.5.4. Bait lamina test..... | 38 |
| 3.6. | Locatie Petroleumhaven..... | 38 |
| | 3.6.1. Microtoxtest..... | 38 |
| | 3.6.2. Slatest | 41 |
| | 3.6.3. Regenwormenreproductietest..... | 42 |
| | 3.6.4. Bait lamina test..... | 44 |
| 3.7. | Gasfabrieksterrein Oude Pekela | 45 |
| | 3.7.1. Microtoxtest..... | 45 |
| | 3.7.2. Slatest | 45 |
| | 3.7.3. Regenwormenreproductietest..... | 47 |
| | 3.7.4. Bait lamina test..... | 49 |
| 3.8. | Correlatie regenwormenreproductietest en bait lamina test | 50 |
| 4. | Discussie | 53 |
| 4.1. | Locatie Bornia | 53 |
| | 4.1.1. Microtoxtest..... | 53 |
| | 4.1.2. Slatest | 54 |
| | 4.1.3. Regenwormenreproductietest..... | 54 |
| | 4.1.4. Bait lamina test..... | 55 |
| 4.2. | EPON locatie | 55 |
| | 4.2.1. Microtoxtest..... | 56 |
| | 4.2.2. Slatest | 56 |
| | 4.2.3. Regenwormenreproductietest..... | 56 |
| | 4.2.4. Bait lamina test..... | 57 |
| 4.3. | Locatie NAM Schoonebeek..... | 57 |
| | 4.3.1. Microtoxtest..... | 57 |
| | 4.3.2. Slatest | 58 |
| | 4.3.3. Regenwormenreproductietest..... | 58 |
| | 4.3.4. Bait lamina test..... | 59 |
| 4.4. | Locatie SBNS - Kerkrade West..... | 59 |
| | 4.4.1. Microtoxtest..... | 59 |
| | 4.4.2. Slatest | 59 |
| | 4.4.3. Regenwormenreproductietest..... | 60 |
| | 4.4.4. Bait lamina test..... | 60 |
| 4.5. | Locatie Petroleumhaven..... | 61 |
| | 4.5.1. Microtoxtest..... | 61 |
| | 4.5.2. Slatest | 61 |
| | 4.5.3. Regenwormenreproductietest..... | 62 |
| | 4.5.4. Bait lamina test..... | 62 |
| 4.6. | Gasfabrieksterrein Oude Pekela | 63 |
| | 4.6.1. Microtoxtest..... | 63 |

| | |
|--|----|
| 4.6.2. Slatest | 63 |
| 4.6.3. Regenwormenreproductietest | 64 |
| 4.6.4. Bait lamina test..... | 64 |
| 4.7. Correlatie regenwormenreproductietest en bait lamina test | 64 |
| 5. Conclusie | 67 |
| 6. Literatuur | 71 |
| Bijlagen | 73 |

1. Inleiding

Eén van de drie onderdelen van een TRIADE-onderzoek is het bepalen van de toxiciteit van verontreiniging(en). Hiervoor worden bioassays gebruikt.

Bioassays zijn gestandaardiseerde laboratoriumexperimenten waarin meestal lagere diersoorten worden blootgesteld aan een (extract van een) te beoordelen milieumonster (afvalwater, waterbodem, grond enz.). Het doel van bioassays is het beoordelen of de aanwezige verontreinigingen in het monster in die mate beschikbaar zijn dat ze negatieve effecten veroorzaken bij de testorganismen. Een negatief effect is bijvoorbeeld de remming van de groei of reproductie of in het uiterste geval sterfte. Het grote voordeel van bioassays is dat hiermee deze effecten daadwerkelijk worden gemeten. Dit in tegenstelling tot chemische analyses waarmee geen effecten maar slechts gehalten van een beperkt aantal stoffen worden gemeten. Op basis van gehalten kan hooguit een voorzichtige voorspelling van de effecten worden gegeven (Brils & den Besten, 1995).

Bioassays worden onderverdeeld in acute en chronische bioassays. De term acuut of chronisch wordt bepaald door de duur van de blootstelling ten opzichte van de generatieduur van het testorganisme. Over het algemeen duren chronische bioassays langer en testen ze subletale effectparameters zoals reproductie en groei. Acute bioassays hebben een relatief korte blootstellingsduur en testen effectparameters zoals sterfte en enzymactiviteit. Chronische (langdurende) bioassays hebben in vergelijking met acute (kortdurende) bioassays een meer realistische blootstelling (grond i.p.v. een waterige extract van de grond). Het duurt echter lang voordat de resultaten bekend zijn. Acute bioassays geven snel resultaten, maar zijn over het algemeen minder gevoelig. Afwezigheid van acute negatieve effecten geeft nog geen uitsluitsel over mogelijke negatieve effecten op lange termijn.

Uit de literatuur blijkt dat tussen verschillende soorten testorganismen grote verschillen in gevoeligheid voor specifieke toxicanten bestaan. Daarnaast kan de biologische beschikbaarheid van stoffen in de bodem

aanzienlijk verschillen per organisme. Met name in situaties waar een complex mengsel¹ van verontreinigingen aanwezig is, is het daarom zeer lastig om te voorspellen welke bioassay het meest gevoelig zal zijn. Daarom wordt in het algemeen aanbevolen om een *testbatterij* met verschillende bioassays toe te passen. De samenstelling van een dergelijke testbatterij van verschillende bioassays is afhankelijk van het doel van het onderzoek. De voor dit onderzoek gekozen testbatterij bioassays is geselecteerd op basis van de resultaten van het NOBIS-project 'Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in situ biorestauratie' (Bioclear *et al.*, 1998b). De testbatterij is reeds enkele malen toegepast voor de beoordeling van verontreinigde bodems.

De gekozen testbatterij omvat organismen uit verschillende trofische niveau's (bacteriën, planten en consumenten) en met verschillende functies binnen het ecosysteem (o.a. omzetten van organisch materiaal, productie van organisch materiaal, stimuleren van de nutriëntencycli, verbetering van de bodemstructuur en dienen als voedsel voor andere organismen). Drie van de vier bioassays maken gebruik van algemeen geaccepteerde en veel gebruikte testorganismen (*Vibrio fischeri*, *Lactuca sativa* en *Eisenia andrei*, zie hieronder). Dit heeft als voordeel dat er enige informatie is over de ecologische behoeften (o.a. ten aanzien van vochtgehalte en pH) voor deze soorten en dat er relatief veel toxiciteitgegevens bestaan die als referentie kunnen dienen.

Het betreft de volgende bioassays:

1. De Microtoxtest met de bacterie *Vibrio fischeri*. Deze bacterie zendt onder normale omstandigheden licht uit. Dit verschijnsel wordt bioluminescentie genoemd. In deze test wordt afname in de bioluminescentie na 5, 15 en 30 minuten gemeten.
2. Een chronische kiemings- en groeitest met sla (*Lactuca sativa*). Methode gebaseerd op ISO 11269-2 (1995). In deze test worden slazaadjes gezaaid op de te onderzoeken grond. Na twee weken wordt het kiemingspercentage bepaald en worden de plantjes uitgedund. Na vier weken wordt de biomassa (natgewicht) van de plantjes bepaald.
3. Een chronische reproductietest met de regenworm *Eisenia andrei*. Methode gebaseerd op ISO 11268-2 (1998). Deze test duurt in totaal acht weken. Na vier weken worden overleving en groei van de volwassen wormen bepaald en wordt het aantal geproduceerde cocons geteld. Deze cocons krijgen vervolgens vier weken de tijd om uit te komen.
4. De Bait lamina test.
Deze test wordt gecombineerd met de regenwormentest. De test bestaat uit plastic stripjes met daarin gaatjes. Deze gaatjes zijn gevuld met een substraat (cellulose, tarwezemelen en sporen actief kool). De snelheid waarmee de gaatjes worden leeggegeten is een maat voor de activiteit van zowel micro-organismen als bodemorganismen. De testduur bedraagt 4 weken.

¹ Complex mengsel = mengsel dat bestaat uit vele verschillende stoffen/verbindingen, met verschillende werkingsmechanismen.

In dit project zijn in totaal zes locaties onderzocht volgens de TRIADE-methode. De resultaten van de bioassays van locatie Bornia en de EPON-locatie zijn reeds eerder beschreven in AquaSense (1999). Deze locatie zijn in deze rapportage wederom opgenomen, tezamen met de resultaten van de bioassays van de vier overige locaties.

In hoofdstuk 2 worden de gebruikte materialen en methoden toegelicht. De resultaten worden in hoofdstuk 3 besproken en in hoofdstuk 4 bediscussieerd. De conclusies staan in hoofdstuk 5.

2. Methode

In dit hoofdstuk worden achtereenvolgens de geteste monsters plus de monstervoorbehandeling, de uitvoering van de bioassays en de wijze van uitwerking van de resultaten toegelicht.

2.1. Monsters en monstervoorbehandeling

Monsters

Per locatie zijn voor de bioassays door IWACO 7 monsters van elk 10 liter aangeleverd. In deze monsters is door IWACO het gehalte van de verontreinigende stof of stoffen, het organisch stofgehalte, het lutumgehalte en een aantal andere fysische en chemische eigenschappen bepaald (zie deelrapportage van IWACO). De monsters vormen een reeks met oplopende concentratie. Van locatie Bornia is tevens de concentratie lood in het elutriaat voor de Microtoxtest gemeten. Deze concentraties worden gebruikt voor trefkansberekeningen om de mate van toxiciteit in deze test te kunnen verklaren (zie paragraaf 2.2.1). Voor meer details over de monsternamen, keuze van de monsters voor de bioassays en de analyseresultaten wordt verwezen naar de deelrapportage van IWACO.

Omdat bekend is dat bodemeigenschappen, zoals bijvoorbeeld textuur, lutumgehalte, organisch stofgehalte, pH en nutriënten, de respons in bioassays kan beïnvloeden, worden de resultaten bij voorkeur vergeleken met een schone referentiegrond met min of meer vergelijkbare bodemkarakteristieken als de verontreinigde te testen bodem. Op deze wijze wordt zoveel mogelijk gecorrigeerd voor een eventuele negatieve respons in de bioassay die veroorzaakt wordt door andere factoren dan de verontreiniging. In dit onderzoek vormt steeds het monster met de laagste concentratie uit de reeks de lokale referentie.

Aan alle monsters is door AquaSense een monstercode, het zogenaamde Ecolimsnummer, toegekend.

Naast de zeven veldmonsters is ter controle van de kwaliteit van de testorganismen en de testomstandigheden bij de chronische testen tevens een standaardmedium, kunstgrond, meegenomen. Kunstgrond is een mengsel van 70% kwartsand, 20% kaoline klei en 10% fijngemalen turf, dat met behulp van een geringe hoeveelheid calciumcarbonaat (ca. 0,5%) op een pH-KCl van $6,0 \pm 0,5$ wordt gebracht. Voor de kiemings- en groeitest met sla en de regenwormenreproductietest zijn voor een aantal parameters, zoals bijvoorbeeld kieming, overleving en aantal juvenielen, minimale waarden gedefinieerd waaraan het testresultaat in kunstgrond moet voldoen. Indien deze minimale waarden, de zogenaamde geldigheidscriteria, niet worden gehaald, wordt de test als niet geldig beschouwd omdat de kwaliteit van de testorganismen en/of de testomstandigheden niet voldoende waren. Voor de bait lamina test bestaan (nog) geen geldigheidscriteria. Voor de Microtoxtest zijn geldigheidscriteria voor de prestaties in het verdunningsmedium (= blanco) opgesteld.

Elutriaatbereiding voor Microtoxtest

De Microtoxtest wordt uitgevoerd met waterige oplossingen (zie paragraaf 2.2.1). Daarom is voor de Microtoxtest van de grondmonsters een elutriaat bereid door de grond in twee stappen uit te schudden met 0,001M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ met een totale liquid/solid verhouding van 1. Voor meer details over deze methode van elutriaatbereiding wordt verwezen naar Bioclear *et al.* (1998a).

Van zowel de EPON-locatie als de Petroleumhaven zijn tevens drie extracten, die door de TU Delft zijn bereid ten behoeve van de oliekaracterisatie, getest met behulp van de Microtoxtest. Op deze wijze is het mogelijk meer inzicht te krijgen in de vraag of de verschillende extractiemethoden leiden tot verschillen in toxiciteit.

Voorbehandeling voor de chronische testen

Voorafgaand aan de test zijn de monsters gehomogeniseerd, waarna grove delen, zoals wortels, zijn verwijderd en de grond is gezeefd over een 5 mm zeef.

De monsters van de EPON-locatie vertoonden grote verschillen in bodemtextuur en vochtigheid bij aanlevering van de monsters (zie tabel 2.1). Met name de kleiige monsters waren erg nat. Om de monsters testbaar te maken zijn ze voorafgaand aan de voorbehandeling enkele dagen aan de lucht gedroogd. Het is hierbij onvermijdelijk dat een deel van de diesilverontreiniging verdamppt. Dit kan leiden tot een onderschatting van de toxiciteit.

Tabel 2.1 Textuur en vochtigheid bij aanlevering van de monsters van de EPON locatie.

| Code | mg olie/kgds | Textuur | Vochtigheid |
|-------|--------------|-------------|----------------|
| Pb205 | <25 | grof zand | redelijk droog |
| HB7 | 79 | kleiig slib | zeer nat |
| Pb217 | 160 | grof zand | redelijk droog |
| SB3.1 | 440 | kleiig slib | zeer nat |
| Pb203 | 1800 | kleiig zand | redelijk droog |
| Pb24 | 3000 | kleiig zand | redelijk droog |
| Pb207 | 6800 | slib | zeer nat |

Het vochtgehalte in de chronische testen is gestandaardiseerd op 60% van de maximale Water Holding Capacity (WHC). De WHC is een maat voor de maximale hoeveelheid vocht die een bodem kan vasthouden en wordt uitgedrukt als een percentage van het drooggewicht. De WHC verschilt per bodem en wordt daarom voorafgaande aan de test voor elk monster bepaald. Hiertoe wordt een trechter met daarin een stuk filterpapier gevuld met ca. 10 gram grond. De trechter met de grond wordt gedurende 3 uur in een bekersglas met water gezet, waarbij het water net onder de rand van de trechter blijft. Vervolgens wordt de grond gedurende 2 uur gedraineerd. Deze grond bevat dan zoveel water als de grond maximaal kan vasthouden en heeft dus een vochtgehalte van 100% van de WHC. Van de gedraineerde grond wordt het vochtgehalte bepaald door de grond gedurende 16 uur te drogen bij 70°C. De WHC = (g water in de gedraineerde / g droge grond) * 100%. Uit de gegevens kan tevens het initiële vochtgehalte van de grond en de hoeveel water die moet worden toegevoegd om de grond op 60% van de WHC te brengen, berekend worden.

Ter controle wordt vlak voor inzetten en na afloop van de test het vochtgehalte van de grond gemeten. Hiertoe wordt 10 gram grond afgewogen, gedurende 16 uur gedroogd bij 70°C en opnieuw gewogen. Het vochtgehalte wordt berekend met behulp van de formule: $\text{vochtgehalte} = 100\% * (\text{gewicht voor drogen} - \text{gewicht na drogen}) / (\text{gewicht na drogen} - \text{gewicht bakje})$. Daarnaast wordt tijdens de test steeds het gewicht voor aanvullen met vocht gemeten. Uit deze gegevens is te berekenen wat het laagste vochtpercentage tijdens de test is geweest.

Tevens wordt ter controle vlak voor inzetten en na afloop van de test de pH-KCl van de grond bepaald. Hiertoe wordt 10 gram grond gedurende 2 uur met 25 ml 1M KCl geschud op een rollerbank. De pH wordt gemeten nadat de suspensie overnacht bezonken is.

2.2. Biologische bepalingen

Achtereenvolgens wordt per bioassay een korte motivatie van de keuze van de test gegeven en de testmethode omschreven. Tevens wordt de

methode van trefkansberekeningen voor de resultaten van de Microtoxtest op de Bornia-locatie toegelicht.

2.2.1. Microtoxtest

Korte motivatie keuze

De Microtoxtest maakt gebruik van een marine bacterie, die onder normale omstandigheden licht uit zendt, als een gevolg van respiratieprocessen. Dit fenomeen wordt bioluminescentie genoemd. Remming van de bioluminescentie duidt op toxiciteit. Omdat respiratie een proces is dat plaatsvindt in elke levende cel, wordt verondersteld dat de resultaten van de Microtoxtest, tot op zekere hoogte, te extrapoleren zijn naar andere organismen (Isenberg, 1993).

Met de Microtox bioassay is reeds jarenlang ervaring opgedaan met de beoordeling van oppervlaktewater, effluënten en waterbodems. Bovendien wordt deze bioassay ook regelmatig gebruikt voor het beoordelen van elutriaten² of andere extracten van verontreinigde landbodems. Er bestaan (inter)nationaal gevalideerde protocollen voor deze bioassay (NVN 6516, 1993; ISO 11348-3, 1998) en er zijn reeds veel toxiciteitsgegevens bekend (o.a. Kaiser & Devillers, 1994).

Uitvoering test

De Microtoxtest wordt uitgevoerd volgens een methode die is afgeleid van NVN 6516 (1993) en maakt gebruik van de marine bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*). Deze bacterie zendt onder normale omstandigheden licht uit. Dit verschijnsel wordt bioluminescentie genoemd.

In deze test wordt altijd een verdunningsreeks van het monster getest. De standaard verdunningsreeks is 45, 22.5, 11.25 en 6.25 volume%. Echter, door het zoutgehalte van het monster op een andere manier aan te passen, is het ook mogelijk een verdunningsreeks van 90, 45, 22.5 en 11.25 volume% te testen. Deze reeks is gebruikt in dit onderzoek. Omdat de verdunning in deze reeks minder groot is, kunnen toxische effecten eerder aangetoond worden.

Met een lichtmeter (Microtox®) wordt de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling. De test- en incubatietemperatuur bedraagt 15°C en de analyses worden in duplo uitgevoerd.

Het effect wordt uitgedrukt als afname van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (= verdunningsmedium) na een gegeven blootstellingsduur. Uit de resultaten wordt tevens per blootstellingsduur één gemiddelde EC₂₀-waarde bepaald met behulp van de programmatuur behorende bij het Microtox-teststelsel. De EC₂₀-waarde (Effect Concentratie) is gedefinieerd als de concentratie testmedium, waarbij na een gegeven

² Het extract van een grondmonster wat middels centrifugeren en eventueel filteren wordt verkregen nadat de grond gedurende een bepaalde tijd, in een bepaalde verhouding grond/water, is geschud.

blootstellingsduur een afname van 20% van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (= verdunningsmedium) kan worden waargenomen. De beoordeling van de toxiciteit wordt gebaseerd op de laagste van de op de drie tijdstippen bepaalde EC₂₀-waarden. De beoordeling van de toxiciteit wordt gebaseerd op de laagste van de op de drie tijdstippen bepaalde EC₂₀-waarden, behalve voor de monsters van de EPON locatie. Op deze locatie is de beoordeling gebaseerd op de EC₂₀-waarde na 5 minuten, omdat na langere blootstellingsduur in de lokale referentie andere, onbekende effecten een rol gaan spelen.

Trefkansberekeningen

Voor locatie Bornia zijn, aanvullend op de uitgevoerde bioassays, in het elutriaat voor de Microtoxtest de loodgehalten gemeten. Met deze loodgehalten zijn trefkansberekeningen uitgevoerd. Deze trefkansberekeningen geven een indicatie over het in theorie te verwachten effect.

Trefkansen worden uitgedrukt in Toxic Units (TU's). Eén TU is gelijk aan de concentratie van een bepaalde stof in elutriaat gedeeld door de EC₅₀ of LC₅₀³ voor die stof. Wanneer de $\Sigma TU \geq 1$ dan wordt in theorie 50% effect of meer verwacht en is er dus een reële kans op het aantonen van toxiciteit. Gesteld is dat er nog tot een ΣTU -waarde van 0,1 een mogelijke kans bestaat op het detecteren van toxiciteit. Bij nog lagere ΣTU -waarden is het zeer onwaarschijnlijk dat een eventueel negatief effect wordt veroorzaakt door de onderzochte problematische stofgroep.

Voor de TU-berekeningen is een EC₅₀-waarde van 0,08 mg Pb/l gebruikt (Ferard *et al.*, 1983).

2.2.2. Kiemings- en groeitest met sla (*Lactuca sativa*)

Korte motivatie

Planten zorgen, als primaire producenten, voor de noodzakelijke input van organisch materiaal in het ecosysteem. Testen met planten met wortelgroei en kieming als eindpunt hebben aangetoond dat *Lactuca sativa* (sla) een geschikt testorganisme is. De soort wordt onder andere aanbevolen in OECD-, ISO en ASTM-richtlijnen.

Deze test is afgeleid van ISO 11269-2 (1995). Dit voorschrift is opgesteld voor het testen van de toxiciteit van stoffen (stoftest). De langdurige toepassing als stoftest betekent dat er ruime ervaring bestaat met uitvoering van de test en dat er toxiciteitsgegevens bekend zijn. De toepassing voor het bepalen van de toxiciteit van verontreinigde veldbodems is echter nog relatief nieuw.

Uitvoering

³ EC₅₀ of LC₅₀: Effect Concentratie resp. Lethale Concentratie. De geschatte concentratie toxicant waarbij de helft van de testorganismen een bepaald effect (bijv. immobiliteit, sterfte) laat zien na een bepaalde blootstellingsduur.

De test is uitgevoerd in glazen potten van 1 liter. Elke pot is gevuld met circa 200 gram grond met een vochtgehalte van 60% van de WHC. In elke pot zijn 10 slazaden van het merk Topstar, variant Kropsla, Meikoningin, gezaaid waarna deze zijn bedekt met ongeveer 3 mm grond. De test is uitgevoerd in viervoud. Er zijn geen verdunningen getest.

De potten zijn gedurende 4 weken in een ruimte geplaatst bij een lichtintensiteit van 80-120 micro-einstein per m² per sec (licht/donker 16/8u) en een temperatuur die varieerde tussen 18 en 24°C. Dagelijks zijn de potten gewogen en bijgevuld tot begingewicht met een voedingsoplossing (twee keer per week, zie bijlage 1 voor samenstelling) of met milli-Q (overige dagen). De grond droogde tussen de tijdstippen van watergeven uit tot ongeveer 40% van de WHC. Na aanvullen van het vocht zijn de potten random teruggeplaatst.

Na 14 dagen is het aantal gekiemde plantjes bepaald en is het aantal plantjes uitgedund tot 5 per bakje. Als er in de potjes minder dan 5 plantjes gekiemd waren, is er niet uitgedund. Na 28 dagen zijn de plantjes uit de grond getrokken, de wortels afgeknipt en is het natgewicht van de plantjes tezamen bepaald op een bovenweger tot 0,1 mg nauwkeurig.

2.2.3. Regenwormenreproductietest

Korte motivatie

In het bodemecosysteem spelen regenwormen een belangrijke rol bij ondermeer de afbraak van organisch materiaal en de doorluchting en omwoeling van de bodem. Omdat regenwormen bij het graven bodemdeeltjes consumeren staan ze niet alleen direct maar ook indirect in intensief contact met de bodem en de daarin aanwezige verontreinigingen. Ze vormen daarnaast een belangrijke voedselbron voor onder andere zoogdieren en vogels, waardoor ze ook kunnen optreden als intermediair bij doorvergiftiging.

In internationaal verband is *Eisenia andrei* gekozen als organisme voor toxiciteitonderzoek vanwege de goede hanterbaarheid van de soort en omdat ze eenvoudig te kweken zijn in het laboratorium. Hoewel de soort niet voorkomt in natuurlijke bodems, maar voornamelijk in mesthopen, bestaan er géén aanwezigingen dat de gevoeligheid verschilt van andere, wel van nature voorkomende soorten.

Deze test is afgeleid van ISO 11268-2 (1998). Dit voorschrift is opgesteld voor het testen van de toxiciteit van stoffen (stoftest). Met de toepassing van de reproductietest als stoftest bestaat reeds enige ervaring. Dit heeft als voordeel dat er enige toxiciteitsgegevens bekend zijn. Daarnaast worden regenwormen, en met name de nauw verwante soorten *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei*, reeds gedurende lange tijd gebruikt voor toxiciteitstesten die overleving als parameter hebben. Dit betekent dat er ruime ervaring bestaat met uitvoering van testen met regenwormen. De toepassing voor het bepalen van de toxiciteit van verontreinigde veldbodems is echter nog relatief nieuw.

Uitvoering

De regenwormenreproductietest wordt gecombineerd met de bait lamina test (zie paragraaf 2.2.3). De test is uitgevoerd in plastic potten van 1,25 liter. Elke pot is gevuld met zoveel grond dat het bovenste gaatje van de bait lamina strips net onder het oppervlakte was, terwijl de onderkant van de strip de bodem van de pot raakte (circa 9 cm hoog en 800 gram grond). De grond is op een vochtgehalte van 60% van de WHC gebracht.

Regenwormen van de soort *Eisenia andrei* zijn betrokken van het bedrijf BioInternational. De wormen waren bij aanvang van de test 5-7 maanden oud, met een zichtbaar clitellum (een teken dat de wormen volwassen en in reproductie zijn). Voor aanvang van de test zijn twintig wormen individueel gewogen om de variatie in het gewicht te bepalen. Hiertoe zijn de wormen gewassen met kraanwater, drooggedept met papier en tot op 0,1 mg nauwkeurig gewogen. Het gewichtsverschil bedroeg minder dan 200 mg. Per pot zijn 10 wormen uitgezocht, gewassen, drooggedept, gezamenlijk gewogen en in de pot geplaatst. De test is uitgevoerd in viervoud. Er zijn geen verdunningen getest.

De potten zijn gedurende 4 weken geïncubeerd in een klimaatkamer bij een lichtintensiteit van circa 3 micro-einstein per m² per sec (licht/donker 16/8u) en een temperatuur van 20±2°C. Tweemaal per week zijn de potten gewogen en bijgevuld tot begingewicht met milli-Q. De grond droogde tussen de tijdstippen van watergeven nauwelijks uit. Tevens zijn de wormen, indien nodig, tweemaal per week gevoerd met 1,5 gram gemalen, bevochtigde koeienmest in de verhouding water : droge gemalen koeienmest = 1 : 2.

Na 4 weken zijn de overlevende regenwormen met de hand uit de grond gezocht. De regenwormen zijn geteld, gewassen, drooggedept en gezamenlijk gewogen. Per monster is het vochtgehalte en de pH-KCl bepaald. De overgebleven grond is met een waterstraal door twee zeven van respectievelijk 2 en 1 mm gespoeld om de cocons uit de grond te halen. De meeste cocons blijven achter op de 2 mm zeef, kleine cocons gaan er doorheen en blijven op de 1 mm zeef liggen. De cocons en eventuele juvenielen zijn met een slappe pincet op vochtig filtreerpapier gelegd en geteld. Van de cocons is tevens genoteerd of ze gevuld of leeg waren. Gedurende vier weken is tweemaal per week het aantal uitgekomen juvenielen gescoord. Tevens is indien nodig het filtreerpapier vervangen en/of is het vocht aangevuld.

2.2.4. Bait lamina test

Korte motivatie

De bait lamina test is oorspronkelijk ontwikkeld voor de bodembioïecologie om op zeer eenvoudige wijze de afbraaksnelheid van organisch materiaal te bepalen. Meer recentelijk wordt de test ook toegepast om de effecten van verontreiniging op de afbraaksnelheid van organisch materiaal te bepalen.

Afbraak van organisch materiaal is een essentieel proces in de kringloop van energie en nutriënten in de bodem en vormt daarmee een basisvoorwaarde voor een gezonde bodem.

De test bestaat uit smalle PVC strips, met daarin een aantal gaatjes, die gevuld zijn met een substraat, een mengsel van cellulosepoeder, tarwezemelen en sporen actief kool. Het is niet geheel duidelijk welke organismen verantwoordelijk zijn voor de afbraak van het substraat. Gedacht wordt dat, naast micro-organismen, ook bodemorganismen bijdragen aan de afbraak, direct danwel indirect door stimulatie van de micro-organismen.

Er bestaan geen (inter)nationaal gestandaardiseerde richtlijnen voor het uitvoeren van de bait lamina test. De test wordt gecombineerd met de regenwormentest. Deze opzet is reeds eerder met succes toegepast in het NOBIS-project 'Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in situ biorestauratie' (Bioclear *et al.*, 1998b). Er werd in dat onderzoek een correlatie met oliegehalten aangetoond.

Uitvoering

De bait lamina test wordt gezamenlijk uitgevoerd met de regenwormenreproductietest (zie paragraaf 2.2.3). Bait lamina strips zijn PVC strips van ongeveer 1 mm dik met 16 gaatjes, die zijn gevuld met een substraat bestaand uit cellulosepoeder, tarwezemelen en sporen actief kool. Het gedeelte met gaatjes is ongeveer 9 cm. Deze strips, 5 per pot, zijn bij de potten van de regenwormenreproductietest in gestoken. De testomstandigheden zijn gelijk aan die van de regenwormenreproductietest. De test is in viervoud uitgevoerd. Er zijn geen verdunningen getest.

Na 7, 14 en 28 dagen zijn de strips uit de grond getrokken, licht gespoeld met kraanwater en is per pot het aantal geheel of gedeeltelijk doorboorde gaatjes geteld. Na 7 en 14 dagen zijn de strips vervolgens weer teruggestoken in de de potten.

2.3. Uitwerking en interpretatie

2.3.1. Uitwerking

Uit de gegevens worden de volgende parameters berekend:

*Microtox*test

- EC₂₀-waarde.
Dit is de verdunning waarbij de bioluminescentie 20% geremd is ten opzichte van het verdunningsmedium. De EC₂₀-waarde wordt automatisch berekend met behulp van de bij de Microtox test behorende programmatuur.
- TU-waarde.

slatest

- kiemingspercentage;
- natgewicht per plantje;

regenwormentest

- % overleving;
- begingewicht per worm;
- eindgewicht per worm;
- % toe- of afname in gewicht;
- het aantal cocons per ingezette worm;
- het aantal juvenielen per ingezette worm;
- het aantal juvenielen per cocon;
- het aantal juvenielen per pot in kunstgrond (t.b.v. de geldigheidscriteria);
- de variatiecoëfficiënt (CV) in het aantal juvenielen in kunstgrond (t.b.v. de geldigheidscriteria).

bait lamina test

- het percentage geheel of gedeeltelijk doorboorde gaatjes van het totaal aantal gaatjes per pot per tijdstip.

Van bijna alle parameters wordt tevens de standaarddeviatie bepaald.

De Microtox test wordt beoordeeld op basis van de laagste van de op de drie tijdstippen bepaalde EC₂₀-waarden. Bij het beoordelen van de resultaten van de chronische testen wordt zowel naar de absolute waarden gekeken als naar effect ten opzichte van de lokale referentie.

Voor het laatste worden de resultaten uitgedrukt als een percentage remming ten opzichte van de lokale referentie met behulp van de volgende formule:

$$\% \text{ effect} = \frac{(\text{resultaat referentie} - \text{resultaat monster})}{\text{resultaat referentie}} \times 100\%$$

Let op: positieve waarden geven aan dat het testorganisme in dat monster geremd is ten opzichte van de referentie ('het slechter doet'), negatieve waarden geven aan dat het testorganisme in dat monster gestimuleerd is ten opzichte van de referentie ('het beter doet').

Het effect op de groei van de regenwormen wordt op een afwijkende wijze beoordeeld, namelijk op basis van afname in gewicht ten opzichte van de lokale referentie, berekend als: % toe- of afname in de referentie - % toe- of afname in het monster. Een positief getal betekent in dit geval dat de wormen in het monster slechter gegroeid zijn als in de referentie, een negatief getal dat ze beter gegroeid zijn.

2.3.2. Statistische analyse

Voor de Microtoxtest is het niet mogelijk de testresultaten statistisch te toetsen omdat de test slechts in duplo wordt uitgevoerd. Toetsing van significante verschillen tussen monsters en de lokale referentie heeft voor deze test plaatsgevonden door de 95% betrouwbaarheidsintervallen van de EC₂₀-waarden van het monster en de lokale referentie met elkaar vergeleken. Deze betrouwbaarheidsintervallen worden gegeven door de bij deze test behorende programmatuur. Indien de betrouwbaarheidsintervallen niet overlappen wordt de EC₂₀-waarde van het monster als significant afwijkend van de lokale referentie beschouwd.

Voor de chronische bioassays wordt per parameter bepaald of de berekende waarden significant afwijken van de lokale referentie. Voor deze statistische toetsingen is gebruik gemaakt van het software pakket SPSS (Norusis, 1992).

Allereerst wordt getoetst of de gegevens normaal verdeeld zijn en of de varianties homogeen zijn. Als dit het geval is wordt met een parametrische toets (bijv. de 'Bonferroni'-test) getoetst of er significante verschillen ten opzichte van de lokale referentie zijn ($p < 0,05$). Indien de gegevens niet normaal en/of de varianties niet homogeen verdeeld zijn (ook niet na log getransformatie), wordt voor het toetsen van verschillen gebruik gemaakt van een niet-parametrische methode (bijv. de Kruskal Wallis test; $p < 0,05$).

Daarna wordt het testresultaat verder beoordeeld (zie paragraaf 2.3.3).

2.3.3. Classificatie

In de vrijwel alle gevallen waarin bioassays worden gebruikt voor het testen van verontreinigde veldbodems wordt volstaan met het constateren van een negatief effect ten opzichte van een (locale) referentie, zonder daarbij een waardeoordeel aan de mate van effect te hangen. Omdat gemeend is dat er vanuit probleembezitters toch behoefte is aan een dergelijk waardeoordeel⁴, is toch getracht een waardeoordeel (classificatie) te geven aan de geconstateerde effecten.

Bij de hieronder voorgestelde classificatiecriteria wordt, zoals gebruikelijk is in de water(bodem)wereld, onderscheid gemaakt in géén, matig en ernstig negatief effect. Getracht is zoveel mogelijk aan te sluiten bij de bestaande classificatiecriteria, zoals die gebruikt worden voor het beoordelen van effecten in waterbodems (STOWA/RIZA, 1997) en voor acute bodembioassays (Bioclear et al., 1998b).

De grenzen van de beoordeling van de Microtoxtest zijn afgeleid van de criteria voor waterbodems. Voor de bodembioassays zijn de criteria in

⁴ Dit kwam onder andere duidelijk naar voren in de NARIP-discussiemiddag 'Ecologische risicobeoordeling in de praktijk' (24 juni 1999).

dit onderzoek opgesteld. Hierbij wordt de beoordeling gebaseerd op zowel absolute waarden als op het percentage effect ten opzichte van de lokale referentie. In het laatste geval worden effecten alleen negatief beoordeeld als het verschil ten opzichte van de lokale referentie significant is.

De grens voor geen effect bepaald door het normaal functioneren van een organisme in de bioassay. Voor regenwormen is de grens afgeleid van het geldigheids criterium in de ISO-richtlijn (minimaal 90% overleving in de controle na vier weken). Voor de plantentest is de grens gebaseerd op eigen ervaring: de kieming van de zaadjes moet goed zijn. Wat als goed wordt beoordeeld is echter niet in richtlijnen vastgelegd. Minimaal 80% kieming blijkt voor sla in de praktijk echter goed haalbaar. In de bait lamina test is gesteld dat er geen negatief effect is indien de consumptiesnelheid niet significant afwijkt van de lokale referentie.

De grens tussen matig en ernstig negatief effect is voor de bodembioassays zoveel mogelijk op 50% gelegd, behalve wanneer er goede redenen zijn hier van af te wijken. Deze uitzonderingsgevallen zijn:

- Bij de overleving van de regenwormen is de grens op 75% gesteld om effect op de overleving wat meer gewicht te geven; een effect op de overleving heeft meer effect op populatieniveau als een effect op de reproductie. Daarom wordt een effect op de overleving al eerder als sterk negatief effect beoordeeld.
- Voor de biomassa van regenwormen ligt de grens tussen matig en sterk negatief effect op 25%; een grens van 50% is hier niet mogelijk want een worm die 50% minder gewicht heeft, overleeft dit zeer waarschijnlijk niet. Bij planten is een groeireductie van 50% wel goed mogelijk.

De verschillende grenswaarden worden dus veroorzaakt door wat normaal is in de biologie van de testorganismen en door het gewicht wat aan een bepaald effect wordt gehangen. Nadrukkelijk wordt er op gewezen dat er over onderstaande classificatiecriteria (nog) geen (inter)nationale overeenstemming bestaat. Met name de grens tussen matig en ernstig effect blijft arbitrair. Bij het gebruik van de classificatiecriteria dient echter gerealiseerd te worden dat zij niet meer zijn dan een hulpmiddel om tot de uiteindelijke beoordeling te komen. Het gaat uiteindelijk om het totaalbeeld van de locatie en minder om de mate van effect in de individuele monsters.

Tabel 2.1 Classificatie van de effecten in de Microtox test. Positieve effecten worden als niet toxisch geclassificeerd.

| Classificatie | EC ₂₀ -waarde |
|-------------------------|---|
| geen negatief effect | > 90 vol.% |
| matig negatief effect | 11.25 vol.% < EC ₂₀ ≤ 90 vol.% |
| ernstig negatief effect | EC ₂₀ ≤ 11.25 vol.% |

Tabel 2.2 Classificatie van de effecten in de kiemings- en groeitest met sla. Negatieve effecten worden uitsluitend als toxisch geclassificeerd als ze significant afwijken van de lokale referentie ($p < 0,05$). Positieve effecten worden als niet toxisch geclassificeerd.

| Classificatie | Effect op kieming | Effect op natgewicht |
|-------------------------|---|---|
| geen negatief effect | Kieming $\geq 80\%$ of niet significant ten opzichte van de lokale referentie | Geén significante effecten ten opzichte van de lokale referentie |
| matig negatief effect | Kieming 50 - 80% en significant ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, maar $< 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |
| ernstig negatief effect | Kieming $< 50\%$ en significant ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, $\geq 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |

Tabel 2.3 Classificatie van de effecten in de regenwormenreproductietest. Negatieve effecten worden uitsluitend als toxisch geclassificeerd als ze significant afwijken van de lokale referentie ($p < 0,05$). Positieve effecten worden als niet toxisch geclassificeerd.

| Classificatie | Effect overleving | Effect op biomassa | Effect op aantal juvenielen per worm |
|-------------------------|--|---|---|
| geen negatief effect | Overleving $\geq 90\%$ of niet significant ten opzichte van de lokale referentie | Geén significant effect ten opzichte van lokale referentie | Geén significant negatief effect ten opzichte van lokale referentie |
| matig negatief effect | Overleving 75-90% en significant ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, maar $< 25\%$ ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, maar $< 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |
| ernstig negatief effect | Overleving $< 75\%$ en significant ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, $\geq 25\%$ ten opzichte van de lokale referentie | Significant effect, $\geq 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |

Tabel 2.4 Classificatie van de effecten in de bait lamina test. Negatieve effecten worden uitsluitend als toxisch geclassificeerd als ze significant afwijken van de lokale referentie ($p < 0,05$). Positieve effecten worden als niet toxisch geclassificeerd.

| Classificatie | Effect |
|-------------------------|---|
| geen negatief effect | Geén significante effecten op het totaal aantal leeggegeten gaatjes per pot op elk van de tijdstippen (t=7, 14 en 28d) |
| matig negatief effect | Significant effect op het totaal aantal leeggegeten gaatjes per pot op een of meerdere van de tijdstippen (t=7, 14 en/of 28d), maar $< 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |
| ernstig negatief effect | Significant effect op het totaal aantal leeggegeten gaatjes per pot op een of meerdere van de tijdstippen (t=7, 14 en/of 28d), maar $\geq 50\%$ ten opzichte van de lokale referentie |

3. Resultaten

In de volgende paragrafen wordt allereerst gecontroleerd of de bioassays aan de geldende geldigheidscriteria hebben voldaan. Vervolgens worden de resultaten van de bioassays afzonderlijk besproken.

3.1. Geldigheidscriteria

De gehanteerde richtlijnen (zie paragraaf 2.2) geven criteria aan voor de geldigheid van de bioassays. Deze zogenaamde geldigheidscriteria hebben betrekking op de prestaties in het verdunningsmedium (Microtoxtest) of in kunstgrond (chronische testen). Indien aan de geldigheidscriteria wordt voldaan, kan geconcludeerd worden dat de kwaliteit van de testorganismen en de testomstandigheden goed zijn geweest. In bijlage 2 zijn deze criteria (voor zover beschikbaar) en de in het verdunningsmedium en in de kunstgrond geconstateerde waarden per test weergegeven. Voor de bait lamina test bestaan (nog) geen geldigheidscriteria. Onder gunstige omstandigheden dienen de gaatjes in kunstgrond na vier weken voor het grootste deel leeggegeten te zijn. Een percentage van 80% lijkt haalbaar.

Het kiemingspercentage van de slazaadjes in de kunstgrondblanco van locatie Bornia is lager dan 80%, nl. 72,5%. Mede gezien het feit dat de plantjes die wel opkwamen net zo goed groeiden als die in de kunstgrondblanco van de EPON-locatie (zie bijlage 4) wordt geconcludeerd dat de kwaliteit van de zaadjes en de testomstandigheden goed waren.

In de kunstgrondblanco van Oude Pekela kiemden de slazaadjes nauwelijks (5%) omdat deze grond door een technisch mankement sterk was uitgedroogd. In de locale referentie (O.P.6) was de kieming en groei echter wel goed zodat ook voor locatie Oude Pekela

geconcludeerd kan worden dat de kwaliteit van de zaadjes en de testomstandigheden goed waren.

In de regenwormtest van locatie Petroleumhaven voldeden het aantal juvenielen per pot en de 'Coefficient of Variation' (CV) (resp. 15 en 38%) niet aan de geldigheidscriteria. Er was echter niet voldoende grond meer beschikbaar om de test over te doen, zodat de resultaten van deze test toch gepresenteerd worden. De lage reproductie en de hoge variatie is te verklaren door het feit dat de wormen bij aanvang van de test nog niet allemaal volledig volwassen waren, dat wil zeggen nog geen volledig ontwikkeld clitellum hadden, hoewel ze wel de leeftijd hadden om volwassen te zijn. Er is toch besloten om de test in te zetten, mede gelet op de gevraagde planning en de eerdere ervaring dat in de meeste gevallen wormen met puberteitsknobbels in de test zo snel volwassen worden dat de geldigheidscriteria zonder problemen worden gehaald. De ingezette wormen hadden wel tenminste goed ontwikkelde puberteitsknobbels. De volwassen wormen en de wormen met puberteitsknobbels werden gelijkmatig over de monsters verdeeld. In de testen van locatie NAM Schoonebeek en NS Kerkrade, die twee weken later met dezelfde batch wormen en in dezelfde ruimte is ingezet werden de geldigheidscriteria zonder problemen gehaald. Het is daarom aannemelijk dat, behalve het nog niet volledig volwassen zijn, de kwaliteit van de wormen en de testomstandigheden voor de test van locatie Petroleumhaven goed waren.

De overige testen voldeden aan de geldigheidscriteria. Er kan dus geconcludeerd worden dat bij alle bioassays, met uitzondering van de regenwormtest van locatie Petroleumhaven, de kwaliteit van de testorganismen en de testomstandigheden goed zijn geweest en dat deze testen daarmee geldig zijn. Voor de regenwormtest van locatie Petroleumhaven lijkt het nog niet volledig volwassen zijn van de wormen bij aanvang van de test de belangrijkste reden voor het niet halen van de geldigheidscriteria. Er was echter geen grond meer om de test te herhalen, zodat de resultaten toch gepresenteerd zullen worden.

3.2. Locatie Bornia

De resultaten van de bioassays met de monsters van locatie Bornia, de TU-waarden en de beoordeling van de resultaten staan in tabel 3.1 samengevat, en worden in paragraaf 3.2.1 t/m 3.2.4 per bioassay toegelicht.

3.2.1. Microtoxtest

De resultaten van de Microtoxtest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.1. In deze tabel staan ook de berekende TU-waarden.

Uit de resultaten blijkt dat al bij een concentratie van 21 mg Pb/kgds een matig negatief effect wordt waargenomen in de Microtoxtest. Bij hogere concentraties zijn ernstig negatieve effecten waargenomen.

Omdat er vanaf een concentratie van 220 mg Pb/kgds geen onderscheid meer is te maken in de ernst van het effect, is het niet mogelijk om aan te geven of de waargenomen effecten correleren met de gehalten lood in de bodem en/of de gehalten lood in het elutriaat.

Op basis van de berekende TU-waarden zijn de waargenomen effecten aannemelijk. Reeds bij een concentratie van 21 mg Pb/kgds in de bodem is de TU-waarde groter dan één. Dit betekent dat er theoretisch meer dan 50% effect in het onverdunde monster kan worden verwacht.

3.2.2. Slatest

De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.1.

Kieming

Er is geen duidelijk effect op de kieming waargenomen. De kieming is over het algemeen laag, ook in de locale referentie. Omdat de spreiding hoog is, zijn er geen significante effecten waargenomen.

Opvallend is de lage kieming in monster 3 (27,5%).

Natgewicht

Het natgewicht van de plantjes is in alle monsters erg laag (0,008 tot 0,020 g per plantje ten opzichte van 1,161 g per plantje in de kunstgrond). In alle monsters groeiden de plantjes slechter dan in de locale referentie, echter alleen bij 880 mg Pb/kgds significant slechter. Dit is dan ook het enige monster waarin het effect als ernstig negatief wordt beoordeeld.

Eindoordeel

De kiemings- en groeitest met slatest is minder geschikt voor het testen van de monsters van de locatie Bornia: de slaplantjes kiemen en groeien slecht. Een mogelijke verklaring hiervoor kan de lage pH-KCl (3,4 tot 4,0) van de monsters zijn (zie ook discussie). De kieming vertoont geen correlatie met de loodgehalten. De groei, hoewel laag, vertoont wel enige correlatie met de loodgehalten. Het effect is uitsluitend in de hoogste concentratie (880 mg Pb/kgds) significant en daarmee als ernstig negatief beoordeeld.

3.2.3. Regenwormenreproductietest

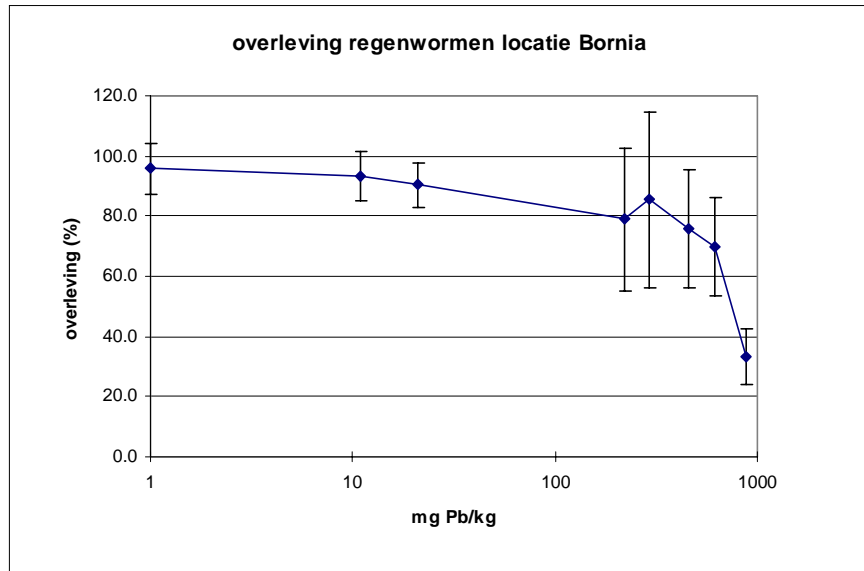
De resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.1. Conform de richtlijn is de beoordeling gebaseerd op de overleving, de gewichtstoe- of -afname en het aantal juvenielen per worm.

Tabel 3.1 Samenvatting en beoordeling van de resultaten van bioassays met de monsters van locatie Bornia. Verklaring gebruikte (kleur)codes: niet gearceerd (-) = geen negatief effect; licht gearceerd (+/-) = matig negatief effect; donker gearceerd (+) = ernstig negatief effect. Let op: een negatief % effect ten opzichte van de lokale referentie betekent dat dit monster gestimuleerd is.

| monstercodes | code | chemie | | | Microtox | sla | regenworm | | | bait lamina | | | eindclassificatie | | | | | |
|--------------|----------|----------------------|------------------------------|---------|----------|-----------|------------------|-------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|--|----------------|--------------------------------|--|----------------------------------|
| | | concl. Pb (mg/kg ds) | concl. Pb in elutriat (mg/l) | % lutum | | | % organisch stof | pH-KCl slatest (t=0d - t=28d) | pH-KCl regenwormen- en bait laminatest (t=0d - t=28d) | TU-waarde (op basis van EC50 waarde) | EC20-waarde elutriat (%) | kieming (%) | | % effect op natgewicht t.o.v. ref. (%) | overleving (%) | afname gewicht t.o.v. ref. (%) | % effect op aantal juvenielen per worm t.o.v. ref. | % effect op t=7d t.o.v. ref. (%) |
| (ref) 306968 | 28 (ref) | 11 | 0.041 | 0.8 | 3.2 | 3,6 - 3,4 | 3,6 - 3,6 | 0.5 | >90 | 57.5 | 0.0 | 93.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| 306969 | 31 | 21 | 0.13 | <0.5 | 1.4 | 3,4 - 4,1 | 3,4 - 3,5 | 1.6 | 35.2 | 67.5 | 34.3 | 90.5 | 0.4 | 45.9 | 38.5 | 13.0 | 1.8 | +/- |
| 306970 | 4 | 220 | 5.9 | <0.5 | 0.7 | 4,0 - 4,1 | 4,0 - 4,8 | 73.8 | <11.25 | 77.5 | 48.8 | 78.9 | 8.5 | 95.5 | 39.6 | 33.3 | 27.5 | + |
| 306971 | 3 | 290 | 1.9 | <0.5 | 2.4 | 3,4 - 3,3 | 3,4 - 3,7 | 23.8 | <11.25 | 27.5 | 26.0 | 85.4 | 1.5 | 92.8 | 13.2 | 37.0 | 41.5 | + |
| 306972 | 8 | 460 | 8.2 | <0.5 | 2.2 | 3,8 - 3,7 | 3,8 - 4,0 | 102.5 | <11.25 | 85.0 | 30.2 | 75.8 | 33.2 | 92.6 | 36.3 | 31.2 | 40.4 | + |
| 306973 | 11 | 620 | 5.6 | <0.5 | 1.9 | 3,8 - 4,6 | 3,8 - 4,4 | 70.0 | <11.25 | 70.0 | 62.1 | 70.0 | 27.5 | 96.0 | 36.3 | 31.2 | 40.9 | + |
| 306974 | 119+120 | 880 | 17 | <0.5 | 2.1 | 3,9 - 3,8 | 3,9 - 4,3 | 212.5 | <11.25 | 52.5 | 60.6 | 33.3 | 5.6 | 97.3 | 49.5 | 60.1 | 63.7 | + |

Overleving

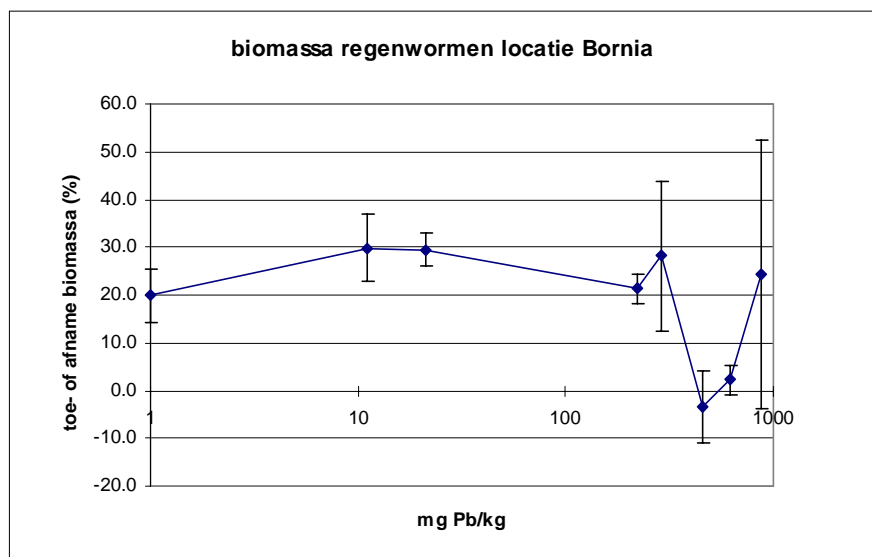
De overleving van de regenwormen neemt af met toenemende loodconcentratie (zie figuur 3.1; in deze en alle volgende figuren is het monster op de y-as kunstgrond). Alleen bij de hoogste concentratie zijn deze effecten significant en worden als ernstig negatief effect beoordeeld.



Figuur 3.1 Overleving van de regenwormen in de monsters van locatie Borna.

Biomassa

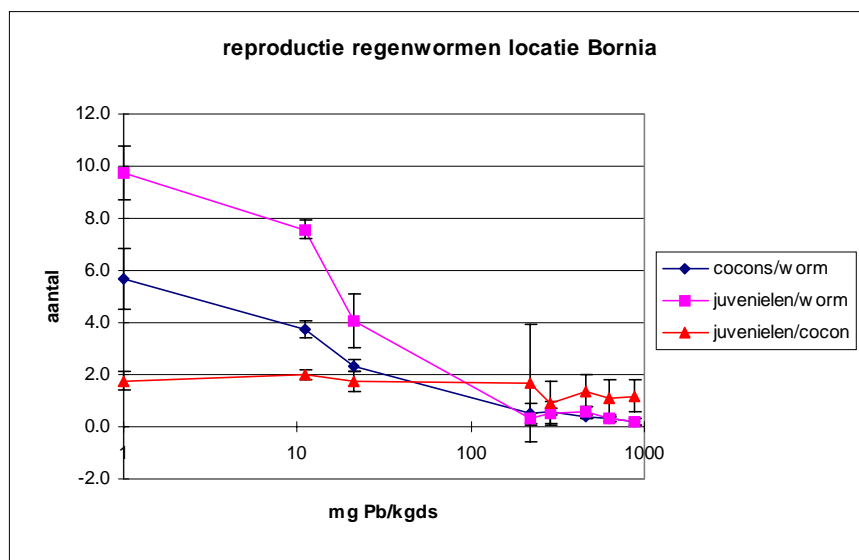
De groei van de regenwormen tijdens de test is significant negatief beïnvloed bij 460 en 620 mg Pb / kg ds en wordt als ernstig negatief effect beoordeeld. Bij 880 mg Pb/kgds is de groei echter niet significant negatief beïnvloed.



Figuur 3.2 Biomassa van de regenwormen op locatie Borna.

Reproductie

De reproductie, uitgedrukt als aantal juvenielen per worm, is ten opzichte van de lokale referentie negatief beïnvloed in alle monsters. Bij 21 mg Pb/kg ds wordt dit effect als matig negatief effect geïdentificeerd, bij hogere concentraties als ernstig negatief effect.



Figuur 3.3 Reproductie van de regenwormen op locatie Bornia.

Eindoordeel

Bij een loodconcentratie van 21 mg/kgds worden matig negatieve effecten op de reproductie van de regenwormen waargenomen. Vanaf een loodconcentratie van 220 mg/kgds zijn de effecten ernstig negatief.

3.2.4. Bait lamina test

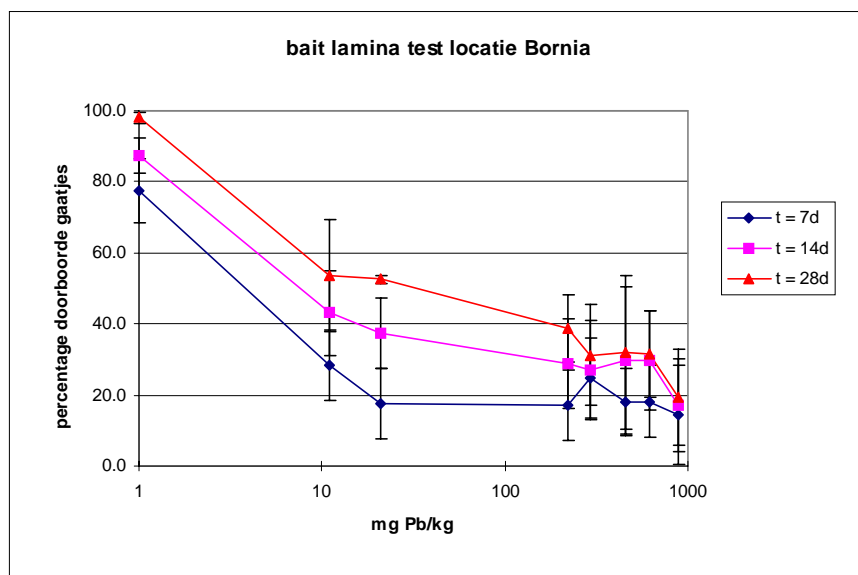
De resultaten van de bait lamina test worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.1.

Consumptiesnelheid

De consumptiesnelheid is in alle monsters lager dan in de lokale referentie. De spreiding is echter hoog waardoor de verschillen niet significant zijn en als 'geen negatief effect' worden geïdentificeerd. Wel wordt een trend waargenomen waarbij de consumptiesnelheid afneemt met toenemende loodconcentratie.

Eindoordeel

Vanwege de grote spreiding zijn geen negatieve effecten waargenomen in de bait lamina test. Wel is er een trend waargenomen dat de consumptiesnelheid afneemt met toenemende loodconcentratie.



Figuur 3.4 Consumptiesnelheid in de bait lamina test op locatie Bornia.

3.3. EPON locatie

De resultaten van de bioassays met de monsters van de EPON locatie worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.2 en worden in paragraaf 3.3.1 t/m 3.3.4 per bioassay toegelicht.

3.3.1. Microtox test

De ruwe resultaten van de Microtox test worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.2.

De beoordeling van de monsters van de EPON locatie is gebaseerd op de EC₂₀-waarde na 5 minuten, omdat na langere blootstellingsduur in de lokale referentie andere, onbekende effecten een rol gaan spelen (zie bijlage 4).

Vanaf 1800 mg olie/kgds worden matig negatieve effecten waargenomen, die toenemen met de concentratie olie.

De effecten in het extract voor de oliekaracterisatie zijn hoger dan in het elutriaat. Ook in deze extracten neemt het effect toe met toenemende olieconcentratie. Bij 1800 mg olie/kgds is dit effect matig negatief, bij de hogere concentraties ernstig negatief.

Tabel 3.2

Samenvatting en beoordeling van de resultaten van de bioassays met monsters van de EPON-locatie. Verklaring gebruikte (kleur)codes: niet gearceerd (-) = geen negatief effect; licht gearceerd (+/-) = matig negatief effect; donker gearceerd (+) = ernstig negatief effect. N.b. = niet bepaald. 'a' = in dit monster waren alle wormen dood, waardoor de biomassa aan het eind niet bepaald kon worden. Let op: een negatief % effect ten opzichte van de lokale referentie betekent dat dit monster gestimuleerd is.

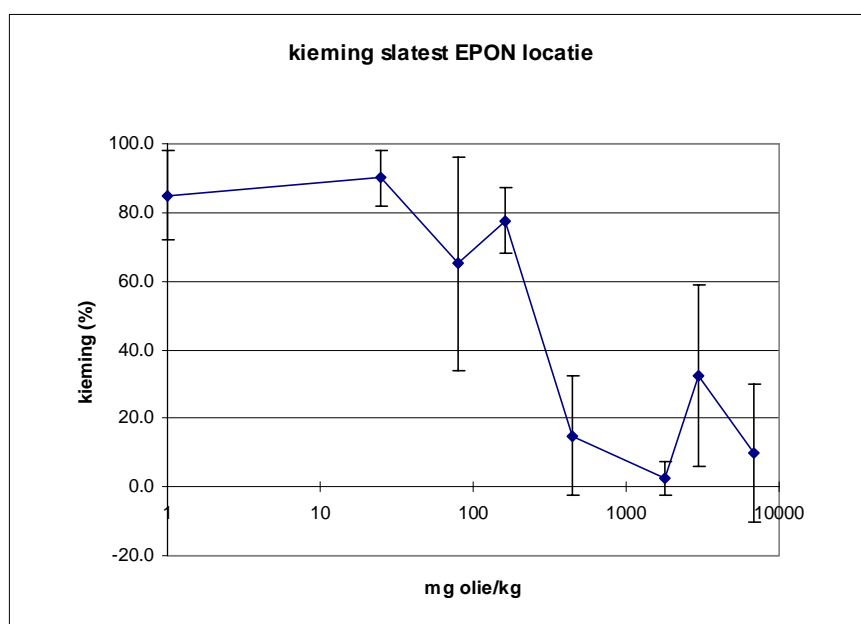
| monstercodes | code | chemie | | | Microtox | sla | regenworm | | | bait lamina | | | eindclassificatie | | | | |
|--------------|-------------|------------------------|---------|------------------|-----------|-----------|-------------------------------|---|--------------------------|---|-------------|--|-------------------|----------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| | | concl. olie (mg/kg ds) | % lutum | % organisch stof | | | pH-KCl slatest (t=0d - t=28d) | pH-KCl regenwormen- en bait laminatest (t=0d - t=28d) | EC20-waarde elutriat (%) | EC20-waarde extract olie karakterisatie (%) | kieming (%) | % effect op natgewicht t.o.v. ref. (%) | | overleving (%) | afname gewicht t.o.v. ref. (%) | % effect op aantal cocons per worm t.o.v. ref | % effect op t=7d t.o.v. ref (%) |
| (ref) 307016 | Pb205 (ref) | <25 | 3.5 | <0.2 | 8,3 - 8,3 | 8,6 - 7,4 | >90 | n.b. | 90.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| 307017 | HB7 | 79 | 8.7 | 0.2 | 7,4 - 7,6 | 7,6 - 7,6 | >90 | n.b. | 65.0 | -37.3 | 100.0 | -2.7 | 40.3 | 37.6 | 36.0 | 36.0 | +/- |
| 307018 | Pb217 | 160 | 3.9 | <0.2 | 7,9 - 8,1 | 8,0 - 7,2 | >90 | n.b. | 77.5 | 50.4 | 95.0 | -4.9 | 27.4 | 34.7 | 34.3 | 34.3 | +/- |
| 307019 | SB3.1 | 440 | 6 | 2.1 | 7,2 - 7,3 | 7,4 - 7,2 | >90 | n.b. | 15.0 | 33.0 | 100.0 | -0.2 | 84.5 | 81.0 | 72.9 | 72.9 | + |
| 307020 | Pb203 | 1800 | 7.5 | 0.9 | 7,1 - 7,3 | 7,3 - 7,2 | 74.8 | 16.0 | 2.5 | 87.5 | 97.5 | -7.6 | 74.3 | 85.4 | 86.1 | 84.5 | + |
| 307021 | Pb24 | 3000 | 9.9 | 2.7 | 7,1 - 7,2 | 7,3 - 7,2 | 50.8 | <11.25 | 32.5 | 63.0 | 87.5 | 10.2 | 83.2 | 90.3 | 82.8 | 58.1 | + |
| 307022 | Pb207 | 6800 | 5.8 | 1.7 | 7,3 - 7,5 | 7,6 - 7,4 | 17.0 | <11.25 | 10.0 | 95.8 | 0.0 | a | 100.0 | 98.2 | 98.2 | 96.7 | + |

3.3.2. Slatest

De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.2.

Kieming

De kieming wordt significant negatief beïnvloed vanaf een olieconcentratie van 440 mg olie/kgds. Deze effecten worden als ernstig negatief effect geclassificeerd.



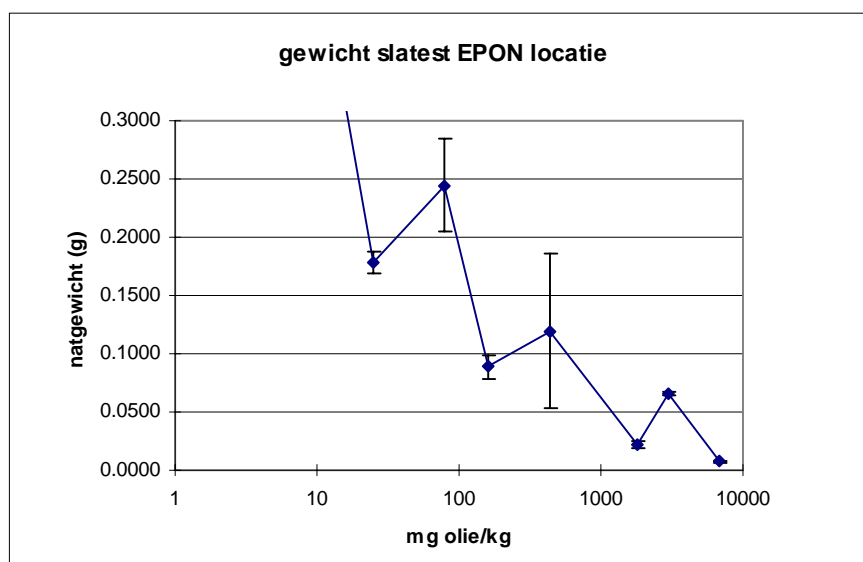
Figuur 3.5 Kieming van de slazaden in de monsters van de EPON locatie.

Natgewicht

De spreiding in de natgewichten is groot. Het natgewicht van de plantjes is significant negatief beïnvloed vanaf een concentratie van 1800 mg olie/kgds. De waargenomen negatieve effecten worden als ernstig geclassificeerd. Bij de resultaten moet echter wel worden opgemerkt dat het natgewicht bij 1800 en 6800 mg olie/kgds slecht op één waarneming is gebaseerd (d.w.z. slechts in één van de vier replica's groeiden plantjes). Bij 79 mg olie/kgds werd de groei gestimuleerd ten opzichte van de lokale referentie.

Eindoordeel

Vanaf een olieconcentratie van 440 mg olie /kg ds worden ernstig negatieve effecten op de kieming van slazaadjes waargenomen. Vanaf een olieconcentratie van 1800 mg olie /kg ds worden ernstig negatieve effecten op de groei van sla waargenomen.



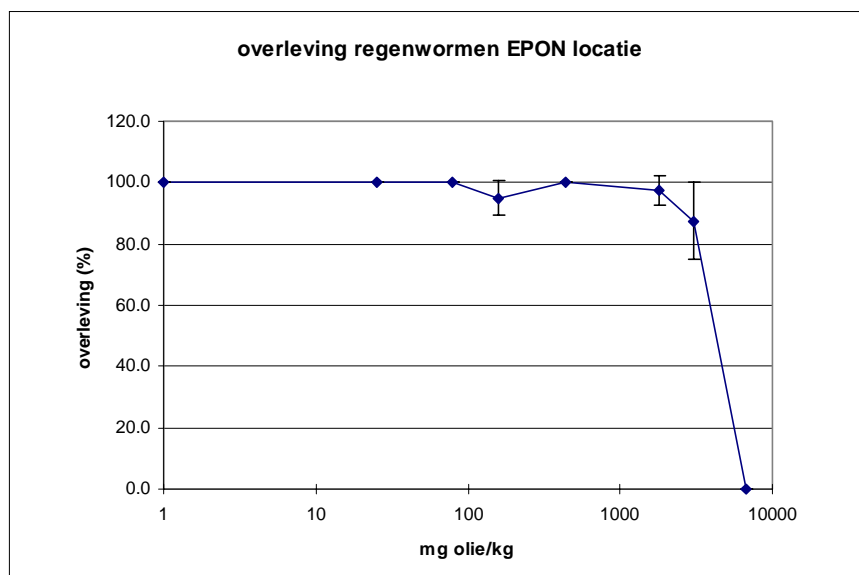
Figuur 3.6 Natgewicht van de slaplantjes op de EPON locatie. Het natgewicht van de plantjes in de kunstgrond valt buiten de grafiek.

3.3.3. Regenwormenreproductietest

De ruwe resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.2. Conform de richtlijn dient de beoordeling gebaseerd te worden op de overleving, de gewichtstoe- of -afname en het aantal juvenielen per worm.

Overleving en biomassa

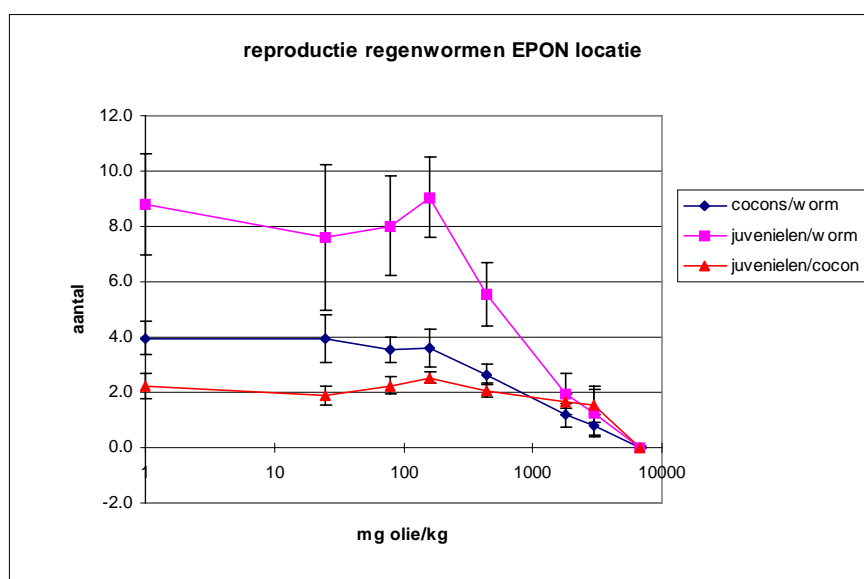
Ernstig negatieve effecten op de overleving en de biomassa werden uitsluitend waargenomen bij de hoogste olie concentratie (6800 mg olie/kgds). De wormen wilden niet in de grond kruipen en gingen allemaal dood. Bij de overige monsters werden géén significant negatieve effecten waargenomen op de overleving en de gewichtsverandering van de regenwormen tijdens de test.



Figuur 3.7 Overleving van de regenwormen in de monsters van de EPON locatie.

Reproductie

De reproductie, uitgedrukt als aantal cocons per worm, is significant negatief beïnvloed vanaf een olieconcentratie van 1800 mg olie/kgds en wordt als ernstig negatief beoordeeld. Er wordt tevens een correlatie met het oliegehalte waargenomen.



Figuur 3.8 Reproductie van de regenwormen op de EPON locatie.

Eindoordeel

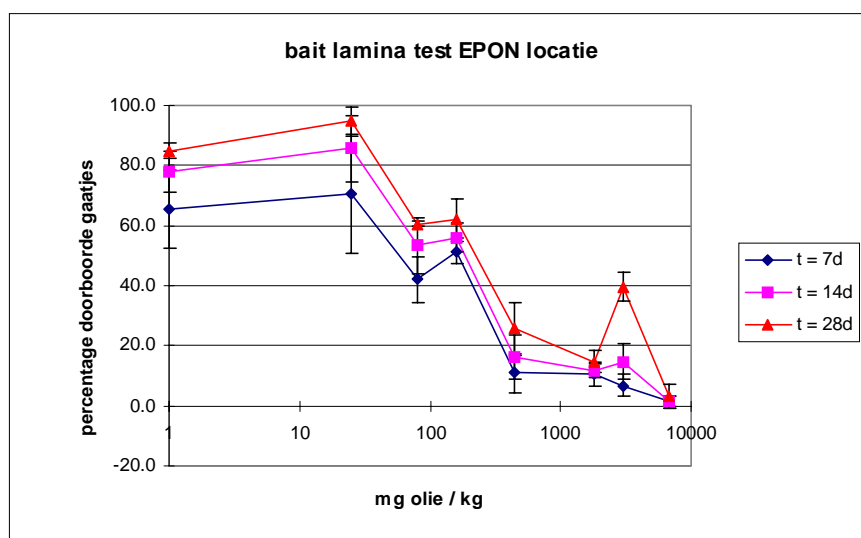
Vanaf een olieconcentratie van 1800 mg olie/kgds worden ernstig negatieve effecten op de reproductie van de regenwormen waargenomen. Bij een concentratie van 6800 mg olie /kg ds gaan alle wormen dood.

3.3.4. Bait lamina test

De resultaten van de bait lamina test worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.2.

Consumptiesnelheid

De substraatconsumptiesnelheid in de bait lamina test is in alle olieverontreinigde monsters geremd ten opzichte van de lokale referentie. Dit effect wordt bij 79 en 160 mg olie/kgds als matig negatief effect geclassificeerd en bij concentraties boven de 440 mg olie/kgds als ernstig negatief effect.



Figuur 3.9 Consumptiesnelheid in de bait lamina test op de EPON locatie.

Eindoordeel

Het eindoordeel is dat een olieconcentratie van 79 en 160 mg olie/kgds matig negatieve en boven de 440 mg olie/kgds ernstig negatieve effecten geeft in de bait lamina test.

3.4. Locatie NAM Schoonebeek

De resultaten van de bioassays met de monsters van de locatie NAM Schoonebeek worden samengevat in tabel 3.3. Deze resultaten worden in paragraaf 3.4.1 t/m 3.4.4 per bioassay toegelicht.

Tabel 3.3

Samenvatting van de resultaten van de bioassays met monsters van de locatie NAM Schoonebeek. De resultaten zijn niet geïnterpreteerd (zie tekst voor uitleg). N.b. = niet bepaald. a = niet te bepalen wegens volledig effect op kieming. Let op: een negatief % effect ten opzichte van de lokale referentie betekent dat dit monster gestimuleerd is.

| monstercode | code | | Microtox | | sla | regenworm | | | bait lamina | | | eindclassificatie |
|-------------|--------|-------------|---|---|------|----------------|-------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| | chemie | monstercode | EC20-waarde elutriaat ingevroren en lage pH (%) | EC20-waarde elutriaat met aangepaste pH (%) | | overleving (%) | afname gewicht t.o.v. ref (%) | % effect op aantal juvenielen per worm t.o.v. ref | % effect op t=7d t.o.v. ref | % effect op t=14d t.o.v. ref | % effect op t=28d t.o.v. ref | |
| 308305 | 25 | (ref) 039 | 22.0 | 31.0 | 75.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | n.b. | |
| 308306 | 1600 | 006 | 12.6 | 11.7 | 12.5 | 97.5 | -0.3 | 98.2 | 95.1 | 84.1 | n.b. | |
| 308307 | 2700 | 037 | 19.8 | 25.9 | 17.5 | 100.0 | 1.3 | 81.8 | 77.9 | 55.9 | n.b. | |
| 308308 | 3600 | 010 | 20.6 | 43.6 | 2.5 | 100.0 | -1.7 | 68.2 | 93.6 | 86.7 | n.b. | |
| 308309 | 5500 | B1 | 47.4 | 24.9 | 15.0 | 100.0 | 0.6 | 72.7 | 75.5 | 75.6 | n.b. | |
| 308310 | 9900 | 016 | 22.9 | 30.5 | 0.0 | 100.0 | 2.9 | 72.7 | 79.9 | 79.9 | n.b. | |
| 308311 | 14000 | 013 | 35.6 | 27.5 | 0.0 | 100.0 | 4.8 | 87.3 | 89.2 | 86.4 | n.b. | |

3.4.1. Microtoxtest

De elutriaten van de monster van locatie NAM Schoonebeek zijn wegens planningstechnische redenen ingevroren geweest voordat ze getest zijn. Alle monsters, inclusief de lokale referentie, lieten een negatief effect zien, waarbij géén correlatie met de verontreinigingsgraad is waargenomen.

Om te onderzoeken of dit effect veroorzaakt is door het invriezen en/of de lage pH van de monsters (zie discussie in paragraaf 4.3.1) is opnieuw een elutriaat bereid en getest, waarbij de pH is aangepast tot pH 6,5 om een eventuele negatieve invloed van de pH op het testresultaat te kunnen uitsluiten. In tabel 3.3 worden beide resultaten weergegeven, waaruit blijkt dat er geen grote verschillen zijn tussen beide test series. Het invriezen of de lage pH van het elutriaat van de eerste serie heeft dus géén negatieve invloed gehad op het testresultaat.

Gezien het feit dat ook in de lokale referentie negatieve effecten worden waargenomen, lijkt het er op dat er in deze venige bodem een andere factor is die stoort in de Microtoxtest. Een mogelijke factor zou de aanwezigheid van veenvet (een vette substantie die in veenbodems voorkomt) kunnen zijn. Om dit te testen is een verzadigde oplossing van veenvet in 0,001M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, het uitschudmedium, getest. Deze verzadigde oplossing had een pH van 4,5, hetgeen buiten de randvoorwaarden voor de Microtoxtest ligt. De pH is daarom aangepast, waarbij de oplossing bij zowel een lage pH (5,6) als een hoge pH (7,8) is getest. In beide gevallen werd géén effect waargenomen. De oorzaak moet dus ergens anders worden gezocht.

3.4.2. Slatest

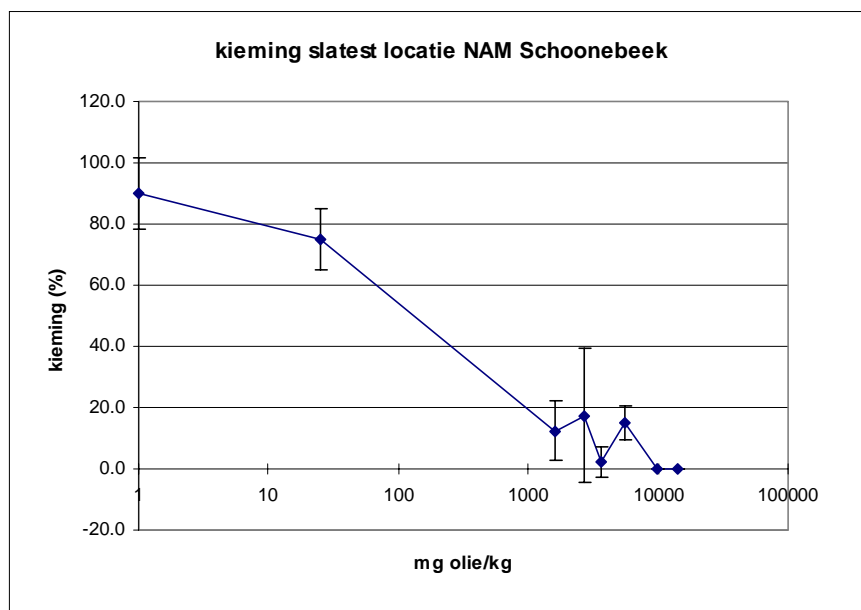
De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat in tabel 3.3.

Kieming en natgewicht

Uit tabel 3.3 blijkt dat de kieming en groei van sla in de monsters van locatie NAM Schoonebeek zeer slecht is. De kieming en groei in kunstgrond was wel normaal. Ondanks de slechte kieming en groei is er toch een trend dat de zaadjes nog slechter kiemen (figuur 3.10) en de plantjes nog slechter groeien bij hogere olieconcentraties.

Omdat de lage pH van de monsters waarschijnlijk de belangrijkste oorzaak is van de slechte kieming en groei (zie tabel 3.3 en discussie in paragraaf 4.3.2) zijn de gevonden effecten niet geclassificeerd.

Om toch een indruk te krijgen van de (eventuele) toxiciteit van de olieverontreiniging voor sla zouden de monsters opnieuw getest kunnen worden bij aangepaste pH, bijvoorbeeld tot pH 6,0. Een eventuele negatieve invloed van de pH op het testresultaat kan hiermee uitgesloten



Figuur 3.10 Kieming van de slazaden in de monsters van de locatie NAM Schoonebeek.

worden. Wegens gebrek aan monstermateriaal was het in dit geval echter niet mogelijk om de monsters opnieuw met aangepaste pH te testen.

Eindoordeel

De kieming en groei van sla is op de monsters van locatie NAM Schoonebeek zeer laag, hetgeen waarschijnlijk door de lage pH van de monsters wordt veroorzaakt. De monsters worden daarom niet geclassificeerd. De resultaten geven echter aanwijzingen dat ook de olieverontreiniging negatieve effecten veroorzaakt.

3.4.3. Regenwormenreproductietest

De resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat in tabel 3.3.

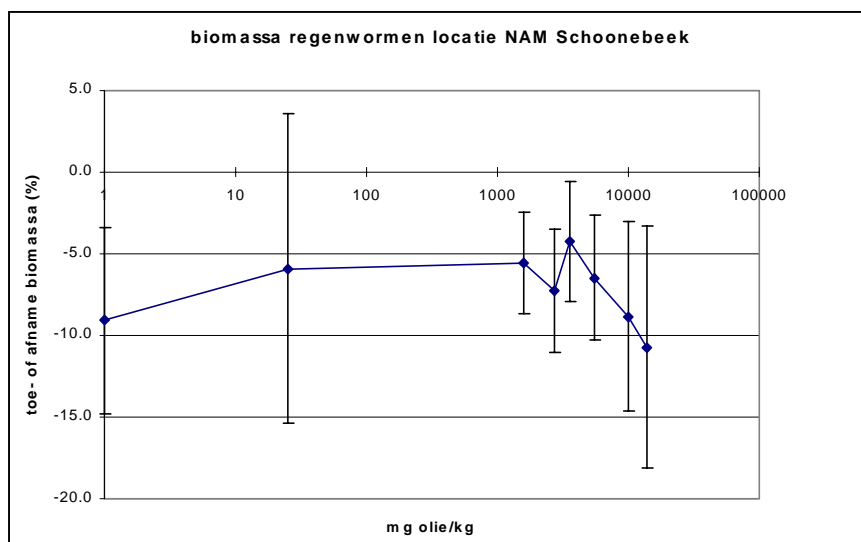
Overleving en biomassa

Er worden geen effecten op de overleving en biomassa waargenomen. Wel is er een lichte trend naar lagere groei bij hogere concentraties olie, maar deze trend is niet significant.

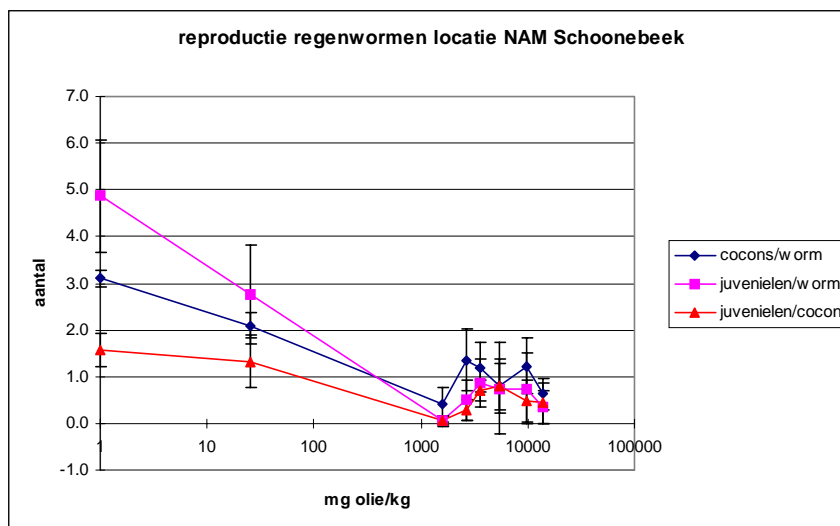
Reproductie

De reproductie is in alle monsters van locatie NAM Schoonebeek laag, ook in de lokale referentie, hoewel de reproductie hier wel hoger is dan in de overige monsters.

Mogelijke negatieve effecten van de olieverontreiniging zijn niet te onderscheiden van een pH-effect, omdat in de lokale referentie de pH ook hoger is dan in de verontreinigde monsters. Er zijn geen significante verschillen tussen de monsters waargenomen. Ook is er géén trend naar lagere productie bij hogere olieconcentraties waargenomen.



Figuur 3.11 Biomassa van de regenwormen in de monsters van de locatie NAM Schoonebeek.



Figuur 3.12 Reproductie van de regenwormen op locatie NAM Schoonebeek.

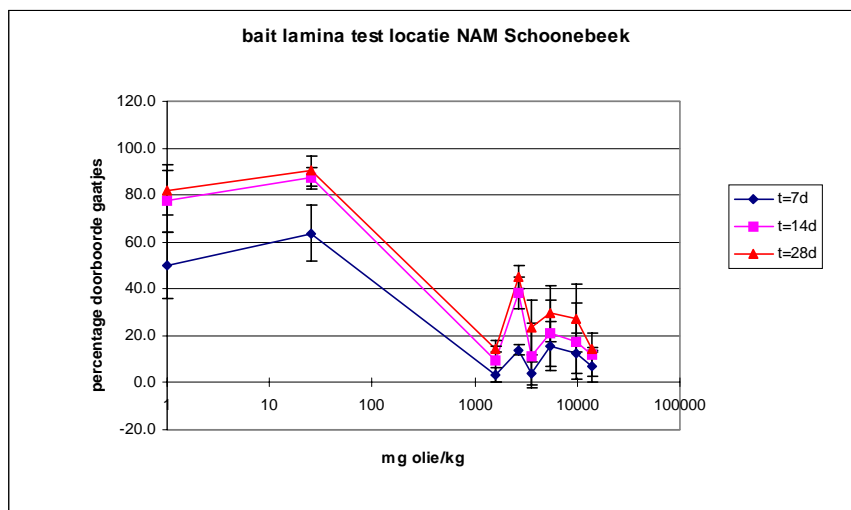
Eendoordeel

Er zijn géén duidelijke aanwijzingen voor een negatief effect van de olieverontreiniging op de overleving, biomassa en reproductie van de regenwormen. De reproductie van de regenwormen in de verontreinigde monsters is laag, maar er is géén trend naar toenemend effect bij toenemende olieconcentratie. De lage reproductie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de lage pH.

3.4.4. Bait lamina test

De consumptiesnelheid in de verontreinigde monsters is erg laag. In de lokale referentie is de consumptiesnelheid wel normaal. Omdat de pH in

de lokale referentie ook hoger is, is een eventueel negatief effect van de verontreiniging niet te onderscheiden van een pH-effect. De verschillen tussen de verontreinigde monsters zijn niet significant. Ook is er géén trend naar lagere consumptiesnelheid bij hogere olieconcentraties waargenomen.



Figuur 3.13 Consumptiesnelheid in de bait lamina test op locatie NAM Schoonebeek.

Eindoordeel

Er zijn géén duidelijke aanwijzingen voor een negatief effect van de oliecontaminatie op de consumptiesnelheid in de bait lamina test. De consumptiesnelheid in de verontreinigde monsters is laag, maar er is géén trend naar toenemend effect bij toenemende olieconcentratie. De lage consumptiesnelheid wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de lage pH.

3.5. Locatie SBNS - Kerkrade West

De resultaten van de bioassays met de monsters van de locatie SBNS - Kerkrade West worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.5 en worden in paragraaf 3.5.1 t/m 3.5.4 per bioassay toegelicht.

De monsters van deze locatie bevatten (met uitzondering van de lokale referentie, T9,v2) zeer veel kleine en grotere stenen. De monsters zijn daarom in tegenstelling tot de monsters van de overige locaties niet gezeefd over een 5 mm zeef, maar de keien groter dan 3 cm zijn met de hand verwijderd. In tabel 3.4 is aangegeven hoeveel stenen zijn verwijderd en hoeveel testbaar monster is overgebleven (gewicht monster zonder stenen >3cm). Monster T8,v2 werd op basis van chemische analyses wel geselecteerd om bioassays mee uit te voeren, maar bleek in de praktijk niet testbaar. Dit monster bevatte zeer veel grote keien en de fractie die overbleef bestond voor het grootste deel uit kiezels. Dit monster is daarom vervallen. Monster T8,v5 was erg nat en is

voorafgaand aan de uitvoering van de bioassays overnacht gedroogd aan de lucht.

Tabel 3.4 Aandeel stenen >3cm in de monsters van locatie SBNS - Kerkrade West

| Ecolimsnr. | Monstercode | totaal gewicht (kg) | gewicht zonder stenen >3cm (kg) | aandeel stenen >3cm verwijderd (% w/w) |
|------------|-------------|---------------------|---------------------------------|--|
| 308297 | T9,v2 (ref) | niet bepaald | niet bepaald | 0 |
| 308298 | T8,v4 | 14,0 | 6,5 | 54 |
| 308299 | T8,v6 | 12,5 | 8,0 | 36 |
| 308301 | T8,v5 | 10,0 | 8,0 | 20 |
| 308302 | T8,v2 | 10,5 | 3,0 ¹ | 71 |
| 308303 | T7,v4 | 13,5 | 8,0 | 41 |
| 308304 | T9,v3 | 15,5 | 6,5 | 58 |

¹: Restfractie bestond voornamelijk uit kiezels. Monster is daarom vervallen.

3.5.1. Microtoxtest

De resultaten van de Microtoxtest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.5.

Voor géén van de onderzochte monsters van deze locatie werden negatieve effecten waargenomen in de Microtoxtest.

3.5.2. Slatest

De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.5.

Uit de gegevens blijkt dat de pH van de lokale referentie afwijkt van die van de verontreinigde monsters (pH 3,7 - 3,9 gedurende de test versus pH 5,5 - 7,0 voor de overige monsters). Bovendien wijkt de structuur van de lokale referentie af van de overige monsters. De lokale referentie is zandig en licht van kleur, terwijl de overige monsters zeer veel kleinere en grotere keien bevatten en donker gekleurd zijn. Op basis van deze afwijkende eigenschappen wordt de lokale referentie niet geschikt geacht.

Gezien de complexe verontreiniging (PAK's, verschillende metalen, olie en EOX), waardoor niet één (type) verontreiniging kan worden aangewezen als veroorzaker van negatieve effecten, en het ontbreken van een goede lokale referentie, zijn de monsters niet geclassificeerd.

Tabel 3.5 Samenvatting en beoordeling van de resultaten van de bioassays met monsters van de locatie SBNS Kerkrade-West. In tegenstelling tot de overige locaties zijn de resultaten niet uitgedrukt ten opzichte van de lokale referentie (zie tekst voor uitleg). De classificatie is gebaseerd op expert judgement. Verklaring gebruikte (kleur)codes: onderstreept = gehalte boven de interventiewaarde; niet gearceerd (-) = geen negatief effect; licht gearceerd (+/-) = matig negatief effect; donker gearceerd (+) = ernstig negatief effect.

| monstercode | code | chemie | Microtox | sluis | regenworm | eindclassificatie | | | | | | | | | | |
|--|--|--|---|--|--|--|--|--|--|--|---|--|--|--|---|-----------------------------------|
| Ecolimsnr. kunstgrond 308297 308298 308299 308301 308303 308304 | blanco T9,v2 (ref) T8,v4 T8,v6 T8,v5 T7,v4 T9,v3 | mg PAK's/kg 2.2 3.9 13 27 73 260 | mg Cu/kg 13 140 60 180 560 72 | mg Pb/kg 71 510 220 1100 830 190 | mg Zn/kg 75 7400 490 2100 1300 340 | % lutum 11.0 3.9 6.0 4.0 6.4 0.9 | % organisch stof 3.1 13 15 43 20 7.2 | pH-KCl slatest (t=0d - t=28d) 6,5 - 6,2 3,7 - 3,9 7,0 - 6,7 6,4 - 6,5 5,5 - 5,9 6,0 - 6,1 6,7 - 6,4 | pH-KCl regenwormen- en bait laminatest (t=0d - t=28d) 5,2 - 6,5 4,1 - 4,8 6,6 - 7,0 6,3 - 7,0 5,8 - 6,5 6,0 - 7,2 5,9 - 6,5 | EC20-waarde elutriaat (%) >90 >90 >90 >90 >90 >90 >90 | kieming (%) 85.0 85.0 85.0 85.0 80.0 87.5 82.5 | natgewicht (g/plant) 0.7265 0.0966 0.1882 0.8952 0.0419 0.0728 0.0761 | overleving (%) 100.0 100.0 100.0 100.0 100.0 100.0 97.5 | afname gewicht t.o.v. t=0 (%) -10.3 -9.3 -15.1 -11.7 -7.6 -12.4 -12.5 | aantal juvenielen per worm 5.3 3.9 4.6 6.6 0.3 5.0 4.5 | - +/- - + + + + |

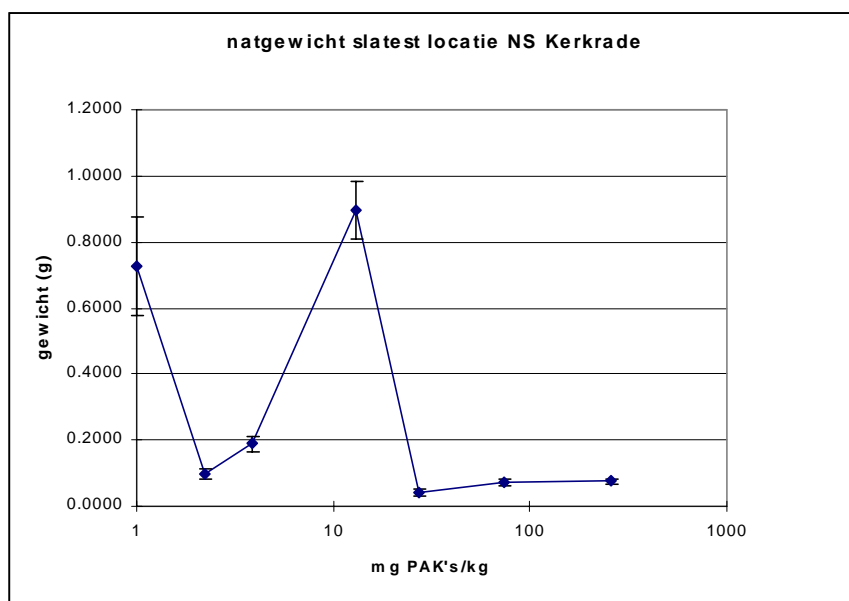
De waargenomen effecten en mogelijke oorzaken worden per monster besproken.

Kieming

De kieming van de slazaden wordt niet beïnvloed door de aanwezige verontreinigingen en is voor alle monsters $\geq 80\%$.

Natgewicht

Er is géén duidelijke correlatie van de groei met één bepaald type verontreiniging waargenomen.



Figuur 3.6 Natgewicht van de slaplantjes op locatie NS Kerkrade.

De groei van de slaplantjes is het hoogst in monster T8,v6. De groei in dit monster wijkt niet significant af van de groei in kunstgrond en is zelfs wat hoger. De planten in dit monster hebben blijkbaar geen last van de verhoogde gehalten PAK, zink, lood en koper. Wel dient opgemerkt te worden dat dit wel het monster is met de minste overschrijdingen van de interventiewaarden: alleen de interventiewaarde voor zink wordt overschreden.

De groei van sla in monster T8,v4 is ten opzichte van monster T8,v6 met 79% geremd, terwijl de pH min of meer gelijk is. Het lijkt aannemelijk dat de zeer hoge concentratie zink (7400 mg Zn/kg) en in mindere mate mogelijk ook lood (510 mg Pb/kg) en/of koper (140 mg Cu/kg) hieraan hebben bijgedragen.

De groei van sla in monster T9,v2 (oorspronkelijk als lokale referentie aangeduid) is relatief laag. Hoewel dit monster niet verontreinigd is, is de pH wel laag (pH-KCl 3,7 - 3,9 gedurende de test) hetgeen een verklaring kan zijn voor de relatief slechte groei.

De groei in de overige monsters is ook verlaagd ten opzichte van monster T8,v6 en kunstgrond. Mogelijke oorzaken hiervoor kunnen de zeer hoge gehalte PAK's in monster T9,v3, het hoge gehalte lood en zink en in

minder mate mogelijk ook koper in monster T8,v5 en de hoge gehalten PAK's, zink, lood, koper en EOX in monster T7,v4 zijn.

Eindoordeel

De kieming van sla op locatie SBNS - Kerkrade West wordt niet negatief beïnvloed door de aanwezige verontreinigingen. De groei van sla is in een aantal monsters laag. Gezien het hoge verontreinigingsniveau is het aannemelijk dat de aanwezige verontreinigingen in monster T8,v4 (Zn), T8,v5 (Pb en Zn), T9,v3 (PAK's) en T7,v4 (PAK's, zink, lood, koper en EOX) hebben bijgedragen aan deze slechte groei. Vanwege de afwezigheid van een geschikte lokale referentie zijn de monsters geclassificeerd op basis van expert judgement.

3.5.3. Regenwormenreproductietest

De resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.5. Conform de richtlijn is de beoordeling gebaseerd op de overleving, de gewichtstoe- of -afname en het aantal juvenielen per worm.

Overleving, biomassa en reproductie

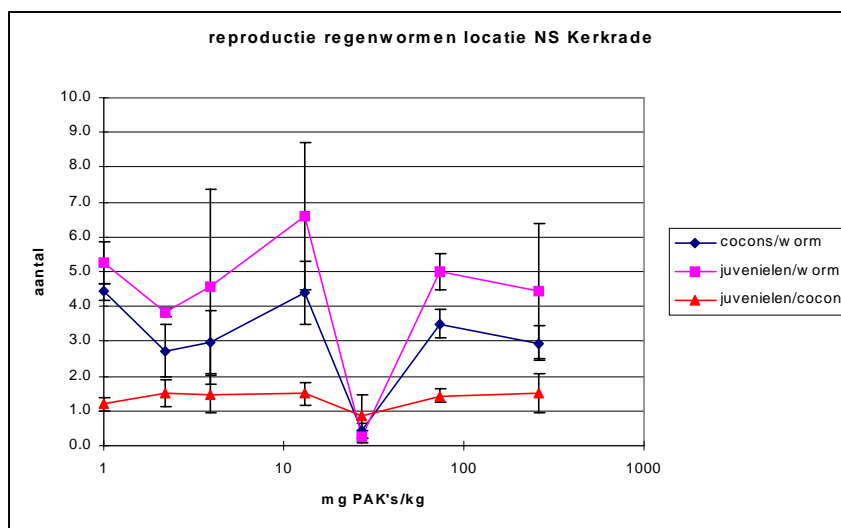
Er is géén effect op de overleving van de regenwormen waargenomen. Ook de biomassa van de regenwormen wordt niet significant beïnvloed door de aanwezige verontreinigingen. De reproductie is alleen voor monster T8,v5 significant verschillend van de overige monsters. Op basis van een vergelijking met de reproductie in de overige monsters wordt dit effect als ernstig negatief effect beoordeeld.

Om enig inzicht te krijgen in mogelijke trends en in de oorzaak van effecten is de biomassa en de reproductie uitgezet tegen de concentraties van de belangrijkste verontreinigingen: PAK's, koper, lood en zink. Er zijn géén duidelijke correlaties van de biomassa of reproductie met de concentraties van één van deze verontreinigingen.

Het lijkt aannemelijk dat in monster T8,v5 met name de hoge loodconcentratie (1100 mg Pb/kg) effect op de reproductie heeft gehad. Voor de andere verontreinigingen (PAK, koper en zink) wordt namelijk in andere monsters bij concentraties die hoger zijn dan in monster T8,v5 géén negatief effect waargenomen.

Eindoordeel

Er is uitsluitend in monster T8,v5 een negatief effect op de reproductie van de regenwormen waargenomen, dat als ernstig negatief effect wordt geclassificeerd. Negatieve effecten op de overleving of biomassa van de regenwormen werden niet waargenomen.



Figuur 3.12 Reproductie van de regenwormen op locatie NS Kerkrade.

3.5.4. Bait lamina test

De bait lamina test is voor deze locatie niet uitgevoerd vanwege het grote aantal kiezels in de monsters. Hierdoor is het niet goed mogelijk de strips in de grond te steken.

3.6. Locatie Petroleumhaven

De resultaten van de bioassays met de monsters van de locatie Petroleumhaven worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.6 en worden in paragraaf 3.6.1 t/m 3.6.4 per bioassay toegelicht.

3.6.1. Microtox test

De resultaten van de Microtox test worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.6. Monster T10 is het enige monster waarin negatieve effecten in het elutriaat werden waargenomen. Deze worden als matig negatief effect geclassificeerd. Voor de overige onderzochte monsters van deze locatie werden géén negatieve effecten waargenomen in de Microtox test.

Voor monster T7, T8 en T10 zijn tevens de extracten, die voor de oliekaracterisatie zijn bereid, getest. Per monster zijn twee extracten bereid om iets over de herhaalbaarheid, zowel chemisch als in de Microtox test, te kunnen zeggen. De extracten zijn met de basic Microtox test getest, d.w.z. de hoogst geteste concentratie is 45 volume %.

Tabel 3.6 Samenvatting en beoordeling van de resultaten van de bioassays met monsters van locatie Petroleumhaven. Verklaring gebruikte (kleur)codes: a = niet te bepalen wegens volledig effect op kieming; niet gearceerd (-) = geen negatief effect; licht gearceerd (+/-) = matig negatief effect; donker gearceerd (+) = ernstig negatief effect. Let op: een negatief % effect ten opzichte van de lokale referentie betekent dat dit monster gestimuleerd is.

| monstercode | code | chemie | Microtox | | slia | regenworm | | bait lamina | | | eindclassificatie | |
|-------------|-------------|---|-------------------------|--|--|---|---|---|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----|
| Ecolimsnr. | monstercode | mg olie/kg mg Zn/kg % lutum % organisch stof pH-KCl slatest (t=0d - t=28d) pH-KCl regenwormen- en bait laminatest (t=0d - t=28d) | EC20-waarde elutrat (%) | EC20-waarde extract oliekaracterisatie 1 (%) | EC20-waarde extract oliekaracterisatie 2 (%) | kieming (%) % effect op natgewicht t.o.v. ref. | overleving (%) afname gewicht t.o.v. ref (%) | % effect op aantal juvenielen per worm t.o.v. ref | % effect op t=7d t.o.v. ref | % effect op t=14d t.o.v. ref | % effect op t=28d t.o.v. ref | |
| kunstgrond | blanco | | | | | | | | | | | - |
| 308429 | (ref) T11 | 25 | >90 | - | - | 77.5 | 100.0 | 28.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | +/- |
| 308430 | T12 | 68 | >90 | - | - | 75.0 | 100.0 | 3.2 | -14.8 | -10.4 | -5.5 | |
| 308431 | T2 | 171 | >90 | - | - | 25.0 | 100.0 | 20.6 | -13.7 | -20.0 | -6.9 | + |
| 308432 | T5 | 284 | >90 | - | - | 42.5 | 100.0 | 3.5 | -6.6 | -9.6 | -5.8 | + |
| 308433 | T10 | 500 | 17.9 | 29.8 | >45 | 15.0 | 100.0 | 5.1 | 25.3 | 16.1 | -1.4 | + |
| 308434 | T7 | 707 | >90 | 15.0 | 39.4 | 0.0 | 100.0 | 12.2 | 48.9 | 36.5 | 6.2 | + |
| 308435 | T8 | 1203 | >90 | >45 | >45 | 0.0 | 92.5 | 28.4 | 69.8 | 65.7 | 44.0 | + |

Dit in tegenstelling tot de elutriaten, waarbij de hoogst geteste concentratie 90 volume % was.

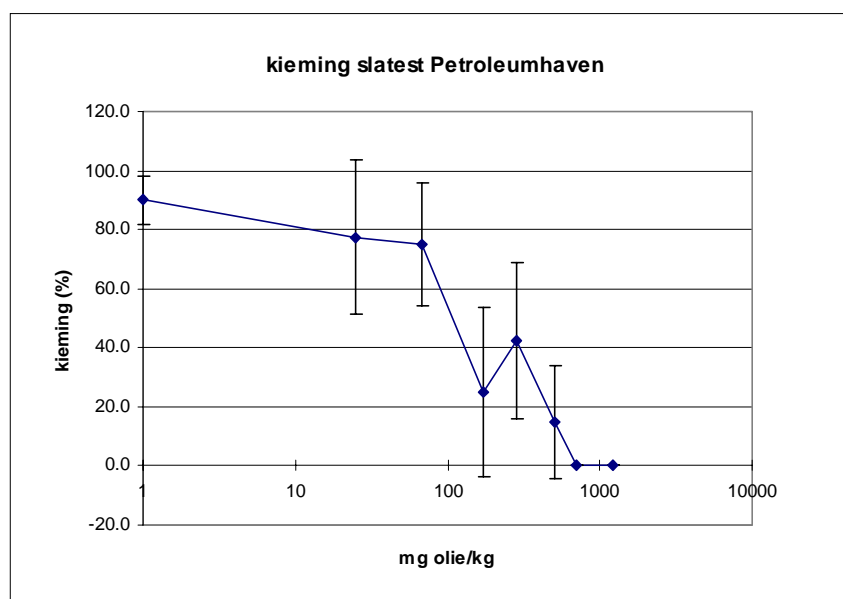
In tabel 3.6 is te zien dat voor monster T10 in één van de twee extracten een matig negatief effect werd gemeten, in monster T7 in alle twee de extracten en in monster T8 in geen van beide extracten. Hiermee veroorzaakt het extract van monster T10 minder negatieve effecten en het extract van T7 meer negatieve effecten dan het elutriaat van hetzelfde monster. Voor monster T8 werd zowel voor het elutriaat als het extract géén effect gemeten.

3.6.2. *Slatest*

De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.6.

Kieming

Uit tabel 3.6 blijkt dat de kieming van slazaadjes in de monsters van locatie Petroleumhaven negatief beïnvloed wordt vanaf een concentratie van 171 mg olie/kg. Deze effecten worden als ernstig negatief effect geclassificeerd.



Figuur 3.13 Kieming van de slazaden in de monsters van locatie Petroleumhaven.

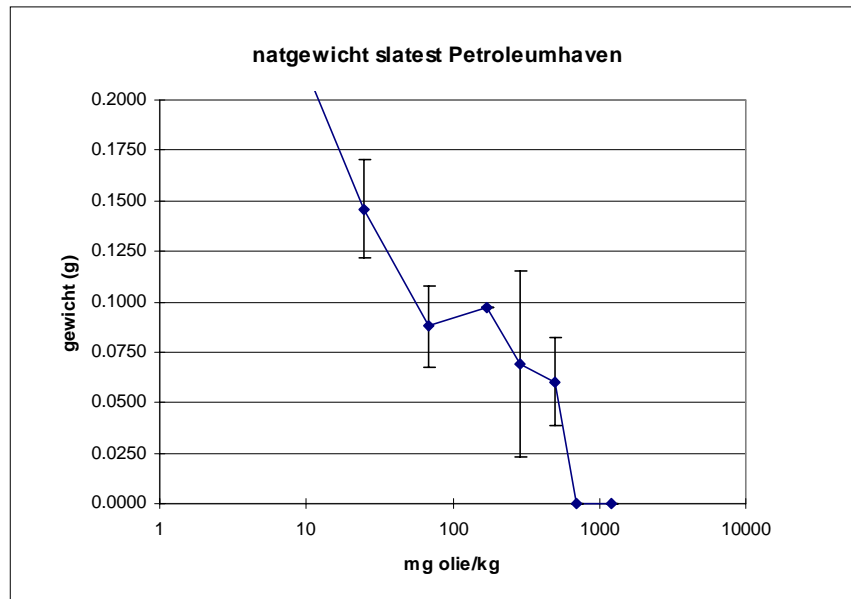
Natgewicht

De groei van de slaplantjes wordt negatief beïnvloed in alle met olieverontreinigde monsters. In monster T12 (68 mg olie/kg) heeft naast olie ook zink wellicht bijgedragen aan de groeiremming. Er wordt een trend waargenomen naar toenemend effect bij toenemende olieconcentratie. Het effect wordt voor de monsters T12 en T2 (68 en 171 mg olie/kg) als matig negatief effect geclassificeerd en voor de monsters T5 en T10 (284 en 500 mg olie/kg) als ernstig negatief effect.

Monster T7 en T8 (707 en 1203 mg olie/kg) kunnen niet beoordeeld worden op natgewicht doordat er geen kieming optrad.

Eindoordeel

Vanaf 171 mg olie/kg wordt de kieming van slazaadjes ernstig negatief beïnvloed. Matig negatieve effecten op de groei van sla worden al waargenomen bij een olieconcentratie van 68 mg olie/kg. In monster T5 (68 mg olie/kg) zou dit effect echter mede veroorzaakt kunnen zijn door de aangetroffen zinkverontreiniging. Boven de 284 mg olie/kg wordt de groei van sla ernstig negatief beïnvloed.



Figuur 3.14 Groei van sla op de monsters van locatie Petroleumhaven.

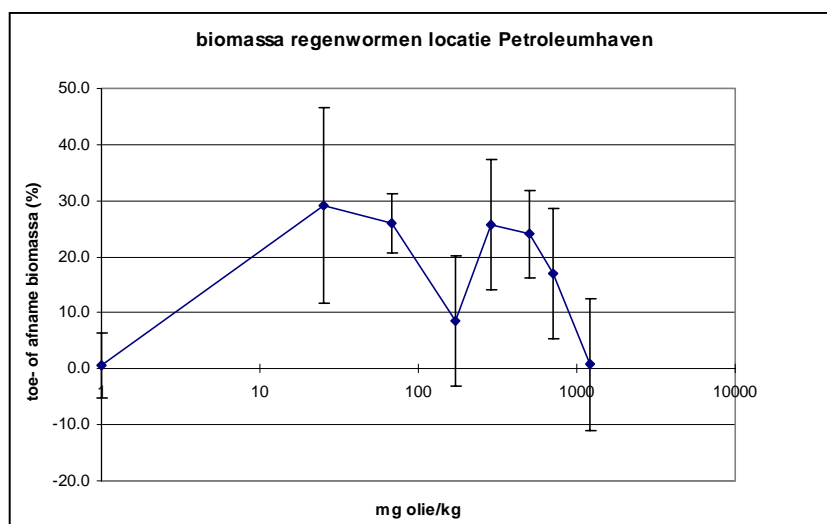
3.6.3. Regenwormenreproductietest

De resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.6. Conform de richtlijn is de beoordeling gebaseerd op de overleving, de gewichtstoe- of -afname en het aantal juvenielen per worm.

Zoals in paragraaf 3.1 toegelicht is, zijn voor deze test wegens het nog niet volledig volwassen zijn van de wormen de geldigheidscriteria voor aantal juvenielen per pot en 'Coefficient of Variation' niet gehaald. Omdat er echter geen monsternormaal meer was om de test overnieuw te kunnen uitvoeren worden de resultaten echter toch gepresenteerd. De verwachting is dat de gevonden effecten een goede indicatie geven. Bij herhalen van de test zou mogelijk zelfs bij lagere concentraties effect kunnen worden aangetoond, omdat bij een hoger aantal juvenielen en een geringere variatie in de gegevens effecten sneller significant verschillend zijn.

Overleving en biomassa

Er is géén effect op de overleving van de regenwormen waargenomen. Ook op de groei van de regenwormen zijn geen significante effecten waargenomen, hoewel de groei bij de hoogste concentratie wat minder is dan in de overige monsters. De wormen zijn in de monsters van de Petroleumhaven, met uitzondering van de hoogste concentratie, duidelijk beter gegroeid dan in kunstgrond (zie figuur 3.15).



Figuur 3.15 Biomassa van de regenwormen op locatie Petroleumhaven.

Reproductie

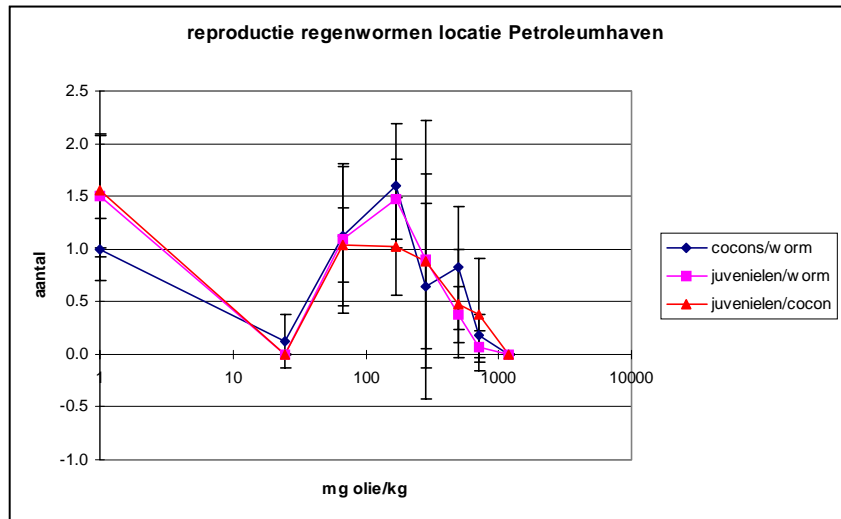
In de lokale referentie heeft géén reproductie plaatsgevonden. Hiervoor is geen verklaring gevonden. Daarom worden de resultaten van de reproductie in tabel 3.6 niet uitgedrukt ten opzichte van de lokale referentie, maar als absolute getallen gepresenteerd.

De reproductie is in absolute zin vrij laag in verhouding met andere locaties en de spreiding is vrij hoog. Hierdoor zijn uitsluitend bij de hoogste concentratie, 1203 mg olie/kg, significante negatieve effecten waargenomen, die als ernstig negatief effect worden geclassificeerd.

Indien de lokale referentie buiten beschouwing wordt gelaten wordt wel een dosis-effect relatie waargenomen. Vanaf 500 mg olie/kg daalt, hoewel niet significant, ook het aantal juvenielen per cocon. Omdat het aantal juvenielen per cocon meestal constant blijft, vormt dit een aanwijzing voor negatieve effecten van de olieverontreiniging.

Eindoordeel

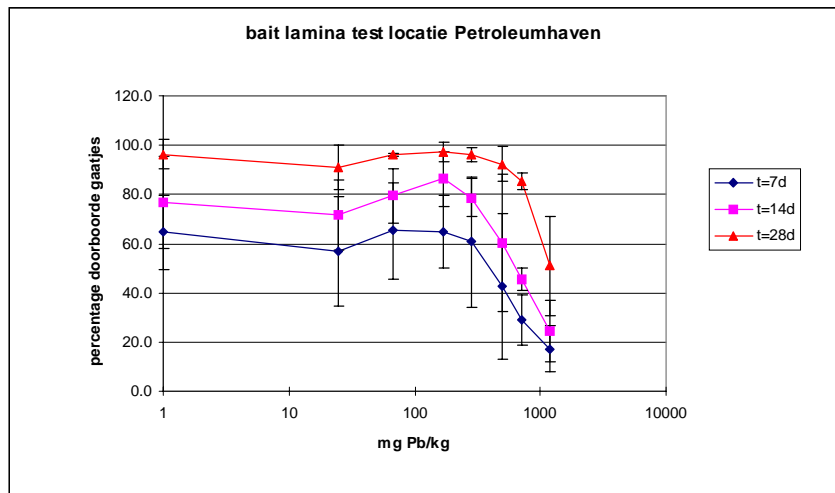
De overleving en groei van regenwormen wordt niet significant beïnvloed. Bij 1203 mg olie/kg worden ernstig negatieve effecten op de reproductie waargenomen. De resultaten geven echter aanwijzingen dat al vanaf 500 mg olie/kg de reproductie negatief wordt beïnvloed.



Figuur 3.16 Reproductie van de regenwormen op locatie Petroleumhaven.

3.6.4. Bait lamina test

De bait lamina test vertoont een duidelijke dosis-effect relatie. Door de hoge spreiding is het effect alleen op t=14d en t=28d in de hoogste concentratie (1203 mg olie/kg) significant en wordt als ernstig, respectievelijk matig negatief effect geassocieerd.



Figuur 3.17 Consumptiesnelheid in de bait lamina test op locatie Petroleumhaven.

Eindoordeel

Er zijn in de bait lamina test ernstig negatieve effecten waargenomen bij een concentratie van 1203 mg olie/kg.

3.7. Gasfabrieksterrein Oude Pekela

De resultaten van de bioassays met de monsters van de locatie Oude Pekela worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.7 en worden in paragraaf 3.7.1 t/m 3.7.2 per bioassay toegelicht.

De monsters van locatie Oude Pekela bevatten zowel hoge concentraties cyanide als hoge concentraties PAK's. Omdat in eerdere bioassays, onder andere bij locatie NS Kerkrade, is gevonden dat PAK's in zelfs relatief hoge concentraties niet of nauwelijks negatieve effecten hebben, wordt cyanide echter als de belangrijkste veroorzaker van toxiciteit beschouwd. De concentratiereeks is hierom gebaseerd op het CN-totaal gehalte. De concentraties vrij cyanide en cyanide in de vorm van thiocynaat volgen het totaal cyanide gehalte in vrijwel gelijke verhoudingen.

3.7.1. Microtox test

Omdat met de andere testen reeds toxiciteit is aangetoond zijn, in verband met het mogelijk vrijkomen van zeer toxisch HCN-gas, met de monsters van het gasfabrieksterrein in Oude Pekela géén Microtox testen uitgevoerd.

3.7.2. Slatest

De resultaten van de kiemings- en groeitest met sla worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.7.

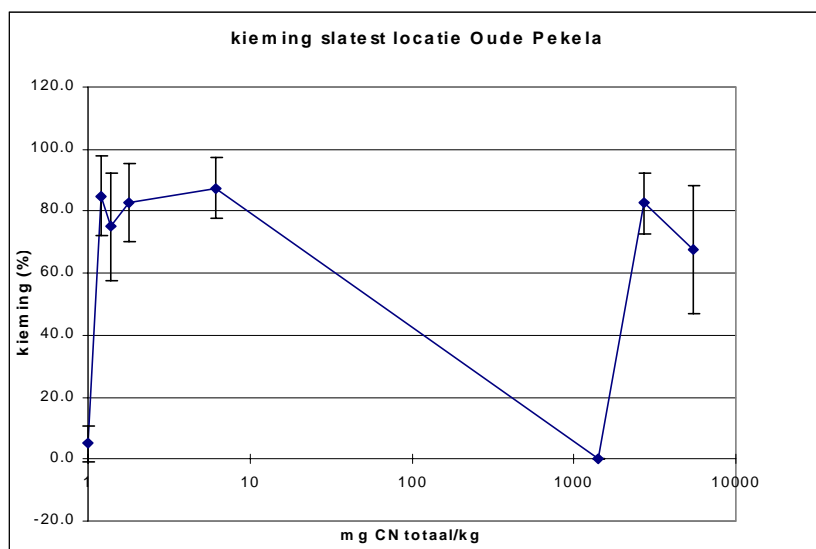
Kieming

De kieming van de slazaadjes in de monsters van locatie Oude Pekela is alleen in monster O.P.2 (1400 mg CN-totaal) ernstig negatief beïnvloed. In dit monster kiemde geen enkel zaadje. Het is echter waarschijnlijk dat de lage pH van het monster (pH-KCl 3,5 tot 2,2 gedurende de test) de kieming heeft beïnvloed (zie ook discussie). Ook in monster O.P. 4 was de kieming lager dan in de overige monsters (67,5%) maar vanwege de hoge spreiding was dit effect niet significant.

Tabel 3.7

Samenvatting en beoordeling van de resultaten van de bioassays met monsters van locatie Oude Pekela. Verklaring gebruikte (kleur)codes: n.b. = niet bepaald; a = niet te bepalen wegens volledig effect op kieming; b = niet gekwantificeerd, zie tekst; niet gearceerd (-) = geen negatief effect; licht gearceerd (+/-) = matig negatief effect; donker gearceerd (+) = ernstig negatief effect. Let op: een negatief % effect ten opzichte van de lokale referentie betekent dat dit monster gestimuleerd is.

| monstercode | chemie | | | | | | | | | | slia | | regenworm | | | bait lamina | | eindclassificatie |
|-------------|-------------|---------------------|-------------------|--------------------------|------------------|---------|------------------|-------------------------------|---|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|-------------------|
| | monstercode | CN-totaal (mg/kgds) | CN-vrij (mg/kgds) | CN-thiocyanaat (mg/kgds) | PAK 10 (mg/kgds) | % Iutum | % organisch stof | pH-KCl slatest (t=0d - t=28d) | pH-KCl regenwormen- en bait laminaat (t=0d - t=28d) | Kieming (%) | % effect op natgewicht t.o.v. ref. | % effect op drooggewicht t.o.v. ref. | overleving (%) | afname gewicht t.o.v. ref (%) | % effect op aantal juvenielen per worm t.o.v. ref | % effect op t=7d t.o.v. ref | % effect op t=28d t.o.v. ref | |
| 309274 | O.P.6 | 1.2 | <1 | 1.3 | 16 | 7.3 | 2.7 | 5.7 - 5.4 | 5.8 - 5.5 | 85.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - |
| 309275 | O.P.8 | 1.4 | 1.3 | 4.1 | 1.9 | 6.2 | 11 | 5.8 - 5.3 | 5.7 - 5.5 | 75.0 | -94.7 | -71.7 | 100.0 | 1.7 | -205.3 | -37.3 | -13.1 | - |
| 309276 | O.P.7 | 1.8 | 1.4 | <0.5 | 42 | 3.3 | 2.2 | 5.5 - 5.5 | 4.1 - 5.5 | 82.5 | 69.0 | 52.8 | 97.5 | -0.6 | 36.8 | 41.8 | 43.5 | + |
| 309277 | O.P.5 | 6.2 | 2.1 | 3.1 | 190 | 6.3 | 11 | 6.0 - 5.7 | 4.2 - 5.5 | 87.5 | -68.1 | -65.2 | 100.0 | -2.2 | 15.8 | 22.8 | 36.7 | - |
| 309278 | O.P.2 | 1400 | 62 | 61 | 400 | 1.5 | 3.4 | 3.5 - 2.2 | 3.6 - n.b. | 0.0 | a | a | b | b | b | 90.5 | 90.0 | + |
| 309279 | O.P.1 | 2700 | 210 | 190 | 240 | 1.8 | 5.1 | 4.0 - 3.4 | n.b. | 82.5 | 79.7 | 73.0 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | + |
| 309280 | O.P.4 | 5500 | 81 | 98 | 170 | 7.5 | 19 | 4.0 - 3.2 | 2.8 - n.b. | 67.5 | 86.5 | 90.2 | b | b | b | 61.3 | 60.5 | + |
| 309534 | O.P.3 | 21000 | 320 | 380 | 4400 | 4.8 | 20 | n.b. | 2.5 - n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | b | b | b | 89.4 | 90.8 | + |



Figuur 3.18 Kieming van slazaadjes op de monsters van locatie Oude Pekela.

Natgewicht

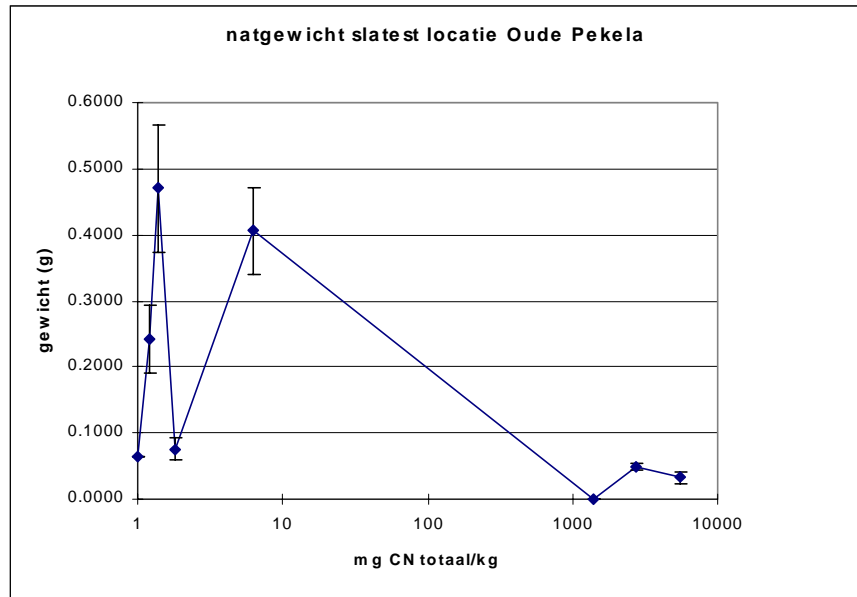
In de slatest is zowel een significante groeistimulatie als groeiremming ten opzichte van de lokale referentie waargenomen. De groeistimulatie vond alleen plaats in monsters met een relatief laag CN-totaal gehalte (O.P. 8 en O.P.5, respectievelijk 1,4 en 6,2 mg CN-totaal/kg). Opvallend is de slechte groei in monster O.P.7, bij het relatief lage CN-gehalte van 1,8 mg CN-totaal/kg. Bij een concentratie CN-totaal van 2700 mg/kg of hoger is de groei zeer duidelijk negatief beïnvloed. Met toenemende verontreinigingsgraad neemt de pH in deze monsters echter ook af (pH-KCl 2,2 – 4,0 gedurende de test). De lage pH een indirect gevolg van de verontreiniging en hangt daar mee samen. Het effect van cyanide daardoor niet te onderscheiden is van een pH-effect. Gezien de aanwezigheid van een dosis-effect relatie is het echter aannemelijk dat de verontreiniging ook een rol heeft gespeeld.

Eindoordeel

Er zijn in de slatest zowel groeistimulatie als ernstig negatieve effecten waargenomen. Omdat bij toenemende verontreiniging met cyanide de pH ook sterk afneemt, zijn negatieve effecten niet te onderscheiden van een pH-effect.

3.7.3. Regenwormenreproductietest

De resultaten van de regenwormenreproductietest worden samengevat en beoordeeld in tabel 3.7. Conform de richtlijn is de beoordeling gebaseerd op de overleving, de gewichtstoe- of -afname en het aantal juvenielen per worm.



Figuur 3.19 Groei van sla op de monsters van locatie Oude Pekela.

Overleving en biomassa

Tot en met een concentratie van 6,2 mg CN-totaal/kg en 190 mg PAK/kg worden geen negatieve effecten op de overleving of groei van de regenwormen waargenomen. Vanaf een concentratie van 1400 mg CN-totaal/kg worden ernstig negatieve effecten op de overleving en groei waargenomen (tusseliggende concentraties waren niet voor handen binnen de beschikbare reeks monsters). Deze negatieve effecten bij hogere concentraties zijn echter niet exact gekwantificeerd. Tijdens de test werden in alle monsters met een concentratie van 1400 mg CN-totaal/kg of hoger binnen twee weken meer dan 5 dode wormen op het oppervlak aangetroffen, dat wil zeggen meer dan 50% sterfte dus een ernstig negatief effect. Bovendien werd het voer niet of nauwelijks opgegeten en ook uit de resultaten van de bait lamina test bleek dat de wormen niet of nauwelijks actief waren (zie paragraaf 3.8 voor toelichting). Op basis hiervan is geconcludeerd dat een ernstig negatief effect op de overleving en biomassa van de wormen reeds voldoende was aangetoond en zijn deze drie monsters, met name om veiligheidsredenen, niet verder uitgezocht.

Net als bij de slatest geldt dat met toenemende verontreinigingsgraad de pH in deze monsters ook afneemt (pH-KCl 2,2 – 4,0 gedurende de test), waardoor het effect van cyanide niet te onderscheiden is van een pH-effect.

Reproductie

Voor deze locatie is een aangepaste manier gebruikt om de reproductie te bepalen. De grond is na 4 weken, na het uitzoeken van de volwassenen, weer terug gestopt in de pot. Na totaal 8 weken zijn de potten gedurende enige tijd in een warm waterbad (60°C) geplaatst, waardoor de juvenielen aan het oppervlakte komen en worden gescoord. Op deze wijze wordt géén inzicht verkregen in het aantal cocons per worm en het aantal juvenielen per cocon, maar wordt wél

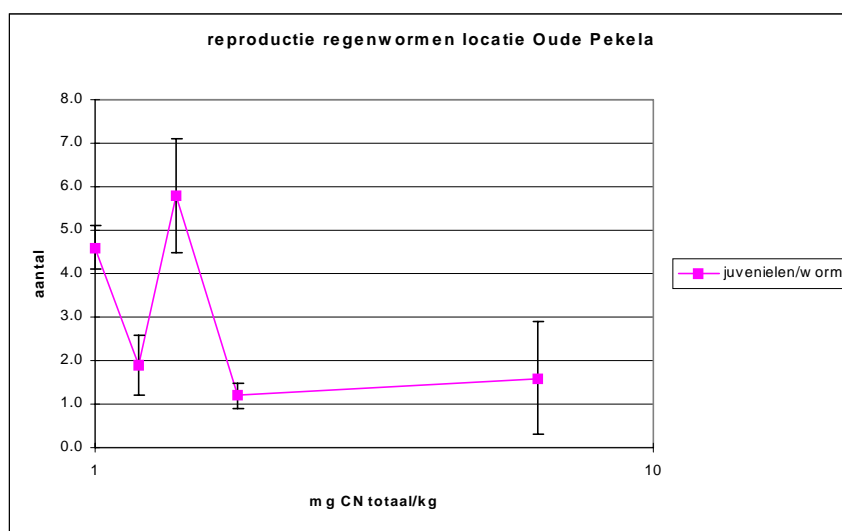
voorkomen dat grote hoeveelheden cyanidehoudende grond door de afvoer wordt gespoeld.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.7 en figuur 3.20. De reproductie van de regenwormen wordt tot een concentratie van 6,2 mg CN-totaal/kg en 190 mg PAK/kg niet negatief beïnvloed ten opzichte van de lokale referentie. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de reproductie in de lokale referentie relatief laag is ten opzichte van kunstgrond en monster O.P. 8. (1,4 mg CN-totaal/kg).

Bij een cyanide concentratie vanaf 1400 mg CN-totaal/kg wordt, gezien het effect op de overleving en de activiteit van de regenwormen, aangenomen dat er niet of nauwelijks reproductie heeft plaatsgevonden. De reproductie is echter niet gescoord.

Eindoordeel

Er zijn in de regenwormentest vanaf een concentratie van 1400 mg CN-totaal/kg ernstig negatieve effecten op de overleving van de regenwormen waargenomen. Omdat bij toenemende verontreiniging met cyanide de pH ook sterk afneemt, zijn deze negatieve effecten echter niet te onderscheiden van een pH-effect.



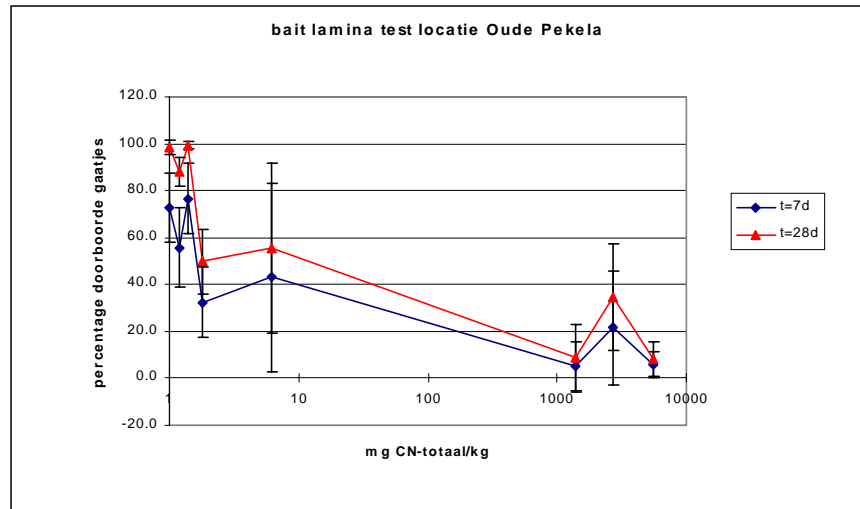
Figuur 3.20 Reproductie van de regenwormen op locatie Oude Pekela. In de figuur zijn alleen de monsters waarvan de reproductie is gekwantificeerd weergegeven.

3.7.4. Bait lamina test

De bait lamina test is voor deze locatie twee maal uitgevoerd, eenmaal gecombineerd met de regenwormentest en eenmaal zonder regenwormen. De test zonder regenwormen is bedoeld om de bijdrage van regenwormen aan de consumptiesnelheid te testen en zal in paragraaf 3.8 besproken worden.

De score op t=14d is vervallen. De resultaten van de bait lamina test (figuur 3.21) laten zien dat de consumptiesnelheid afneemt met

toenemende cyanideconcentratie. Dit effect was alleen op t=28d vanaf 1400 mg CN-totaal/kg significant. Net als bij de slatest en regenwormentest geldt dat dit effect niet te onderscheiden is van een pH-effect.



Figuur 3.21 Consumptiesnelheid in de bait lamina test op locatie Oude Pekela.

Eindoordeel

Er zijn in de bait lamina test vanaf 1400 mg CN-totaal/kg ernstig negatieve effecten op de consumptiesnelheid waargenomen. Omdat bij toenemende verontreiniging met cyanide de pH ook sterk afneemt, zijn deze negatieve effecten echter niet te onderscheiden van een pH-effect.

3.8. Correlatie regenwormenreproductietest en bait lamina test

De eerste resultaten van de eerste locaties deden vermoeden dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen de resultaten van de regenwormenreproductietest en de consumptiesnelheid in de bait lamina test. Dit zou betekenen dat de consumptiesnelheid in de bait lamina test voornamelijk door de activiteit van de regenwormen wordt bepaald, ofwel doordat de regenwormen rechtstreeks van het substraat eten, ofwel doordat ze de microflora activeren of beiden. Daarom is voor alle locaties de correlatiecoëfficiënt tussen de resultaten van beide testen bepaald.

Voor de bepaling van de correlatiecoëfficiënt tussen de resultaten van de regenwormenreproductietest en de bait laminatetest is uitgegaan van een lineaire relatie ($y = a + bx$). De correlatiebepaling werd beperkt tot de relatie van de resultaten van de bait laminatetest en het aantal cocons per worm en aantal juvenielen per worm. De overleving van de regenwormen en het aantal juvenielen per cocon zijn niet bij de correlatiebepaling betrokken, omdat beiden pas bij zeer hoge concentraties worden beïnvloed. De correlatie is daardoor laag.

De correlatiecoëfficiënten (R^2) zijn voor elke locatie apart bepaald. De gevonden waarden voor a, b en R^2 staan in bijlage 3. De correlatiecoëfficiënten worden in tabel 3.8 samengevat.

Tabel 3.8 Correlatiecoëfficiënten (R^2) voor de relatie tussen de regenwormen reproductie en de consumptiesnelheid in de bait lamina test op t=7, 14 en 28d. N.b. = niet bepaald.

| Locatie | | R^2 ; t=7d | R^2 ; t=14d | R^2 ; t=28d |
|---------------------------------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|
| <i>Bornia</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.73 | 0.86 | 0.90 |
| | juvenielen/worm | 0.65 | 0.78 | 0.83 |
| <i>EPON-locatie</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.82 | 0.82 | 0.76 |
| | juvenielen/worm | 0.77 | 0.76 | 0.69 |
| <i>NAM Schoonebeek</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.70 | 0.77 | 0.81 |
| | juvenielen/worm | 0.72 | 0.74 | 0.75 |
| <i>Petroleumhaven</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.53 | 0.57 | 0.43 |
| | juvenielen/worm | 0.61 | 0.58 | 0.37 |
| <i>Oude Pekela</i> | | | | |
| | juvenielen/worm | 0.87 | n.b. | 0.79 |
| <i>Gemiddeld</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.70 | 0.76 | 0.73 |
| | juvenielen/worm | 0.69 | 0.72 | 0.66 |
| <i>Gemiddeld excl. Petroleumhaven</i> | | | | |
| | cocons/worm | 0.75 | 0.82 | 0.82 |
| | juvenielen/worm | 0.71 | 0.76 | 0.76 |

Er blijkt een duidelijke correlatie te zijn tussen de reproductie van de regenwormen en de resultaten van de bait lamina test, waarbij de correlatie met het aantal cocons per worm steeds iets groter is als met het aantal juvenielen per worm (0,43 - 0,90 tegen 0,37 – 0,87). Verder blijkt de correlatie locatieafhankelijk, hetgeen zich uit in locatieafhankelijk waarden voor a en b (zie bijlage 3). Wanneer de data van alle locaties op één hoop worden gegooid is er géén correlatie meer aantoonbaar (R^2 maximaal 0.29). De correlatiecoëfficiënten voor locatie Petroleumhaven zijn relatief laag (0,37 – 0,61). Indien deze locatie niet wordt meegenomen is de gemiddelde correlatiecoëfficiënt voor de overige locatie 0,75 – 0,82 voor het aantal cocons per worm en 0,71 – 0,76 voor het aantal juvenielen per worm.

4. Discussie

Voor locatie Bornia, de EPON locatie, locatie SBNS Kerkrade-West en de Petroleumhaven zijn actuele ecologische risico's aangetoond. Ook voor locatie NAM Schoonebeek en Oude Pekela zijn negatieve effecten aangetoond, die echter niet te onderscheiden zijn van een pH-effect.

Hieronder worden de resultaten in meer detail per locatie bediscussieerd, waarbij locaties met een zelfde type verontreiniging onderling worden vergeleken. Daarnaast wordt de correlatie tussen de resultaten van de regenwormenreproductietest en de bait lamina test bediscussieerd.

4.1. Locatie Bornia

Uit de resultaten blijken op deze locatie ernstige ecologische risico's aanwezig te zijn bij een loodconcentratie van 220 mg Pb/kgds of hoger. Bij 21 mg Pb/kgds werden matige risico's aangetoond. Hiervoor werden verschillende bioassays gebruikt, die hieronder per bioassay worden besproken.

4.1.1. Microtoxtest

De resultaten van de Microtoxtest laten zeer duidelijk zien dat de monsters ernstig negatief zijn. De concentratie lood in de bodem waarbij effect optreedt in de Microtoxtest is erg laag (vanaf 21 mg Pb / kg ds). De interventiewaarde voor lood is voor deze locatie vele malen hoger, nl. 330 mg Pb /kg ds bij een organisch stofgehalte van 2% en een lutumgehalte van 0,5%. Uit de metingen van de loodgehalten in het elutriaat blijkt echter dat de beschikbaarheid hoog is, en de in de Microtoxtest waargenomen effecten volledig kan verklaren. De hoge

beschikbaarheid van lood kan verklaard worden door de lage pH-KCl (3,4 tot 4,0 bij aanvang van de bioassays) en het lage organisch stof en lutumgehalte. De verschillen in beschikbaarheid, die tot uitdrukking komen in de loodconcentratie in het elutriaat van de verschillende monsters, lijken verklaard te kunnen worden op basis van verschillen in organisch stofgehalte.

4.1.2.Slatest

De slatest lijkt minder geschikt voor het testen van zure en zandige monsters van de locatie Bornia. Zowel de kieming als de groei zijn vrij laag. Toch wordt echter nog steeds een afname van de groei waargenomen bij toenemende loodconcentratie.

Een mogelijke verklaring voor de relatief lage kieming kan zijn dat deze zandige monsters tussen het watergeven door sterk uitdrogen, met name in de bovenste laag, waardoor de zaden slechter kiemen. Dit is een effect van de bodemtextuur, onafhankelijk van de verontreiniging.

Opvallend is de relatief slechte kieming bij 290 mg Pb / kg ds (27,5% ten opzichte van 52,5 tot 85,0% in de andere monsters). Dit wordt mogelijk veroorzaakt door de lage pH. De pH-KCl was het laagste van alle monsters uit de reeks (3,3 tot 3,4 gedurende de test, terwijl de rest varieerde van 3,4 tot 4,6). Over de effecten van de pH op de kieming van slazaden is echter nog weinig bekend.

Ook de slechte groei van de slaplantjes wordt zeer waarschijnlijk veroorzaakt door de lage pH. Van Gestel *et al.* (1992a) vonden een slechte groei van sla op gronden uit natuurgebieden met een pH-KCl <3,5. Bij een pH-KCl ≤ 3,0 vonden ze vrijwel geen groei meer. De pH-KCl waarden van de monsters van deze locatie liggen dicht bij deze waarden in de buurt (3,4 tot 4,0 bij aanvang van de test).

4.1.3.Regenwormenreproductietest

In de regenwormenreproductietest zijn zeer ernstig negatieve effecten waargenomen, die toenemen bij toenemende loodverontreiniging. Overleving en groei blijken, zoals verwacht, minder gevoelig op loodverontreiniging te reageren dan de reproductie. Bij een loodconcentratie van 220 mg Pb/kgds of hoger is de reproductie vrijwel nihil. Deze effecten op de reproductie van de regenwormen vertonen een correlatie met de resultaten van de Microtoxtest en met de concentraties in de bodem.

Opvallend is dat de biomassa van de regenwormen bij 460 en 620 mg Pb/kgds significant verlaagd is, terwijl bij 880 mg Pb/kgds geen verschillen met de referentie worden waargenomen. Bij het laatste monster werd echter wel een verhoogde sterfte waargenomen. Mogelijk zijn de regenwormen die blootstelling aan dit monster overleefden extra gegroeid vanwege het hoger voedselaanbod.

De lage pH lijkt de overleving en de groei van regenwormen niet beïnvloed te hebben. Ook van Gestel *et al.* (1992a) vonden voor regenwormen geen effect op de overleving of biomassa toename bij een pH-KCl tussen de 2,5 en 6,3.

Zowel bij het aantal cocons per worm als het aantal juvenielen per worm werd een duidelijke dosis-effect relatie waargenomen. Het aantal juvenielen dat per cocon uitkomt is redelijk constant.

De reproductie in de lokale referentie is lager dan in kunstgrond. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de lage pH. Van Gestel *et al.* (1992b) toonden aan dat bij een pH-KCl van 4,0 de reproductie verlaagd was. Het is tevens bekend dat regenwormen minder goed reproduceren in zandgrond (persoonlijke mededeling Dhr. van Gestel, Faculteit der Biologie, Vrije Universiteit Amsterdam). Een additioneel effect van de bodemtextuur (zandige bodem) is voor de locatie Bornia daarom niet geheel uit te sluiten. Het pH-effect is echter waarschijnlijk overheersend, omdat de reproductie van de regenwormen in de eveneens zandige lokale referentie van de EPON locatie, maar met een pH van 7,4 tot 8,6 gedurende de test, gelijk was aan die van kunstgrond.

4.1.4. Bait lamina test

In de bait lamina test is een duidelijk afnemende consumptiesnelheid bij hogere loodconcentraties waargenomen. De monsters verschillen echter niet significant van de lokale referentie.

De consumptiesnelheid in de lokale referentie van de Bornia locatie is laag te noemen (53,4 % na 28 dagen tegenover 98.1% in de kunstgrond). Hierdoor is het ook moeilijker om significante verschillen tussen de monsters aan te tonen. De lage consumptiesnelheid is waarschijnlijk een gevolg van de lage pH van de grond (pH-KCl 3,4 tot 4,0 bij aanvang van de test). In de, tevens zandige, lokale referentie van de EPON locatie was de consumptiesnelheid namelijk wel hoog (85,6% na 28 dagen, bij een pH van 7,4 tot 8,6 gedurende de test). De consumptie in de lokale referentie van de EPON-locatie is daarmee niet significant afwijkend van de consumptie in de kunstgrond. Ook in andere, door AquaSense uitgevoerde onderzoeken, leek de consumptiesnelheid in het traject pH-KCl 3,5 tot 6,0 hoger bij hogere pH's.

4.2. EPON locatie

Uit de resultaten blijken op deze locatie ernstige ecologische risico's aanwezig te zijn bij een olieconcentratie van 440 mg olie/kgds of hoger. Bij 79 en 160 mg olie/kgds werden matige risico's aangetoond. Hiervoor werden verschillende bioassays gebruikt, die hieronder per bioassay worden bediscussieerd.

4.2.1. Microtoxtest

De resultaten van de Microtox vertonen een duidelijke relatie met de olieconcentratie. Bij een olieconcentratie van 1800 mg olie/kgds of hoger worden negatieve effecten waargenomen. Dit komt overeen met resultaten uit eerder onderzoek naar een olieverontreinigde locatie in de Petroleumhaven (Bioclear, 1998b). Op die locatie werd tevens vanaf concentraties die vergelijkbaar zijn met die van de EPON locatie effecten aangetoond in de Microtoxtest.

De effecten in de extracten voor oliekarakterisatie zijn in alle gevallen hoger dan de effecten in het bereide elutriaat, maar volgen beiden een dosis-effect relatie. Blijkbaar wordt er bij de extractbereiding voor de oliekarakterisatie meer olie geëxtraheerd dan bij de elutriaatbereiding met 0,001M Ca(NO₃)₂.

4.2.2. Slatest

Bij een concentratie van 440 mg olie / kg ds of hoger worden ernstig negatieve effecten op de kieming van de slazaadjes waargenomen. Daarnaast wordt ook de groei van de plantjes significant negatief beïnvloed bij een concentratie van 1800 mg olie of hoger, hoewel er al bij 160 mg olie/kgds negatieve, maar niet significante effecten werden waargenomen.

De monsters Pb203 en Pb207 (respectievelijk 1800 en 6800 mg olie/kgds), maar met name Pb203, slibten zeer snel dicht bij het watergeven, waardoor er dagelijks gedurende enige tijd water op het oppervlakte bleef staan. Het is mogelijk dat dit de kieming negatief beïnvloed heeft. Het zal de beoordeling van deze monsters echter niet veranderen. De plantjes die wel opkwamen in deze monsters groeiden namelijk slecht. Bovendien kwamen er geen extra plantjes op gedurende de derde en vierde week van de test, toen de hoeveelheid water die per dag werd gegeven was teruggebracht en er gaatjes in de grond waren geprikt om de doorlatendheid te verbeteren.

4.2.3. Regenwormenreproductietest

Bij de regenwormentest zijn zeer duidelijke effecten waargenomen. Bij een concentratie van 6800 mg olie/kgds willen de regenwormen niet in de grond kruipen en gaan ze allemaal dood. De reproductie (uitgedrukt als het aantal juvenielen per worm) wordt echter al bij een concentratie van 1800 mg olie/kgds of hoger beïnvloed. Deze effecten worden als ernstig negatief effect beoordeeld, en vertonen, net als bij locatie Bornia, een correlatie met de resultaten van de Microtoxtest.

Van Gestel *et al.* (1992b) vonden dat de reproductie van regenwormen afneemt bij een pH-KCl >7. Dit wordt echter tegengesproken door Edwards & Lofty (1997). Volgens hen is de optimale pH voor de regenworm *Eisena fetida* tussen de 7,0 en 8,0. Er lijkt geen reden aan te

nemen dat de pH negatieve effecten op de reproductie heeft gehad: de reproductie in de lokale referentie (met een pH-KCl van 7,4 tot 8,6 gedurende de test) is gelijk aan die van kunstgrond (met een pH-KCl van 7,3 tot 6,0 gedurende de test).

4.2.4. Bait lamina test

In de bait lamina test zijn duidelijke dosis-effect relaties waargenomen. Al vanaf een concentratie van 79 mg olie/kgds wordt een matig negatief effect waargenomen. Bij een concentratie van 440 mg olie /kgds of hoger zijn de effecten ernstig negatief. Hiermee is de bait lamina test op deze locatie de gevoeligste test uit de testbatterij.

4.3. Locatie NAM Schoonebeek

In de testen met de monsters van deze locatie zijn géén duidelijke dosis-effect relaties waargenomen. In alle verontreinigde monsters is de pH erg laag (2,6 – 2,9), terwijl in de lokale referentie de pH wat hoger is (3,5). Het is daarom niet mogelijk om een onderscheid te maken tussen een pH-effect en een effect van de oliecontaminatie. Alleen uit de resultaten van de slatest komen aanwijzingen naar voren dat de ook oliecontaminatie op deze locatie ecologische risico's zou kunnen veroorzaken. De resultaten worden hieronder per bioassay bediscussieerd.

4.3.1. Microtox test

In alle monsters van locatie NAM Schoonebeek werden negatieve effecten aangetoond, óók in de lokale referentie. Er was géén dosis-effect relatie op basis van olieconcentratie. De pH van de monsters en lokale referentie lag tussen de 5,1 en 5,7. Dit ligt binnen de randvoorwaarde voor de pH die het RIZA aanhoudt in haar richtlijnen (pH 5-9; RIZA, 1996), maar buiten de randvoorwaarde voor de pH die in de NVN-norm (NVN 6516, 1993) wordt gegeven (pH 6-8). Over de invloed van pH 5 tot 6 op het resultaat van de Microtox test bestaat dus nog geen eenduidigheid. Om de eventuele invloed van pH én invriezen te kunnen uitsluiten zijn de monsters opnieuw getest, waarbij een vers bereid elutriaat is gemaakt en de pH is aangepast tot ca. 6,5. Uit het feit dat er geen grote verschillen zijn waargenomen, mag geconcludeerd worden dat de pH en/of het invriezen van het elutriaat geen effect heeft gehad. Ook veenvet veroorzaakt géén effecten in de Microtox test.

Omdat ook in de lokale referentie effecten zijn aangetoond en er geen relatie is met de verontreinigingsgraad, moet er iets anders in de

monsters aanwezig zijn dat stoort in de Microtox test. Het wordt aanbevolen nader te onderzoeken wat deze storende factor is geweest.

4.3.2. Slatest

In tabel 3.3 (paragraaf 3.4) is te zien dat de pH van de monsters erg laag is (pH-KCl van 2,6 - 3,1 in de verontreinigde monsters gedurende de test) en dat de pH van de lokale referentie afwijkt van de verontreinigde monsters (pH-KCl 3,5 gedurende de test). De kieming en groei in de lokale referentie is beduidend hoger dan in de verontreinigde monsters, maar wel aanzienlijk lager dan in kunstgrond. Deze resultaten worden bevestigd door resultaten van Van Gestel *et al.* (1992a). Zij vonden een slechte groei van sla op gronden uit natuurgebieden met een pH-KCl <3,5. Bij een pH-KCl ≤ 3,0 vonden ze vrijwel geen groei meer. Het is daarom aannemelijk dat de pH en niet de verontreiniging de belangrijkste veroorzaker van het waargenomen negatieve effect is.

Desondanks lijkt de groei van sla in monsters met hoge olieconcentratie nog slechter dan in de monsters met lage olieconcentratie. In de twee hoogste concentraties kiemden en groeiden zelfs helemaal geen plantjes meer, terwijl de pH niet afwijkend was. Het is daarom aannemelijk dat er óók een negatieve invloed van de verontreiniging is. Om meer inzicht te krijgen in de toxiciteit van verontreiniging en eventuele beïnvloeding door de pH uit te sluiten, zouden (een deel van) de monsters opnieuw getest kunnen worden met aangepaste pH, bijvoorbeeld pH 6. Er was echter in dit onderzoek niet voldoende monstermateriaal meer aanwezig om opnieuw te testen. Het blijft dus in dit geval niet mogelijk het waargenomen effect te onderscheiden van een pH-effect.

4.3.3. Regenwormenreproductietest

Er werden in de regenwormtest geen effecten op overleving of groei waargenomen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de overleving en groei tot een pH-KCl van 2,6 niet beïnvloed wordt. Deze bevinding wordt bevestigd door van Gestel *et al.* (1992a). Zij vonden bij een pH-KCl tussen de 2,5 en 6,3 geen effect op de overleving of groei.

De reproductie is in alle monsters duidelijk lager dan in de lokale referentie, waarbij er geen duidelijke dosis-effect relatie is waar te nemen. Mede omdat de pH van de lokale referentie hoger is dan die van de monsters (3,5 versus 2,6 – 2,9), is het aannemelijk dat de pH de belangrijkste oorzaak van de lage reproductie is. De waarschijnlijke invloed van de pH wordt bevestigd door van Gestel *et al.* (1992b) die al bij een pH-KCl van 4,0 aantoonde dat de reproductie verlaagd was. Gezien het feit dat de reproductie in de lokale referentie lager is dan in de kunstgrondblanco (2,8 versus 4,9 juvenielen per worm) is het niet onwaarschijnlijk dat ook in de lokale referentie de reproductie reeds negatief is beïnvloed door de lage pH.

4.3.4. Bait lamina test

Voor de bait lamina test werd in alle verontreinigde monsters een zeer lage consumptiesnelheid gemeten. De consumptiesnelheid in de lokale referentie is wel normaal. Net als voor de slatest en de regenwormenreproductie is het aannemelijk dat de lage pH hiervoor de belangrijkste oorzaak is, mede omdat er geen dosis-effect relatie is waargenomen. Bovendien werd ook voor locatie Bornia en voor andere door AquaSense onderzochte locaties bij een pH van 3 tot 4 een lage consumptiesnelheid gevonden, die toe leek te nemen met toenemende pH.

4.4. Locatie SBNS - Kerkrade West

Uit de resultaten van de slatest en de regenwormentest blijkt dat de cocktail aan verontreinigingen op deze locatie ecologische risico's veroorzaakt. Hierbij kon echter géén correlatie met één bepaald verontreinigingstype worden aangetoond. In de Microtoxtest werden geen negatieve effecten aangetoond. De bait lamina test is voor deze locatie niet uitgevoerd wegens de structuur van de geteste grondmonsters.

De op voorhand gekozen lokale referentie bleek qua structuur en pH niet goed vergelijkbaar met de overige monsters. De resultaten zijn daarom niet vergeleken met de lokale referentie maar beoordeeld op basis van expert judgement. De resultaten worden hieronder per bioassay bediscussieerd.

4.4.1. Microtoxtest

Ondanks het feit dat de concentraties PAK's en metalen in de monsters van locatie SBNS Kerkrade-West hoog tot zeer hoog zijn, zijn in de Microtoxtest géén negatieve effecten gemeten. Wellicht is de beschikbaarheid van de verontreinigingen op de locatie SBNS Kerkrade-West laag.

4.4.2. Slatest

De kieming van de slazaden is in alle monsters inclusief lokale referentie gelijk en wordt dus niet beïnvloed door de aanwezige verontreinigingen (tot 260 mg PAK(10)/kg, 7400 mg Zn/kg, 1100 mg Pb/kg en 560 mg Cu/kg) of door de pH binnen het onderzochte traject (pH-KCl van 3,7 tot 7,0).

De groei van sla is voor vijf van de zes onderzochte monsters laag. In monster T8,v6 is de groei vergelijkbaar met de groei in kunstgrond. Dit

monster bevat een cocktail van verontreinigingen (PAK's, Zn, Pb en Cu) maar de concentraties zijn relatief laag ten opzichte van de andere monsters. In monster T9,v2 is de groei waarschijnlijk laag vanwege de lage pH (pH-KCl 3,7 - 3,9 gedurende de test versus pH 5,5 -7,0 voor de overige monsters). Van Gestel *et al.* (1992a) vonden een slechte groei van sla op gronden uit natuurgebieden met een pH-KCl <3,5 het geen dicht in de buurt van de pH van monster T9,v2 ligt.

In de overige vier monsters is het, gezien het (zeer) hoge verontreinigingsniveau aannemelijk, dat de aanwezige verontreinigingen in monster T8,v4 (Zn), T8,v5 (Pb en Zn), T9,v3 (PAK's) en T7,v4 (PAK's, zink, lood, koper en EOX) hebben bijgedragen aan deze slechte groei.

4.4.3. Regenwormenreproductietest

De reproductie van de regenwormen is alleen in monster T8,v5 significant negatief beïnvloed. Dit wordt waarschijnlijk vooral veroorzaakt door de hoge concentratie lood in dit monster (1100 mg Pb/kg). Hoewel ook zink in hoge concentraties voorkomt (2100 Zn/kg) werd namelijk in andere monsters bij nog hogere concentraties zink géén negatief effect aangetoond.

Opmerkelijk is dat de regenwormen in monster T8,v4 niet beïnvloed worden, terwijl dit monster toch zeer hoge concentraties metalen, tot ruim boven de interventiewaarden, bevatten (140 mg Cu/kg, 510 mg Pb/kg en 7400 mg Zn/kg). Dergelijke concentraties lood alleen al veroorzaakten bij locatie Bornia zeer ernstige effecten. De beschikbaarheid van de verontreinigingen is waarschijnlijk erg laag. Factoren die hierbij een rol spelen zijn de iets hogere pH (in vergelijking met locatie Bornia) en mogelijk ook de vorm waarin de metalen op deze locatie voorkomen (SINTELS?????).

Verder valt op de reproductie in monster T9,v2 (met een pH van circa 4,0) lager ligt dan in de overige monsters (met een pH van 5,2 tot ongeveer 7,0). Dit vormt wederom een aanwijzing dat de reproductie van regenwormen bij een pH van 4,0 of lager negatief wordt beïnvloed.

4.4.4. Bait lamina test

De bait lamina test is voor deze locatie niet uitgevoerd wegens de aanwezigheid van vele stenen in de monsters. Hierdoor is het niet goed mogelijk de strips in de grond te steken en maken de strips slecht contact met de grond.

4.5. Locatie Petroleumhaven

Uit de resultaten van de slatest blijkt dat de olieverontreiniging op deze locatie in ieder geval vanaf ongeveer 170 mg olie/kg ecologische risico's veroorzaakt. In de Microtoxtest, regenwormtest en bait lamina test worden vanaf ongeveer 500 mg olie/kg effecten waargenomen. De resultaten worden hieronder per bioassay bediscussieerd.

4.5.1. Microtoxtest

Slechts in één van de onderzochte elutriaten, monster T10 met 500 mg olie/kg grond, werd een negatief effect aangetoond in de Microtoxtest. Bij hogere concentraties olie werd echter géén effect gemeten. Dit laatste is in overeenstemming met eerdere onderzoeken op deze locatie (Bioclear *et al.*, 1998b), waarbij tot een concentratie van circa 2000 mg olie/kg geen negatieve effecten werden waargenomen in de Microtoxtest. Een directe verklaring voor het waargenomen effect in monster T10 is er niet: er zijn voor zover bekend geen andere verontreinigingen aanwezig en de pH is ook niet afwijkend van de overige monsters.

De waargenomen toxiciteit wordt wel deels bevestigd door de testen die met de extracten voor de oliekaracterisatie zijn uitgevoerd: in één van de twee monsters werd een negatief effect waargenomen, dat echter wel iets minder was dan in het elutriaat. In monster T7 werd in het extract wel een negatief effect waargenomen, terwijl in het elutriaat geen effect was. Dit sterkere effect in het extract werd al eerder gevonden voor de EPON-locatie. Opmerkelijk is echter dat zowel in het elutriaat als het extract in monster T8 bij een hogere olieconcentratie (1203 mg olie/kg grond) geen effect wordt gevonden. Aanbevolen wordt na te gaan of de effecten mogelijk verklaard kunnen worden op basis van bepaalde fracties in de olie, bijvoorbeeld de fractie met kortere ketens. Deze fractie kan per monster verschillen.

4.5.2. Slatest

In de slatest zijn vanaf 68 mg olie/kg negatieve effecten op de groei en vanaf 171 mg olie/kg ook negatieve effecten op de kieming van sla waargenomen. Bij monster T5 (68 mg olie/kg) en T7 (707 mg olie/kg) is het daarnaast mogelijk dat de aangetroffen zink- en/of loodverontreiniging de kieming en groei (mede) negatief beïnvloed heeft.

De olieconcentraties waarbij effect wordt gemeten zijn erg laag in vergelijking met eerdere onderzoeken op deze locatie, waarbij een EC₅₀-waarde van 2487 mg olie/kg voor kieming en 2711 mg olie/kg voor groei werd bepaald in de slatest (Bioclear *et al.*, 1998b). Ook vergeleken met de EPON-locatie uit dit onderzoek zijn de concentraties

waarbij effecten worden aangetoond laag te noemen. Op de EPON-locatie werden pas sterk negatieve effecten op de kieming aangetoond bij een concentratie van 440 mg olie /kg en sterk negatieve effecten op de groei vanaf 1800 mg olie/kg.

Een mogelijke verklaring is dat er bij de sanering van de Petroleumhaven toxische afbraakproducten zijn ontstaan, die niet tot uitdrukking komen in het oliegehalte. Dit zou betekenen dat de sanering die op deze locatie is uitgevoerd op basis van aangetroffen olieconcentraties mogelijk als afgerond kan worden beschouwd, maar dat nog steeds negatieve effecten aanwezig zijn. Op basis van deze negatieve effecten zou het wenselijk zijn de sanering nog enige tijd door te zetten.

4.5.3. Regenwormenreproductietest

In paragraaf 3.1 is reeds aangegeven dat in de regenwormenreproductie-test de geldigheidscriteria voor reproductie en variatie niet werden gehaald, door het nog niet geheel volwassen zijn van de wormen bij aanvang van de test. Tevens werd aangegeven dat de resultaten toch worden gepresenteerd omdat er onvoldoende grond over was om de test opnieuw uit te voeren. Ook is onderbouwd dat, afgezien van het nog niet geheel volwassen zijn de kwaliteit van de wormen en de testomstandigheden wel goed waren. Er wordt daarom verwacht dat bij herhaling de testresultaten niet wezenlijk zullen veranderen. Bij een hogere reproductie en een lagere variatie zijn zelfs eerder significante effecten aan te tonen.

Het feit dat de wormen bij aanvang van de test nog niet volledig volwassen waren, is terug te zien in de resultaten: de wormen zijn in verhouding met de testen van de andere locaties relatief hard gegroeid en hebben relatief weinig cocons en juvenielen geproduceerd. Toch wordt er, indien de lokale referentie buiten beschouwing wordt gelaten, wel een duidelijke dosis-effect relatie waargenomen. Vanaf ongeveer 500 mg olie/kg zijn, hoewel niet significant, negatieve effecten op de reproductie waarneembaar. Dit is in overeenstemming met de regenwormentest op de EPON-locatie en de overige op locatie Petroleumhaven uitgevoerde testen.

Een verklaring voor de nagenoeg nihil reproductie in monster T11 is niet gevonden. Er zijn geen andere verontreinigingen in het monster gemeten en de pH is niet afwijkend ten opzichte van de overige monsters.

4.5.4. Bait lamina test

In de bait lamina test werden vanaf 1203 mg olie/kg significant negatieve effecten waargenomen. Vanaf ongeveer 500 mg olie/kg is de consumptiesnelheid, hoewel niet significant, echter al gereduceerd. Dit

komt ongeveer overeen met het concentratie-niveau waarbij op de EPON-locatie effecten werden waargenomen in de bait lamina test.

Opvallend is dat in de lokale referentie de consumptiesnelheid normaal is, terwijl vrijwel geen regenwormen reproductie heeft plaatsgevonden in dit monster. Blijkbaar was de activiteit van de regenwormen in dit monster wel normaal (zie ook paragraaf 3.8).

4.6. Gasfabrieksterrein Oude Pekela

4.6.1. Microtoxtest

De Microtoxtest is op deze locatie wegens het mogelijk vrijkomen van het voor mensen zeer giftige HCN-gas niet uitgevoerd.

In de literatuur wordt voor de Microtoxtest voor HCN een $EC_{50,5min}$ van 8,5 mg/l gegeven (Bulich *et al.*, 1981; uit: Kaisers & Devillers, 1994). In de bodem bestaat vrij cyanide uit het CN^- -ion en uit HCN. In de sterker verontreinigde monsters (O.P.2, 1, 4 en 3) ligt het vrije cyanide gehalte op 62 – 320 mg CN-vrij/kg. Omdat HCN zeer goed oplosbaar is, is het op basis van deze theoretische vergelijking goed mogelijk dat HCN in deze monsters in het poriewater in concentraties boven de EC_{50} -waarde aanwezig is, en dus negatieve effecten zal kunnen veroorzaken in de Microtoxtest.

4.6.2. Slatest

Hoewel de effecten in de slatest toenemen met toenemende verontreiniging is de dosis-effect relatie niet zeer duidelijk. Er wordt zowel stimulatie als remming ten opzichte van de lokale referentie waargenomen.

Opvallend eenduidig is echter wel dat in de monsters die in de slatest worden gestimuleerd de reproductie van de regenwormen en de consumptiesnelheid in de bait lamina test ook hoger is, terwijl de monsters waarin sla slecht groeit, ook slecht scoren in de regenwormentest en bait lamina test. De testen bevestigen daarmee elkaars resultaten.

Bij de hogere concentraties cyanide, vanaf 1400 mg CN-totaal/kg, zijn de effecten op de plantengroei zeer duidelijk. Met de verontreinigingsgraad neemt echter de pH ook af, tot zeer lage pH's (2,2). Een negatief effect van de cyanide verontreiniging is daarom niet te onderscheiden van een pH-effect.

4.6.3. Regenwormenreproductietest

Er werden tot een concentratie van 6,2 mg CN-totaal geen effecten op de overleving of groei waargenomen. Voor de reproductie gelden dezelfde opmerkingen als bij de slatest zijn gemaakt: een duidelijke overeenstemming met de resultaten van de overige testen en er is geen onderscheid te maken tussen een negatief effect van de cyanide verontreiniging en een pH-effect.

4.6.4. Bait lamina test

Voor de bait lamina gelden dezelfde opmerkingen als bij de slatest en de regenwormentest zijn gemaakt: een duidelijke overeenstemming met de resultaten van de overige testen en er is geen onderscheid te maken tussen een negatief effect van de cyanide verontreiniging en een pH-effect.

4.7. Correlatie regenwormenreproductietest en bait lamina test

Helling *et al.* (1998) vonden dat verschillende bodemorganismen, waaronder de aan regenwormen verwante potwormen, een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de consumptiesnelheid in de bait lamina test. Zo is consumptiesnelheid in grond met potwormen ongeveer 4 tot 12 keer hoger dan consumptie door micro-organismen alleen, waarbij de consumptiesnelheid afhankelijk is van het bodemtype en het substraat in de strips. Deze bevinding wordt bevestigd door eigen onderzoek, waarbij met de monsters van locatie Oude Pekela ook een bait lamina test zonder regenwormen is uitgevoerd. De consumptiesnelheid was maximaal 3,1% in alle monsters.

Onduidelijk blijft of de bodemorganismen direct consumeren van de bait lamina strips of dat ook indirecte effecten meespelen, dat wil zeggen dat de bodemmicro-organismen actiever het substraat afbreken door begrazing door bodemorganismen. Gezien het aanzienlijke verschil tussen gronden met en zonder bodemorganismen lijkt directe consumptie in ieder geval plaats te vinden.

De bijdrage van regenwormen aan de consumptie verklaard tevens waarom de grootste activiteit boven in de potten wordt gevonden. De regenwormen worden van boven af gevoerd en zullen dus een groot deel van de tijd boven in de potten zijn. Als bacteriën bijdragen aan de consumptie wordt een meer evenwichtige verdeling van de consumptie over de diepte verwacht.

Ook de gevonden hoge correlatiecoëfficiënten tussen de regenwormenreproductie en de bait lamina test worden bevestigd door het onderzoek van Helling *et al.* (1998). Zij bepaalden de correlatie tussen het aantal potwormen (*Enchytraeus minutus* en *Enchytraeus*

lacteus in de ratio 9:1) aan het einde van de testperiode en de consumptiesnelheid in de bait lamina test. Ze vonden een correlatiecoëfficiënt (R^2) van 0,87. In vergelijkbare proeven met de springstaartensoorten *Folsomia candida* en *Onychiurus fimatus* was de correlatiecoëfficiënt respectievelijk 0,66 en 0,65. De door ons gevonden correlatiecoëfficiënten voor regenwormen (*Eisenia andrei*) liggen in dezelfde orde van grootte.

De correlatie met het aantal cocons per worm blijkt het sterkst. Blijkbaar hangt het aantal geproduceerde cocons sterk samen met de (eet)activiteit van de ouderdieren. In de regenwormentesten is gevonden dat het aantal juvenielen per cocon pas bij zeer hoge concentraties wordt beïnvloed. Dit verklaart waarom er ook een duidelijk verband is tussen het aantal juvenielen per worm en de resultaten van de bait lamina testen, terwijl de bait lamina test al is afgebroken op het moment dat de juvenielen uit komen.

De relatief lage correlatiecoëfficiënten voor locatie Petroleumhaven zijn te verklaren uit het feit dat de gaatjes voor deze locatie zeer snel werden leeggegeten. De maximale consumptie is dan al snel bereikt, terwijl de regenwormen gewoon zullen doorgaan met reproduceren. Dit resulteert in een lage correlatie.

Door de bait lamina test te combineren met de regenwormentest worden dus tevens indirecte effecten op de consumptiesnelheid meegenomen. Deze kunnen voor het ecosysteem zeer relevant zijn. Meer inzicht in de mogelijke invloed van regenwormen op het testresultaat van de bait lamina test (met andere woorden tussen indirecte en directe effecten) is daarom gewenst. Dit kan bijvoorbeeld door een vergelijking te maken tussen de consumptiesnelheid in de bait lamina test in steriele en niet steriele grond, met en zonder regenwormen.

5. Conclusie

De gebruikte testbatterij heeft bewezen in de meeste gevallen eenduidige resultaten op te leveren en gevoelig genoeg te zijn om effecten te kunnen meten bij concentraties onder de interventiewaarde. De resultaten van alle testen vertonen over het algemeen een redelijk tot goede correlatie met verontreiniging.

In vrijwel alle gevallen waarin bioassays worden gebruikt voor het testen van verontreinigde veldbodems wordt volstaan met het constateren van een negatief effect ten opzichte van een (locale) referentie, zonder daarbij een waardeoordeel aan de mate van effect te hangen. Omdat gemeend is dat er vanuit probleembezitters behoefte is aan een waardeoordeel over de mate van effect die wordt waargenomen, zijn classificatiecriteria voorgesteld. Hierbij wordt, zoals gebruikelijk is in de water(bodem)wereld, onderscheid gemaakt in géén, matig en ernstig negatief effect. Overeenstemming over de voorgestelde classificatiecriteria vormt een belangrijke voorwaarde voor de bruikbaarheid.

Daarnaast is het voor het geven van een waardeoordeel van groot belang dat een geschikte, dat wil zeggen een qua bodemstructuur en pH goed vergelijkbare locale referentie wordt gevonden, teneinde foute conclusies te voorkomen. Dit is in de praktijk niet altijd eenvoudig gebleken. Voor sommige locaties is het waardeoordeel daarom gebaseerd op expert judgement.

Op alle zes onderzochte locaties zijn negatieve effecten waargenomen. Volgens de voorgestelde classificatiecriteria worden deze op de Bornia locatie bij een concentratie van 21 mg Pb/kgds als matig negatief effect en bij een concentratie van 220 mg Pb/kgds of hoger als ernstig negatief effect geclassificeerd. Bij de EPON-locatie worden bij 79 en 160 mg olie/kgds matig negatieve effecten waargenomen en bij concentraties van 440 mg olie/kgds of hoger ernstig negatieve effecten. Bij de Petroleumhaven worden reeds matig negatieve effecten waargenomen bij een olieconcentratie van 68 mg olie/kgds. Vanaf 171 mg olie/kgds zijn ernstig negatieve effecten waargenomen.

De resultaten van locatie NS Kerkrade zijn niet beoordeeld volgens de voorgestelde classificatiecriteria (op basis van het effect ten opzichte van de lokale referentie) maar op basis van expert judgement, omdat de geselecteerde lokale referentie minder geschikt bleek (andere pH en structuur). Negatieve effecten werden alleen waargenomen op de groei van sla, in alle monsters behalve T8,v6 (13 mg PAK/kg; 490 mg Zn/kg). In de regenwormenreproductietest werd alleen in monster T8,v5 (27 mg PAK/kg, 1100 mg Pb/kg en 2100 mg Zn/kg) een negatief effect op de reproductie waargenomen, dat als ernstig negatief effect wordt geclassificeerd. Op basis van een vergelijking met de overige monsters is het waarschijnlijk dat dit negatieve effect voornamelijk door lood en/of zink veroorzaakt wordt.

Ook de resultaten van de locatie NAM Schoonebeek zijn niet geclassificeerd volgens de voorgestelde classificatiecriteria. Met de Microtox test werden in alle monsters (ook de lokale referentie) negatieve effecten waargenomen. De kieming en groei van sla was vanwege de lage pH zo laag dat het niet zinvol wordt geacht de resultaten ten opzichte van de lokale referentie uit te drukken. Desondanks is er een trend waarneembaar naar nog slechtere kieming en groei bij hogere olieconcentraties. De reproductie van regenwormen en de consumptiesnelheid in de bait lamina test zijn beiden erg laag en worden zeer waarschijnlijk door de lage pH veroorzaakt. Er is geen correlatie met de verontreinigingsgraad geconstateerd.

Voor locatie Oude Pekela zijn in zowel de slatest, de regenwormenreproductietest als de de bait lamina test vanaf 1400 mg CN-totaal/kg ernstig negatieve effecten waargenomen. Omdat bij toenemende verontreiniging met cyanide de pH ook sterk afneemt, zijn deze negatieve effecten echter niet te onderscheiden van een pH-effect.

De prestaties van de lokale referentie in de slatest, regenwormentest en bait lamina test zijn over het algemeen lager dan die in kunstgrond. Alleen de prestaties van de lokale referentie van de EPON-locatie waren vergelijkbaar met die van kunstgrond. Een belangrijke factor is met name de vaak lagere pH-KCl in de lokale referenties. Deze resultaten onderstrepen daarmee het belang van het meenemen van een lokale referentie, teneinde onjuiste conclusies te voorkomen.

Het onderzoek heeft waardevolle indicaties opgeleverd over de randvoorwaarden die de verschillende bioassays stellen aan de pH-KCl van de bodem.

De concentraties lood in het elutriaat van locatie Bornia zijn in overeenstemming met de verwachting op basis van het organisch stofgehalte en lutumgehalte van de grond. De methode van elutriaatbereiding met 0,001 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ lijkt daarmee een goede indicatie voor de beschikbaarheid van lood te geven. Dit wordt bevestigd doordat de resultaten van de Microtox test, uitgevoerd met elutriaat, voor beide locaties correleren met die van de regenwormentest.

De effecten in de extracten voor oliekaracterisatie van de EPON-locatie zijn in alle gevallen hoger dan de effecten in het bereide elutriaat, maar volgen beiden een dosis-effect relatie. Voor de Petroleumhaven is dit slechts voor één van de drie geteste monsters het geval. Mogelijk wordt er bij de extractbereiding voor oliekaracterisatie meer olie geëxtraheerd

dan bij de elutriaatbereiding met 0,001M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, of wordt er meer van de toxische fractie geëxtraheerd.

De resultaten van de bait lamina test zijn in de huidige proefopzet duidelijk gecorreleerd met de resultaten van de regenwormentest. In de bait lamina test wordt dus met name de activiteit van de regenwormen gemeten en niet die van de micro-organismen. Onduidelijk blijft in hoeverre micro-organismen indirect, doordat ze gestimuleerd worden door regenwormen, bijdrage aan de consumptiesnelheid.

6. Literatuur

- Bioclear, AquaSense, KEMA, Witteveen en 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 - Fase 1, deelresultaat 1: inventarisatie en selectie van bioassays en extractiemethoden voor grond verontreinigd met minerale olie. Rapport project 96-1-13, CUR/NOBIS, Gouda.
- Bioclear, AquaSense, KEMA, Witteveen en Bos, Vrije Universiteit Amsterdam, Stichting Bodemsanering Nederlandse Spoorwegen en Gemeentelijk Havenbedrijf Amsterdam (1998b). Effectiviteit van bioassays bij het monitoren van het milieurendement van in situ biorestauratie. Fase 1, deelresultaat 2: resultaten van de veldscreening met bioassays, chemische en biologische parameters. NOBIS project 96-1-13.
- Brils, J.M. & P.J. den Besten (1995). Bioassays: het orakel van de ecotoxicologie? In opdracht van: Programma Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems (POSW), Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA). AquaSense rapport 94.0681, Amsterdam. 37p.
- Bulich, A.A., M.W. Greene & D.L. Isenberg (1981). In: D.R. Branson & K.L. Dickson (eds.). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference. ASTM STP 737. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. P338-347.
- Edwards, C.A. & J.R. Lofty (1977). Biology of earthworms. Chapman and Hall, London. 333p.
- Gestel, C.A.M. van, E.M. Dirven-van Breemen & J.W. Kamerman (1992a). Beoordeling van gereinigde grond. IV. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegronden. RIVM-rapportnr. 216402004. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (RIVM), Bilthoven. p79.
- Gestel, C.A.M. van, E.M. Dirven-van Breemen & R. Baerselman (1992b). Influence of environmental conditions on the growth and reproduction of the earthworm *Eisena andrei* in an artificial soil substrate. Pedobiologia 36: 109 - 120.

- Isenberg, D.L. (1993). The Microtox toxicity test, a developer's commentary. In: Richardson, M. (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, FRG. p3-15.
- ISO 11268-2 (1998). Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisena fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction.
- ISO 11269-2 (1995). Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effect of chemicals on the emergence and growth of higher plants.
- ISO 11348 - 3 (1998). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- Kaiser, K.L.E. & J. Devillers (1994). Ecotoxicity of chemicals to *Photobacterium phosphoreum*. Handbooks of ecotoxicological data, Volume 2. Gordon and Breach Science Publishers.
- Kammerman, J.W. and van Gestel, C.A.M. (1991) Beoordeling van gereinigde grond III. De ontwikkeling van bioassays. Rapportnr. 216402003, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM, Bilthoven.
- Norusis, M.J. (1992). SPSS® for Windows™. Base System User's Guide, Release 5.0. SPSS Inc. Chicago.
- NVN 6516 (1993). Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Photobacterium phosphoreum*. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, augustus 1993.
- RIZA (1996). RIZA Handboek 'Toxicologie en lozingsvergunningen' (concept). J. Botterweg (red.). Notanr. 96.045. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling RIZA, Lelystad.
- STOWA/RIZA (1997). Ecotoxicologische beoordeling van verontreinigde waterbodems. STOWA-rapportnr. 97-42. RIZA Nota nr. 97.085. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer STOWA, Utrecht.

Bijlagen

Bijlage 1

Voedingsoplossing voor de kiemings- en groeitest met sla

Voedingsoplossing naar Kamerman & van Gestel (1991).

| Stof | Concentratie g/l |
|--|------------------|
| <i>Stockoplossing A</i> | |
| Ca(NO ₃) ₂ *4 H ₂ O | 6,4 |
| KNO ₃ | 7,9 |
| NH ₄ NO ₃ | 2,00 |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,056 |
| (Na ₂)EDTA=C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2 H ₂ O | 0,074 |
| <i>Stockoplossing B</i> | |
| KNO ₃ | 30,22 |
| KH ₂ PO ₄ | 17,00 |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 3,90 |
| MnSO ₄ *4 H ₂ O | 0,22 |
| ZnSO ₄ *7 H ₂ O | 0,145 |
| H ₃ BO ₃ | 0,196 |
| CuSO ₄ *5 H ₂ O | 0,019 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4 H ₂ O | 8,76 |
| NaNO ₃ | 25,41 |

Stockoplossing A 275x verdunnen;
Stockoplossing B 275x verdunnen;
A:B = 1:1

Bijlage 2

Geldigheidscriteria bioassays en geconstateerde waarden

Geldigheidscriteria voor prestaties van de bioassays in het verdunningsmedium (Microtoxtest) of kunstgrond (overige testen) en tijdens de test geconstateerde waarden.

| Parameters | criterium | geconstateerde waarden |
|---|------------------|------------------------|
| Microtox (NVN 6516, 1993) | | |
| afname luminescentie in de blanco's (Rt) | $0,6 < Rt < 1,3$ | 0,7 – 1,3 |
| % afwijking tussen duplowaarden t.b.v. bepaling EC ₂₀ -waarde | ≤ 15 | ≤ 15 ¹ |
| Sla (ISO 11269-2, 1995) | | |
| minimaal aantal gezonde plantjes per pot na 14 dagen | ≥ 5 | 0 – 10 |
| kiemingspercentage (eigen criterium AquaSense) | ≥ 80 | 5 – 90 |
| Regenwormen (ISO 11268-2, 1998) | | |
| percentage overleving (%) | ≥ 90 | 95,8 - 100,0 |
| gemiddeld aantal juvenielen per pot | ≥ 30 | 15 - 110 |
| 'Coefficient of Variation' reproductie (%) | ≤ 30 | 8 - 38 |
| Bait lamina test (eigen criterium AquaSense) | | |
| totaal percentage geheel of gedeeltelijk doorboorde gaatjes na 28 dagen (eigen criterium AquaSense) | ≥ 80 | 82,0- 98,4 |

¹: Waarde wordt berekend en getoetst aan het criterium door het dataverwerkingsprogramma, maar wordt hierbij niet als getalswaarde weergegeven.

Bijlage 3
Correlatie tussen de resultaten van de
regenwormenreproductietest en de bait lamina test

| totale dataset | | cocons per worm | | juvenielen per worm | | juvenielen per worm | | cocons per worm | | excl. petroleumhaven | |
|---------------------|-----------|-----------------|----------------|---------------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|--|
| | a | b | R ² | a | b | R ² | | gemiddelde R ² | | | |
| 7d | 0.032 X + | 0.500 | 0.29 | 0.065 X + | 0.208 | 0.29 | 7d | 0.70 | | 0.75 | |
| 14d | 0.026 X + | 0.397 | 0.26 | 0.050 X + | 0.347 | 0.20 | 14d | 0.76 | | 0.82 | |
| 28d | 0.019 X + | 0.524 | 0.16 | 0.039 X + | 0.254 | 0.18 | 28d | 0.73 | | 0.82 | |
| Bornia | | | | | | | | | | | |
| cocons per worm | | a | b | juvenielen per worm | | R ² | juvenielen per worm | | excl. petroleumhaven | | |
| 7d | 0.083 X - | 0.522 | 0.73 | 0.147 X - | 1.050 | 0.65 | 7d | 0.69 | | 0.71 | |
| 14d | 0.088 X - | 0.397 | 0.86 | 0.158 X - | 2.996 | 0.78 | 14d | 0.72 | | 0.76 | |
| 28d | 0.079 X - | 0.524 | 0.90 | 0.142 X - | 3.430 | 0.83 | 28d | 0.66 | | 0.76 | |
| EPON | | | | | | | | | | | |
| cocons per worm | | a | b | juvenielen per worm | | R ² | juvenielen per worm | | excl. petroleumhaven | | |
| 7d | 0.051 X + | 0.825 | 0.82 | 0.115 X + | 1.574 | 0.77 | 7d | 0.69 | | 0.71 | |
| 14d | 0.044 X + | 0.722 | 0.82 | 0.098 X + | 1.387 | 0.76 | 14d | 0.72 | | 0.76 | |
| 28d | 0.042 X + | 0.453 | 0.76 | 0.092 X + | 0.825 | 0.69 | 28d | 0.66 | | 0.76 | |
| NAM | | | | | | | | | | | |
| cocons per worm | | a | b | juvenielen per worm | | R ² | juvenielen per worm | | excl. petroleumhaven | | |
| 7d | 0.032 X + | 0.664 | 0.70 | 0.061 X + | 0.059 | 0.72 | 7d | 0.69 | | 0.71 | |
| 14d | 0.025 X + | 0.499 | 0.77 | 0.045 X - | 0.190 | 0.74 | 14d | 0.72 | | 0.76 | |
| 28d | 0.027 X + | 0.264 | 0.81 | 0.048 X - | 0.590 | 0.75 | 28d | 0.66 | | 0.76 | |
| Petroleumhaven | | | | | | | | | | | |
| cocons per worm | | a | b | juvenielen per worm | | R ² | juvenielen per worm | | excl. petroleumhaven | | |
| 7d | 0.022 X - | 0.414 | 0.53 | 0.027 X - | 0.683 | 0.61 | 7d | 0.69 | | 0.71 | |
| 14d | 0.020 X - | 0.641 | 0.57 | 0.023 X - | 0.855 | 0.58 | 14d | 0.72 | | 0.76 | |
| 28d | 0.024 X - | 1.393 | 0.43 | 0.025 X - | 1.552 | 0.37 | 28d | 0.66 | | 0.76 | |
| Oude Pekela | | | | | | | | | | | |
| juvenielen per worm | | | | juvenielen per worm | | 0.87 | juvenielen per worm | | 0.87 | | |
| 7d | | | | 0.0739 X - | 1.014 | 0.87 | 7d | | | 0.87 | |
| 28d | | | | 0.0525 X - | 1.008 | 0.79 | 28d | | | 0.79 | |

