

**Genereren en beoordelen van referentiegegevens  
voor terrestrische ecotesten**

**B. Muijs  
W. Hendriks  
C.A.M. van Gestel  
J. Bloem  
W.C. Ma**

**RAPPORTEN PROGRAMMA GEÏNTEGREERD BODEMONDERZOEK**

**DEEL 36**

**Genereren en beoordelen van referentiegegevens  
voor terrestrische ecotesten**

**B. Muijs  
W. Hendriks  
C.A.M. van Gestel  
J. Bloem  
W.C. Ma**

**RAPPORTEN PROGRAMMA GEÏNTEGREERD BODEMONDERZOEK**

**DEEL 36**

Gegevens: Genereren en beoordelen van referentiegegevens voor terrestrische ecotesten - B. Muijs, W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, J. Bloem en W.C. Ma - Wageningen: Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek; deel 36) - 46 p., 16 bijl. – ISBN 90-73270-51-0.

Trefwoorden: bodemverontreiniging, ecotoxicologie, risicobeoordeling.

#### Samenvatting:

Het rapport beschrijft de uitvoering en resultaten van verschillende toetsen met weinig of niet verontreinigde gronden voor het genereren van referentiegegevens voor terrestrische ecotesten. Het onderzoek bestond uit een acute bioassay (Microtox-test), chronische bioassays met een springstaart (*Folsomia candida*), met sla (*Lactuca sativa*) en met regenwormen (*Lumbricus rubellus*), microbiologische analyses (biomassa, groeisnelheid en genetische diversiteit van bacteriën), de bepaling van de activiteit van de bodemmicro- en mesofauna (Bait lamina-test) en een inventarisatie van de aanwezige bodemmeso- en macrofauna (nematoden en regenwormen). Voor het onderzoek werden acht locaties in Nederland geselecteerd (z.g. “Edelmanlocaties”) op zand-, klei- en veengronden, waarvan er vijf beperkt zijn onderzocht en drie in meer detail. Het rapport besluit met een bespreking van de bruikbaarheid van referentiegegevens bij de uitvoering van ecotesten en met aanbevelingen voor verder onderzoek.

#### Projectleiding en uitvoering:

Drs. B. Muijs en ir. W. Hendriks - Witteveen+Bos, Postbus 233, 7400 AE Deventer; tel.:0570-697911; fax: 0570-697344; e-mail: b.muijs@witbo.nl resp. w.hendriks@witbo.nl;

Dr. C.A.M.van Gestel - Vrije Universiteit, Institute for Ecological Studies, De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam; tel.: 020-4447070; fax: 020-4447123; e-mail: gestel@bio.vu.nl.;

Dr. J. Bloem en dr.ir. W.C. Ma - Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Postbus 47, 6700 AA Wageningen; tel.: 0317-477770; e-mail: j.bloem@alterra.wag-ur.nl, resp. w.c.ma@alterra.wag-ur.nl

#### Dankwoord:

De leiding van het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek dankt prof.dr. P.C. de Rooter (UU), ir. R. van den Berg (RIVM) en dr. C. van de Guchte (RIZA) voor de begeleiding van het project en hun inbreng in deze studie via hun reacties op het onderzoek zelf en de rapportage.

Het rapport is verkrijgbaar bij de Stichting Kennisontwikkeling en Kennisoverdracht Bodem (SKB) in Gouda (Postbus 420, NL-2800 AK Gouda; telefoon: 0182-540690; fax: 0182-540691) à f 40,-.

© 2000. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (Postbus 37, 6700 AA Wageningen).

omslag:Ernst van Cleef

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

## **Voorwoord**

In opdracht van het Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek (PGBO) heeft een consortium van Alterra, Vrije Universiteit Amsterdam en Witteveen+Bos het project “genereren en beoordelen van referentiegegevens voor terrestrische ecotesten” uitgevoerd. Het onderzoek heeft als doelstelling de relaties tussen bodemeigenschappen en de resultaten van ecotesten inzichtelijk te maken om zodoende een bijdrage te kunnen leveren aan de ontwikkeling van een referentiekader en selectiecriteria voor het gebruik van ecotesten bij de beoordeling van actuele ecologische risico’s van bodemverontreiniging.

Het onderzoek vloeit voort uit eerdere samenwerking van het bovengenoemde consortium in PGBO-verband om de toepassing van ecotesten bij de beoordeling van actuele ecologische risico’s van bodemverontreiniging te stimuleren. Genoemd kunnen worden “Bodemkwaliteitsparameters, stimulering gebruik ecotesten” (Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 14) en “Haalbaarheidsonderzoek databank ecotesten als basis voor ecologische risicobeoordeling” (Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 27).

# Inhoudsopgave

Samenvatting	i
Summary	iii
1. Inleiding	1
1.1 Algemeen	1
1.2 Referentiegoed	2
1.3 Doelstellingen en oplossingsrichtingen	3
1.4 Projectaanpak	4
2. Materiaal en methoden	5
2.1 Locaties	5
2.2 Meetprogramma	5
2.3 Bemonstering	7
2.4 Analyses	7
2.4.1 Analyse fysisch-chemische bodemparameters	7
2.4.2 Chemische analyses	8
2.5 Ecotesten	9
2.5.1 Acute bioassays	9
2.5.2 Chronische bioassays	9
2.5.3 Microbiologische analyses en veldinventarisaties	11
2.6 Statistische bewerkingen	13
3. Resultaten	14
3.1 Veldwerk	14
3.2 Fysisch-chemische analyses	14
3.3 Chemische analyses	15
3.3.1 Zware metalen, spoorelementen en organische verontreinigingen	15
3.3.2 Ruimtelijke verdeling binnen de locatie	17
3.4 Ecotesten	18
3.4.1 Acute bioassays	18
3.4.2 Chronische bioassays	18
3.4.3 Microbiologische analyses en veldinventarisaties	21

4.	Discussie	28
4.1	Achtergrondgehalten	28
4.1.1	Geschiktheid als referentielocaties	28
4.1.2	Zware metalen	28
4.1.3	Organische verbindingen	29
4.1.4	Relaties tussen zware metalen en bodemeigenschappen	30
4.1.5	Ruimtelijke verdeling van chemische stoffen over de locatie	30
4.2	Bodemsamenstelling in relatie tot resultaten van ecotesten	31
4.2.1	Acute bioassays	31
4.2.2	Chronische bioassays	31
4.2.3	Microbiologische analyses en veldinventarisaties	33
4.3	Meerwaarde van referentiegegevens	36
5.	Conclusies en aanbevelingen	40
5.1	Conclusies	40
5.2	Aanbevelingen	42
6.	Referenties	43

## Figuren

1.	Beoordelen van bodemverontreiniging met ecotesten	2
2.	Gemiddeld eindgewicht van <i>Folsomia candida</i> na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van een controlegrond, Duin en Kruidberg, Eendenkooi 't Broek en de Blauwe Hel	19
3.	Gemiddelde reproductie van <i>Folsomia candida</i> na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van een controlegrond, Duin en Kruidberg, Eendenkooi 't Broek en de Blauwe Hel	19
4.	Gemiddeld drooggewicht van de slapplanten na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van Eendenkooi 't Broek, Duin en Kruidberg en de Blauwe Hel	20
5.	Gemiddelde reproductie van <i>Lumbricus rubellus</i> na vier weken blootstelling aan gronden van een controlegrond, de Blauwe Hel, Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg	21
6.	Gemiddelde cumulatieve substraatconsumptie in de Bait lamina-test na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van de onderzoekslocaties	22
7.	Gemiddeld aantal regenwormen per genomen monster van 0,25 m <sup>2</sup> op een drietal Edelmanlocaties.	23
8.	DNA-profielen van de bacteriën op de onderzochte locaties	25
9.	Schema voor gebruik referentiegegevens bij ecotesten	39

## Tabellen

1.	Gegevens van de bemonsterde locaties	5
2.	Meetprogramma	6
3.	Fysisch chemische parameters van de onderzoekslocaties, vergeleken met Edeleman	14
4.	Zware metalen in de bodem van de onderzoekslocaties in mg kg <sup>-1</sup> DW	16
5.	Spoorelementen en metalen in de bodem van de onderzoekslocaties in mg kg <sup>-1</sup> DW	16
6.	PAK, EOX en minerale olie in de bodems van de onderzochte locaties in mg kg <sup>-1</sup> DW	17
7.	Variatie van verontreinigingen binnen de onderzoekslocaties	17
8.	Biomassa en aantal regenwormen per m <sup>2</sup> , percentage adulte regenwormen en aantal aangetroffen regenwormsoorten op de onderzochte locaties	23
9.	Bacteriële biomassa, DNA-synthese, eiwitsynthese en genetische diversiteit op de onderzochte locaties	24
10.	Totale aantal nematoden en het aantal in verschillende functionele groepen op de onderzochte locaties per 100 g droge grond.	25
11.	Gemiddelde taxonomische verdeling per 100 g veldvochtige grond	26
12.	Bruikbaarheid van lokale referenties en een referentiedataset	37

## Bijlagen

I	Achtergrondinformatie over ecotesten	47
II	Ligging van de onderzochte Edelmanlocaties	55
III	Samenstelling voedingsoplossing voor de bioassay met sla	57
IV	Situatietekeningen	59
V	Beschrijving veldlocaties	69
VI	Analysresultaten grondmonsters	70
VII	Resultaten Microtox-test	85
VIII	Resultaten bioassay met de springstaart <i>Folsomia candida</i>	87
IX	Resultaten bioassay met sla ( <i>Lactuca sativa</i> )	89
X	Resultaten bioassay met de regenworm <i>Lumbricus rubellus</i>	91
XI	Resultaten Bait lamina-test	93
XII	Veldinventarisaties regenwormen	95
XIII	Resultaten onderzoek biomassa en groeisnelheid bacteriën	97
XIV	Resultaten nematodentellingen	101
XV	Gehalten aan zware metalen in dit en voorgaande onderzoeken	103
XVI	Verklarende woordenlijst	109

## Samenvatting

Bij de toepassing van ecotesten voor de beoordeling van actuele ecologische risico's van bodemverontreiniging is het voor een goede interpretatie noodzakelijk de resultaten te vergelijken met schone referentiegrond van vergelijkbare bodemsamenstelling. In de praktijk blijkt de keuze van een goede referentiegrond problematisch te zijn; deze is vaak niet op de locatie aanwezig.

Doelstelling van het uitgevoerde project is het genereren van oplossingen voor het genoemde probleem en de ontwikkeling van een referentiekader, zodat ecotesten kunnen worden toegepast voor afleiding van actuele ecologische risico's. Dit is gedaan door ecotesten uit te voeren met een aantal onbelaste gronden. Hiermee wordt het inzicht in de relatie tussen bodemeigenschappen en de resultaten van ecotesten vergroot en wordt een begin gemaakt met het genereren van een dataset van referentiegegevens voor ecotesten. Tevens is een bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van selectiecriteria voor ecotesten en zijn de resultaten van voorgaande onderzoeken op enkele Edelmanlocaties geactualiseerd.

Om de doelstellingen te realiseren zijn bodemonsters genomen op een achttal zogenaamde Edelmanlocaties; veelal natuurgebieden waarvan de bodemkwaliteit ten grondslag ligt aan de huidige streefwaarden voor bodemverontreiniging. Drie van deze locaties zijn uitgebreid onderzocht op onder meer de ruimtelijke verdeling van verontreinigingen, de microbiologische activiteit en de samenstelling van de regenwormen- en nematodenpopulaties en door middel van een groot aantal chronische bioassays. Deze drie locaties zijn zodanig geselecteerd, dat de meest voorkomende grondsoorten zijn vertegenwoordigd (zand, klei en veen). Op de overige locaties zijn de gronden beoordeeld met een beperkt pakket aan chemische en biologische analyses.

Op een aantal locaties zijn de gehalten aan zware metalen weliswaar toegenomen in vergelijking met voorgaand onderzoek, maar overigens is gebleken dat alle locaties nog voldoen aan de eisen die gesteld worden aan referentiegronden. Op een enkele uitzondering na worden er geen streefwaarden overschreden. Ten gevolge van de venige samenstelling van de grond van de Blauwe Hel zijn de verontreinigingen minder homogeen over de locatie verdeeld dan op de overige uitgebreid bemonsterde locaties.

Uit het onderzoek is gebleken dat bodemeigenschappen de resultaten van ecotesten beïnvloeden. De mate van beïnvloeding is afhankelijk van de aard van de test. Reproductie van regenwormen en springstaarten en de activiteit van micro-organismen zijn het hoogst op de veengrond van de Blauwe Hel, terwijl het aantal nematoden en de groei van sla hoger is op de zware kleigrond van Eendenkooi 't Broek. De enige uitzondering is de Microtox-test, die op geen van de locaties een effect laat zien. De resultaten onderstrepen het belang van een goede referentie wanneer ecotesten worden ingezet bij de beoordeling van actuele ecologische risico's van bodemverontreiniging. Eén standaardreferentie kan dus niet volstaan als referentiegrond voor alle in Nederland voorkomende bodemtypen.



Het onderzoek is gericht om voor veel voorkomende bodemtypen (zand, klei en veen) een uitgebreide dataset aan referentiegegevens te verzamelen. Uit de resultaten is gebleken dat deze indeling te grof is, tussen verschillende zand-, klei- en veengronden zijn verschillen waarneembaar in de resultaten van ecotesten. Daarom dient de categorisatie van gronden te worden verfijnd.

Een dataset met referentiegegevens maakt het gebruik van referentiegronden niet overbodig. Naast bodemeigenschappen hebben ook proeftechnische factoren en condities van testorganismen invloed op de resultaten van ecotesten. De dataset zal wel bijdragen aan het verhogen van de betrouwbaarheid van ecotesten voor de afleiding van actuele ecologische risico's. Door de resultaten van de referentiegrond te vergelijken met gegevens in de dataset voor vergelijkbare bodems, kan aannemelijk worden gemaakt dat er in de referentiegrond geen factoren aanwezig zijn die de resultaten van de referentie negatief beïnvloeden. Effecten in de verontreinigde monsters zijn dan veroorzaakt door verontreinigingen en kunnen worden uitgedrukt als effect ten opzichte van de lokale referentie. Hierdoor is het mogelijk om op een betrouwbare wijze de resultaten te toetsen aan het (nog te ontwikkelen) toetsingskader en kunnen actuele ecologische risico's worden bepaald.

Met de resultaten van het onderzoek is eveneens een bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van selectiecriteria, zodat op basis van bodemeigenschappen een gemotiveerde keuze kan worden gemaakt voor geschikte ecotesten. Uit het onderzoek is gebleken dat niet alle ecotesten geschikt zijn voor iedere bodem. De verkregen dataset is echter nog te beperkt om selectiecriteria te kunnen opstellen.

Een dataset met referentiegegevens draagt zowel bij aan het vergroten van de betrouwbaarheid bij de afleiding van actuele ecologische risico's als aan de ontwikkeling van een selectiekader. Daarom is het zinvol deze dataset uit te breiden door op meer onbelaste gronden ecotesten uit te voeren. Tevens is het zinvol om eveneens ecotesten uit te voeren op gronden met een andere vorm van bodemgebruik zoals landbouw. Vanwege de vele relaties van ecotesten met bodemeigenschappen blijft de interpretatie van de resultaten kritisch en dient daarom te gebeuren door specialisten.

## Summary

For the ecological risk assessment of contaminated soils, ecotests may have an additive value compared to chemical analysis. In spite of this, ecotests are still only rarely applied in practice. One of the reasons for this is the lack of experience with ecotests. In addition, a framework is lacking that should give guidance for the use of ecotests in particular situations and assist the interpretation of ecotest results and translation into policy measures.

Besides such a framework, it is essential to have available proper references for ecotests. For various reasons, results of ecotests on polluted or remediated soils must always be checked with similar tests on non-polluted reference soils, having the same soil characteristics except for the contaminant levels. In practice, it appears however, rather difficult to find such suitable reference soils.

Another problem is that not all ecotests are suitable for every situation. Some ecotests may not be applicable to certain soil types or are not particularly sensitive for certain types of soil pollutants. It is therefore necessary to develop criteria for the selection of proper ecotests applicable for certain combinations of soil type and pollution.

To solve these problems concerning reference soils and test selection criteria, insight into the relationship between responses of ecotests and soil characteristics is essential. This project aims at increasing this insight. For that purpose, eight different soils were sampled from areas that are supposed to be not disturbed or polluted by human activities. These soil samples were subjected to chemical analysis and a number of selected terrestrial bioassays. The sites chosen are so-called “Edelman-gronden”, which already at the beginning of the eighties have been sampled and analysed for the presence of metals and organic micropollutants. The results of that analysis formed the basis for the target values defined and currently being used within the Netherlands’ Soil Protection Act.

Of the eight sites sampled, three have been studied more intensively by determining spatial distribution of pollutants, microbial activity, density and composition of earthworm and nematode communities and by applying a number of chronic bioassays. These three sites were selected to represent the most common soil types: sand, clay and peat.

From the chemical analysis it appeared that all sites still conform the criteria set for reference soils. Except for some cases, target values for metals, organohalogens, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and mineral oil are not exceeded. On the site Blauwe Hel, pollutants are less homogeneously distributed than on the other sites; which may be attributed to the spatial variation in organic matter levels in this peaty soil. A number of sites showed increased levels of metals compared to the sampling in the past, in most cases this was due to human activities such as increased industrial activity or traffic in the neighbourhood.

Results of the ecotests performed were dependent on soil characteristics. Microbial activity was high in the peaty soil but low in the sandy soil. Responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* and the collembolan *Folsomia candida* in the chronic bioassays showed similar trends. Growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and the number of nematodes were, however, highest on the clayey soil. Substrate consumption measured using the bait-lamina test showed large differences between the different soils tested, which could mainly be due to differences in soil pH. The Microtox test showed no effects at all and seemed not to be affected by soil type.

Results of this study show that it will not be possible to use only one reference soil to be representative of all soil types occurring in the Netherlands. The use of a local reference should therefore be preferred. Neither was it possible to use the generated reference data as the only reference for ecotests. However, a dataset may improve the reliability of the interpretation of the results and the determination of the actual ecological risk of soil pollution. Results of ecotests applied to such a local reference could be compared with available data for other reference soils. In case of large deviations from the 'normal' (range of) responses measured on similar soil types, it may be concluded that the local reference is polluted by contaminants not included in the chemical analysis or that it may contain soil compounds interfering with the ecotest result. In that case, the reference soil is not suitable for comparison with a guidance framework and a reliable derivation of actual ecological risks.

As an alternative for a local reference, reference soils collected from outside the contaminated site may be used. The selection of these soils is based on available reference data, where soil characteristics are used as input variables. However, the reliability of ecological risk derived in this way will decrease. If there is no local or external reference soil available, data available for ecotest responses on reference soils could be used. In any case, quality control should be guaranteed, e.g. by applying the ecotest also to a reference soil for which the response (or range of responses) is well known. Due to many interactions of ecotests with soil characteristics, interpretation of the results is critical and must be done by specialists.

Results of this study also demonstrate that it is essential to develop criteria for the selection of proper ecotests. This study has contributed to generate these criteria for soil characteristics. However the generated data is insufficient for all soil types. With the results of his study it is shown that ecotest responses on different sandy, clayey and peaty soils are different.

For the development of a reference framework and test selection criteria, it is essential to increase our insight into the relationship between ecotest responses and soil characteristics. Because different ecotests may respond differently depending of the type of pollutants present, for the development of test selection criteria also the relationship with pollutants present should be made clear. With this study, reference material is collected for soils from nature reserve areas. It is recommended to test also soils with other functions, for example

agricultural use. It seems therefore advisable to include all data on ecotest responses on reference and polluted soils in a databank.

With the results of this study, the results of earlier studies on the investigated Edelman sites are updated. This study shows an increase of heavy metal concentrations in the soils of some of the investigated locations. From this, it can be concluded that atmospheric deposition still is continuing.



# 1. Inleiding

## 1.1 Algemeen

Ecotesten kunnen waardevolle instrumenten zijn bij de beoordeling van actuele ecologische risico's<sup>1</sup> van bodemverontreiniging vanwege de meerwaarde die zij bieden aan chemische analyses. Met ecotesten worden de effecten van biologische beschikbaarheid, combinatietoxiciteit en alle in de bodem aanwezige chemicaliën bepaald. Ondanks de voordelen worden zij voor de afleiding van actuele ecologische risico's niet tot nauwelijks toegepast. Dit in tegenstelling tot het aquatische en bentische milieu waar ecotesten inmiddels zijn geaccepteerd. Hieraan ligt een aantal belangrijke oorzaken ten grondslag, waaronder het gebrek aan praktijkervaring en het ontbreken van een toetsings- en referentiekader. Verder kunnen worden genoemd:

- onbekendheid met ecotesten;
- kosten;
- complexiteit en daardoor specialistenwerk;
- ontbreken van duidelijke voorschriften wanneer welke test dient te worden uitgevoerd.

Bovendien is stimulatie van het gebruik van ecotesten niet aanwezig, omdat ecotesten (nog) niet zijn voorgeschreven voor de risicobeoordeling van verontreinigde bodems. Door een recente beleidsvernieuwing en de daarbij behorende vraag naar maatwerk is er behoefte ontstaan aan een wetenschappelijke gefundeerde ecologische risicobeoordeling met ecotesten. In bijlage 1 is achtergrondinformatie over ecotesten te vinden.

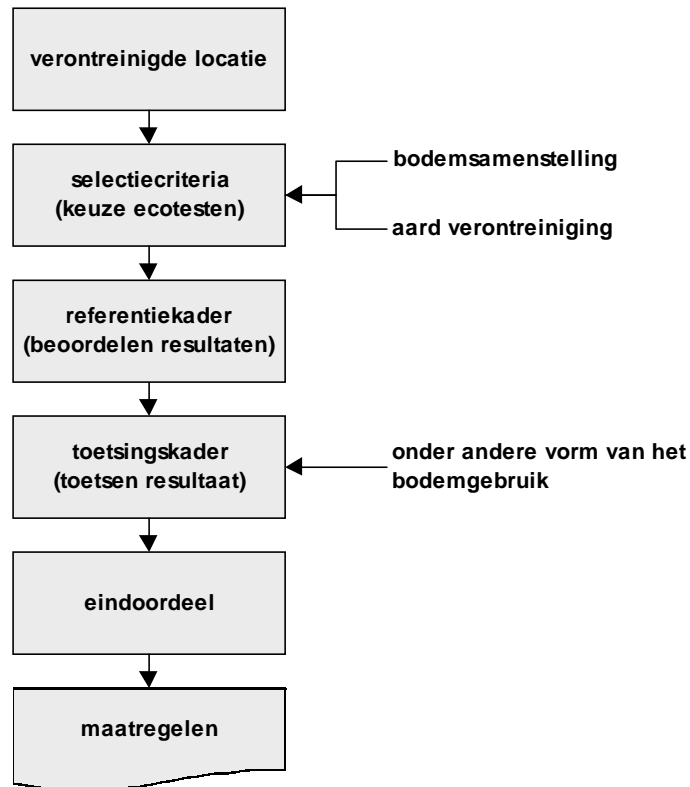
Een referentiekader voor ecotesten beschrijft waarmee en hoe de verkregen resultaten van ecotesten moeten worden vergeleken. In een toetsingskader staat daarentegen hoe de resultaten dienen te worden geïnterpreteerd en vertaald naar (beleidsmatige) maatregelen. Omdat bepaalde ecotesten niet goed functioneren op bepaalde bodemtypen of niet gevoelig genoeg zijn voor een bepaalde verontreiniging, dient tevens een selectie van geschikte ecotesten te worden uitgevoerd. De verschillende stappen voor een ecologische risicobeoordeling met ecotesten zijn weergegeven in figuur 1.

Er zijn diverse initiatieven ontplooid die bijdragen aan de stimulatie van het gebruik van ecotesten bij de afleiding van actuele ecologische risico's. Een van deze initiatieven is het onderhavige project, waarmee vergroting van het inzicht in de relatie tussen bodemeigenschappen en de resultaten van ecotesten wordt beoogd. Dit zal bijdragen aan zowel de ontwikkeling van een referentiekader als aan die selectiecriteria voor geschikte ecotesten. Andere initiatieven zijn de ontwikkeling van een basisbenadering voor de toepassing van ecotesten (Rutgers *et al.*, 1998; Rutgers *et al.*, 2000) en een verkennende

---

<sup>1</sup> In dit rapport wordt met "actueel" ecologisch risico het risico bedoeld dat daadwerkelijk in het veld waarneembaar is, en tot uiting komt als effect van biologische beschikbaarheid, combinatietoxiciteit en alle aanwezige verontreinigingen. Potentieel risico is het risico dat wordt afgeleid via modelberekeningen en dus het risico dat op grond van de aanwezigheid en gehalten aan verontreinigingen is te verwachten.

studie naar het opzetten van een databank met de resultaten van ecotesten in relatie tot bodemverontreiniging en bodemsamenstelling (Muijs *et al.*, 2000).



*Figuur 1. Beoordelen van bodemverontreiniging met ecotesten.*

## 1.2 Referentiegrond

Als ecotesten worden ingezet om actuele ecologische risico's van bodemverontreiniging te bepalen, moeten de resultaten worden vergeleken met een referentiegrond. Deze dient dezelfde bodemsamenstelling te hebben als de te testen grond en mag niet verontreinigd zijn. Door de resultaten van ecotesten uit te drukken als effect ten opzichte van een referentiegrond kan worden bepaald in welke mate bodemverontreiniging invloed heeft op het functioneren van het bodemleven. Hiermee kunnen actuele ecologische risico's worden afgeleid.

Niet alleen bodemverontreiniging heeft invloed op de resultaten van ecotesten. Bodemeigenschappen zoals vocht, zuurgraad, organische stof en textuur hebben eveneens invloed (zie onder meer Sandifer en Hopkin, 1996; Crommentuijn *et al.*, 1997; Van Gestel en van Diepen, 1997; Van den Munckhof *et al.*, 1998). Toetsorganismen prefereren een bepaalde ecologische niche. Wanneer de leefomgeving niet optimaal is, bijvoorbeeld wanneer de zuurgraad te hoog is of de bodem te slap, kan dit effect hebben op het

functioneren van het organisme. Als voorbeeld kunnen regenwormen worden genoemd die organisch rijke milieus prefereren. Deze regenwormen zullen aanmerkelijk minder presteren in arme zandgronden.

Dit onderstreept het belang van de keuze van een goede referentie. Dit blijkt in de praktijk problematisch te zijn. Deze is vaak niet voorhanden in het te onderzoeken gebied of op de locatie. Schone grond van elders of gestandaardiseerde gronden zoals die van LUFA of OECD wijken qua bodemsamenstelling vaak af, zodat beïnvloeding van de resultaten van de uitgevoerde ecotesten mogelijk is en deze gronden ongeschikt lijken als referentie. Bij een referentie met afwijkende bodemsamenstelling is het dan evenmin te achterhalen of de effecten worden veroorzaakt door de verontreiniging of door bodemeigenschappen. Een verkeerde interpretatie en daaruit volgende onjuiste beslissing kunnen het gevolg zijn. Daarom is de ontwikkeling van een referentiekader van belang om ecotesten in de toekomst te gaan gebruiken bij de beoordeling van actuele risico's van bodemverontreiniging.

### **1.3 Doelstellingen en oplossingsrichtingen**

Doelstelling van het project is het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van een referentiekader door het inzicht in de relatie tussen de resultaten van ecotesten en bodemeigenschappen te vergroten en een bruikbare dataset met de resultaten van ecotesten op schone gronden te genereren. Hiervoor zijn in antropogeen onbelaste gebieden met een verscheidenheid aan bodemeigenschappen grondmonsters genomen en beoordeeld met chemische analyses en ecotesten. De grondmonsters zijn genomen op een geselecteerd aantal zogenaamde “Edelmanlocaties”, die begin jaren ‘80 uitvoerig zijn bemonsterd en chemisch gekarakteriseerd (Edelman, 1984). Deze chemische karakterisering ligt ten grondslag aan de huidige achtergrondwaarden (streefwaarden) voor de bodemkwaliteit in Nederland. De ligging van de onderzochte Edelmanlocaties is aangegeven in bijlage II. Bij de selectie is getracht om zowel zand-, klei- als veengronden te betrekken, om zodoende referentiegegevens te genereren voor veel in Nederland voorkomende bodemtypen.

Doordat met het project het inzicht in de relatie tussen de resultaten van ecotesten en bodemeigenschappen wordt vergroot, zal het project eveneens bijdragen aan selectiecriteria voor geschikte ecotesten in een bepaalde situatie. Daarnaast worden de resultaten van voorgaande onderzoeken op de Edelmanlocaties geactualiseerd. Naast de eerder genoemde chemische karakterisering betreffen dit onderzoeken naar referentiegegevens voor bioaccumulatie van verontreinigingen in radijs, sla en regenwormen (Van Gestel *et al.*, 1992) en bioaccumulatie van verontreinigingen door planten, insecten, regenwormen en (spits)muizen (Ma *et al.*, 1992).

De verkregen resultaten vormen overigens *geen* “achtergrondwaarden” voor ecotesten en maken het gebruik van lokale referentiegronden *niet* overbodig. Onder andere door weersinvloeden en variatie in de gebruikte toetsorganismen zullen ecotesten momentopnamen blijven. Een goede lokale referentie zal daarom *altijd* de voorkeur hebben voor de



juiste interpretatie van ecotesten. De gegenereerde dataset zal in de toekomst wel bijdragen aan een betrouwbaardere interpretatie van de resultaten van ecotesten.

#### **1.4 Projectaanpak**

In het kader van dit project is een selectie van Edelmanlocaties bemonsterd en beoordeeld met fysisch-chemische analyses, chemische analyses en ecotesten. De fysisch-chemische analyses dienen deels ter verificatie van voorgaande onderzoeken en deels om zoveel mogelijk randvoorwaarden voor de gegenereerde ecotoxicologische data te creëren.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Locaties

In totaal zijn acht Edelmanlocaties bemonsterd. De locaties zijn geselecteerd op basis van een verscheidenheid aan bodemkarakteristieken en vanuit praktische overwegingen, met name de ligging en de verkrijgbaarheid van vergunningen. Tabel 1 vat de gegevens over ligging, bodemsamenstelling en begroeiing samen.

*Tabel 1. Gegevens van de bemonsterde locaties (naar Edelman, 1984).*

locatie	x-y coördinaten	topografische kaart	bodemclassificatie	organische stofklasse	textuurklasse	begroeiing
Blauwe Hel	167,7-447,2	39 O	vlietveengrond	veen	-	gras
Blauwgrasland bij de Zijdebrug	110,5-432,7	38 W	koopveengrond	kleilig veen	-	gras
Duin en Kruidberg	99,1-494,3	24 O / 25 W	duinvaaggrond	matig humeus	leemarm zand	kruiden
Fortmond	202,4-486,8	27 O	duinvaaggrond	matig humusarm	leemarm zand	loof- en naaldhout
Kampina	146,8-397,5	51 W	veldpodzolgrond	zeer humeus	sterk lemig zand	heide
Korenburgerveen	242,0-444,5	41 O	vlietveengrond	veen	-	veenmos
Oeverlanden Linge	136,9-431,3	38 O	leekeerdgrond	humusrijk	matig zware klei	gras
Eendenkooi 't Broek	143,9-429,2	39 W	poldervaaggrond	zeer humeus	zeer zware klei	loofhout

### 2.2 Meetprogramma

Voor dit project zijn de acht locaties onderverdeeld in uitgebreid en beperkt onderzochte locaties. Zij zijn alle gekarakteriseerd met fysisch-chemisch onderzoek, een arbeids-extensieve bodemecologische veldinventarisatie en een arbeidsextensieve acute bioassay. Op de uitgebreid onderzochte locaties zijn daarnaast een ruimtelijke analyse van de verdeling van chemische stoffen op de locatie, enkele chronische bioassays en (micro)biologische veldinventarisaties uitgevoerd. Het meetprogramma is samengevat in tabel 2.

Tabel 2. Meetprogramma

	beperkt onderzocht	uitgebreid onderzocht
<b>locaties</b>	Blauwgrasland nabij de Zijdebrug Fortmond Kampina Korenburgrveen Oeverlanden van de Linge	de Blauwe Hel Duin en Kruidberg Eendenkooi 't Broek
<b>fysisch-chemische analyses</b>		
zuurgraad	+	+
korrelgrootte verdeling	+	+
organische stof	+	+
vochtgehalte	+	+
Water Holding Capacity	+	+
<b>ruimtelijke verdeling</b>		
zware metalen	-	+
PAK	-	+
minerale olie	-	+
EOX	-	
<b>chemische analyses</b>		
arseen	+	+
cadmium	+	+
chrom	+	+
koper	+	+
kwik	+	+
nikkel	+	+
zink	+	+
kobalt	-	+
vanadium	-	+
aluminium	-	+
calcium	-	+
ijzer	-	+
kalium	-	+
magnesium	-	+
natrium	-	+
polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK)	+	+
extraheerbare organohalogeen verbindingen (EOX)	+	+
minerale olie	+	+
<b>ecotesten</b>		
acute bioassays Microtox-test	+	+
chronische bioassays springstaart <i>Folsomia candida</i> sla ( <i>Lactica sativa</i> ) regenworm <i>Lumbricus rubellus</i>	-	+
microbiologische analyses Bait lamina-test groeisnelheid en biomassa bacteriën	+	+
veldinventarisaties samenstelling regenworm- populatie in het veld functionele groepen nematoden	-	+

## 2.3 Bemonstering

De grondmonsters zijn op 5, 6 en 7 oktober 1999 door Witteveen+Bos genomen. De benodigde hoeveelheid grond is verzameld door met een Edelmanboor verspreid over een vak van circa 7 bij 7 m grondmonsters te nemen van de bovenste 10 cm van de minerale bodem. In het veld is hiervan een mengmonster samengesteld. Een eventueel aanwezige zoden- of strooisellaag is eerst verwijderd.

Bij de monsternamen is onderscheid gemaakt tussen de beperkt en uitgebreid onderzochte locaties. Voor de uitgebreid onderzochte locaties is het terrein verdeeld in een drietal vakken met een onderlinge afstand van circa 25 m en elk vak is apart bemonsterd voor de ruimtelijke analyse van verontreinigingen en microbiologische veldinventarisaties. Voor de overige analyses zijn de monsters van deze drie vakken gemengd tot één mengmonster.

De bodemmonsters voor de Bait lamina-test zijn bewaard in een niet-geklimatiseerde donkere ruimte. Dit om zoveel mogelijk de veldomstandigheden te imiteren en zodoende het biologische leven en de bodemeigenschappen minimaal te beïnvloeden. De monsters voor de bioassays en chemische analyses zijn bewaard bij 4°C en als één partij bij de desbetreffende laboratoria afgeleverd. De monsters voor de bioassays met regenwormen, microbiologische inventarisaties en nematodentellingen zijn direct na monsternamen afgeleverd bij de desbetreffende laboratoria.

## 2.4 Analyses

### 2.4.1 Analyse fysisch-chemische bodemparameters

#### *Vocht en Water Holding Capacity (WHC)*

Voor bepaling van het vochtgehalte is een hoeveelheid grond afgewogen en overnacht gedroogd in een droogstof bij 105°C. Door opnieuw te wegen is het vochtverlies bepaald. Het vochtpercentage is berekend ten opzichte van het drooggewicht.

De Water Holding Capacity (WHC) is de voor planten beschikbare hoeveelheid vocht in de grond tussen veldcapaciteit (0.1 bar) en verwelkingscapaciteit (16 bar). Dit is bepaald door een hoeveelheid grond in een trechter met filter gedurende drie uur onder water te plaatsen, zodat de grond volledig met water raakt verzadigd. Vervolgens zijn de trechters uit het water genomen, zodat deze gedurende drie uur kunnen uitlekken. Na het uitlekken kan worden aangenomen dat de grond op “veldcapaciteit” is (0.1 bar). De WHC is bepaald door berekening van het vochtpercentage van de grond na het uitlekken ten opzichte van het drooggewicht.

#### *Organische stof, korrelgrootteverdeling en zuurgraad*

De bepalingen van het percentage organische stof, de korrelgrootteverdeling en de zuurgraad zijn uitgevoerd door ALcontrol Biochem Laboratoria te Zoetermeer.

De korrelgrootteverdeling is bepaald volgens een op NEN 5730 gebaseerde methode. Hiertoe is de grond met waterstofperoxide behandeld om het organisch materiaal te

verwijderen. Door vervolgens te koken in verdund zoutzuur worden zouten in oplossing gebracht en verwijderd. De korrelgrootteverdeling van de resterende grond is bepaald door een zeefkromme te maken. De gebruikte zeven hebben een maaswijdte van 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 50, 32, 16 en 2  $\mu\text{m}$ . Met de resultaten van de zeefkromme is de bodemtextuur bepaald; de verdeling over de lutum, silt en zandfractie. Hierbij worden lutum, silt en zand gedefinieerd als respectievelijk de fracties kleiner dan 2 $\mu\text{m}$ , de fractie vanaf 2 tot 63 $\mu\text{m}$  en de fractie tussen 63 $\mu\text{m}$  en 2mm.

Het organisch stofgehalte is gemeten door het gloeiverlies te bepalen. De zuurgraad is bepaald door grond met 1 M KCl te schudden en in de bovenstaande vloeistof de pH te meten.

#### **2.4.2 Chemische analyses**

De chemische analyses zijn eveneens uitgevoerd door ALcontrol Biochem Laboratoria te Zoetermeer.

##### *Zware metalen*

De metalen in de gedroogde grondmonsters zijn ontsloten door deze in drukvaten over te brengen en in een mengsel van zoutzuur en salpeterzuur (koningswater) te koken (magnetron). De in het koningswater opgeloste metalen zijn, met uitzondering van kwik, na filtratie geanalyseerd door middel van ICP/AES. Het kwikgehalte is bepaald door middel van FIAAS-koude damp technieken.

##### *Polycyclische aromatische koolwaterstoffen*

Voor de analyses van PAK (16 EPA PAK) zijn de grondmonsters geëxtraheerd met aceton en hexaan. Door het extract te wassen met water wordt de aceton uit het extract verwijderd. De PAK-concentraties in het extract zijn geanalyseerd met behulp van GC/MS.

##### *Minerale olie*

De concentratie minerale olie is bepaald door de grond te extraheren met aceton en hexaan. Het verkregen extract wordt gewassen met water en over een kolom met silicagel geleid om respectievelijk het aceton en storende componenten (o.a. humuszuren en PAK) te verwijderen. Het extract wordt geanalyseerd door middel van gaschromatografie en met een Vlam Ionosatie Detector (FID). Bij de analyse is onderscheid gemaakt in een viertal oliefracties, te weten C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>22</sub>-C<sub>30</sub> en C<sub>30</sub>-C<sub>40</sub>. Aan de hand van het verkregen chromatogram kan een indicatie van de oliesoorten worden verkregen.

##### *Extraheerbare organohalogeenvverbindingen*

Het EOX-gehalte is bepaald door de grondmonsters te extraheren met aceton en hexaan. Het extract wordt gewassen met water om de acetonfase te verwijderen en vervolgens onder een stikstofstroom door verwarming ingedampt. Hierdoor wordt het extract geconcentreerd en zijn de vluchtige verbindingen gedeeltelijk verwijderd. Het ontstane extract wordt verbrand en het gevormde water en CO<sub>2</sub> worden door middel van een gaswasser weggevangen. De overgebleven anorganische zuren worden opgelost in een

meetoplossing. Het gehalte aan halogenen wordt in deze meetoplossing micro-coulombmetrisch bepaald.

## 2.5 Ecotesten

### 2.5.1 Acute bioassays

#### *Microtox-test*

De Microtox-test is uitgevoerd door KEMA. De testen zijn uitgevoerd op een extract van de bemonsterde gronden, welke is verkregen met een tweestaps-extractie (NOBIS, 2000). Hiervoor is 100% waterverzadigde bodem gedurende 6 uur met 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (L/S=0,5) uitgeschud op een rollerbank (1000 RPM). Na bezinking is de bovenstaande vloeistof 15 minuten gecentrifugeerd (1000 G) en overgebracht naar glazen monsterflessen. De resterende grond uit de centrifugebuis en uit de pot zijn samengevoegd en opnieuw met 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (L/S=0,5) gedurende 18 uur uitgeschud. De bovenstaande vloeistof is na centrifugatie samengevoegd met het eerder verkregen extract en over 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF-filters gefiltreerd. Met deze extractiemethode wordt getracht om de biologische beschikbaarheid van verontreinigingen zo goed mogelijk te benaderen.

De Microtox-testen zijn uitgevoerd conform NVN 6516 (NNI, 1993). Hiervoor is het extract 50 volumepercent verdund met een oplossing waarin de bacterie *Vibrio fischeri* aanwezig is. Deze bacterie zendt onder normale omstandigheden licht uit (bioluminescentie). Na 5, 15 en 30 minuten blootstelling is de bioluminescentie gemeten en vergeleken met een blanco (verdunningsmedium).

Voor aanvang van de test zijn ter controle het gehalte aan zuurstof, nitriet en ammonium, de zuurgraad en de elektrische geleidbaarheid gemeten. Voor deze parameters zijn randvoorwaarden opgesteld (FWVO, 1997; NNI, 1993; RIZA, 1996). Wanneer het extract voldoet aan deze randvoorwaarden, worden geen negatieve effecten van deze parameters verwacht en kan worden uitgesloten dat de waargenomen effecten worden veroorzaakt door bodemeigenschappen, anders dan eventueel aanwezige verontreinigingen.

### 2.5.2 Chronische bioassays

#### *Bioassays met de springstaart Folsomia candida*

De bioassays met de springstaart *Folsomia candida* zijn uitgevoerd door de Vrije Universiteit. Per locatie zijn 10 glazen potten met een inhoud van 100 ml gevuld met 25 gram grond, welke is bevochtigd tot 50% WHC. Aan elke pot zijn 10 springstaarten (*Folsomia candida*, Willem), in leeftijd variërende tussen de 10 en 12 dagen, toegevoegd. De springstaarten zijn gevoerd met enkele korrels bakkersgist (dr. Oetker). De organismen zijn vier weken aan de grond blootgesteld bij een temperatuur van 18°C, 75% relatieve luchtvochtigheid (RH) en een dag-nachtcyclus van 14/10 uur. Gedurende de blootstellingsduur zijn enkele malen per week de potjes belucht door deze kort te openen. Indien nodig zijn de springstaarten met gist gevoerd.

Met een microbalans (Sartorius supermicro, nauwkeurigheid 0,0001 mg) is het gemiddelde versgewicht van de springstaarten bij aanvang van de bioassays bepaald. Het gemiddelde aanvangsgewicht ( $\pm$ SD) bedroeg  $19,3 \pm 6,93 \mu\text{g}$  ( $n=15$ ).

Na vier weken blootstelling zijn de bioassays beëindigd. De inhoud van de potten is met water gespoeld en opgevangen in een bekersglas. Door goed te roeren komen de springstaarten aan de oppervlakte drijven. Het aantal volwassen springstaarten (overleving) is direct geteld. Voor de bepaling van het aantal juvenielen is een dia gemaakt van het wateroppervlak. Op deze dia zijn later de aantallen juvenielen geteld. Voor bepaling van de groei zijn van elke locatie 10 volwassen springstaarten gewogen op eerder genoemde microbalans.

Voor de bioassays met de springstaart *Folsomia candida* is een extra (referentie-) grondmonster getest. Deze grond, bekend onder de naam LUFA 2.2, is afkomstig van het LUFA-instituut te Speyer in Duitsland en wordt veelal gebruikt als standaardgrond in onderzoek naar het gedrag van bestrijdingsmiddelen in de bodem. Recent wordt deze grond ook aanbevolen voor toxiciteitstesten met bodemorganismen (Løkke en Van Gestel, 1998). LUFA-grond is een natuurlijke grond, humusarm en zandig.

#### *Bioassays met sla (Lactuca sativa)*

De bioassays met sla zijn uitgevoerd door de Vrije Universiteit. De grond voor de bioassays is bevochtigd tot 50% WHC. Per locatie zijn vijf plastic bakjes met een inhoud van circa 400 ml voor circa 5/6 met grond gevuld en in elk bakje zijn 10 slazaadjes gezaaid ("Triumphator", Welkoop). Aan elk bakje is vervolgens 5 ml voedingsoplossing toegevoegd (zie voor samenstelling bijlage III). De planten hebben vier weken op dit medium gegroeid bij 70% luchtvochtigheid en een temperatuur variërende tussen 15 en 30°C. Als lichtbron is gebruik gemaakt van twee Agro-groeilampen (300 W) met een dag-nachtcyclus van 10/14 uur.

Tijdens de groei zijn de potten dagelijks met voedingsoplossing bevochtigd. Na enkele weken is het aantal slaplanten gereduceerd naar vijf om de planten ruimte te geven. Bij het beëindigen van de test zijn de bovengrondse delen van de slaplanten afgeknipt en gewogen. De planten zijn vervolgens overnacht gedroogd bij 50°C om het drooggewicht te bepalen. Door het wijd vertakt wortelstelsel was het niet mogelijk de wortels onbeschadigd uit het testmedium te halen. Daarom is de biomassa van de ondergrondse delen niet bepaald.

#### *Bioassays met de regenworm Lumbricus rubellus*

De bioassays met de regenworm *Lumbricus rubellus* zijn uitgevoerd door Alterra. Per locatie zijn zes glazen potten van 1 liter inhoud gevuld met grond. Vanwege de structuur is de grond van de locaties de Blauwe Hel en Eendenkooi 't Broek verkruid om deze voor regenwormen geschikt te maken.

Aan elke pot zijn vijf volwassen regenwormen (*Lumbricus rubellus*) toegevoegd. De wormen zijn gevoerd met bevochtigd elzeblad. Na vier weken blootstelling bij een constante temperatuur van 15°C en continu licht is de test beëindigd. De overlevende

volwassen wormen zijn geteld. Het aantal geproduceerde cocons is geteld door deze uit de grond te zeven door middel van een getrappt zeefstelsel.

Naast de drie Edelmangronden is de regenwormtest ook uitgevoerd met KOBG-grond. Dit is een humeuze lemige zandgrond, die is gebruikt als positieve kwaliteitscontrole.

### **2.5.3 Microbiologische analyses en veldinventarisaties**

#### *Bait lamina-test*

Per locatie zijn vier potten gevuld met grond en weggezet in een klimaatkamer bij 18°C. Na enkele dagen incubatie zijn in elke pot vijf Bait lamina-strips gestoken. De strips zijn vier weken aan de grond blootgesteld. Gedurende de test is regelmatig gecontroleerd op het vochtgehalte en indien nodig is demiwater toegevoegd tot het oorspronkelijke gewicht van de pot met inhoud. Na één week blootstelling is de substraatconsumptie bepaald. Om te voorkomen dat de strips bij controle schade oplopen is, met uitzondering van een steekproefsgewijze controle, afgezien van verdere tussentijdse controle en is de consumptie alleen bij het beëindigen van de test bepaald. De testen zijn uitgevoerd door Witteveen+Bos

#### *Inventarisatie van regenwormen in het veld*

Op de locaties de Blauwe Hel, Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg zijn door Alterra veldinventarisaties uitgevoerd van de regenwormenpopulaties. Per locatie zijn op acht plaatsen monsters (lengte × breedte × diepte = 50 × 50 × 20 cm) genomen met een onderlinge afstand van circa 10 m. De monsters hebben bestaan uit “blokken” grond van circa 50 × 50 cm en 20 cm diep. De wormen zijn met de hand uit de grondmonsters verwijderd.

In het laboratorium zijn de wormen schoongespoeld en gedetermineerd. Tevens is het stadium van ontwikkeling bepaald, waarbij onderscheid is gemaakt tussen juveniel, subadult en adult. De subadulte en adulte wormen zijn tot op de soort gedetermineerd. Voor juveniele wormen is determinatie tot soortniveau niet mogelijk vanwege het nog ontbreken van specifieke soortkenmerken. Van elke soort en van elk ontwikkelingsstadium is het versgewicht per monster bepaald als maat voor het voorkomen van biomassa in het veld.

#### *Biomassa en groeisnelheid bacteriën*

Het totale aantal bacteriën en de afmetingen van de cellen zijn door Alterra bepaald door middel van directe microscopische tellingen (Bloem *et al.*, 1995b; Bloem, 1995). Dit gebeurt in grondpreparaten waarin de micro-organismen zijn gekleurd met een fluorescerende verbinding. Uit het aantal en de afmetingen zijn het biovolume en de biomassa berekend. Deze metingen zijn uitgevoerd met behulp van een confocale laser-scan microscoop en automatische beeldverwerking (Bloem *et al.*, 1995a). De groeisnelheid van bacteriën is bepaald door de inbouw van radioactief gelabelde <sup>3</sup>H-thymidine en <sup>14</sup>C-leucine in respectievelijk DNA en eiwitten te meten (Michel en Bloem, 1993).



Omdat de thymidine met  $^3\text{H}$  en de leucine met  $^{14}\text{C}$  is gelabeld, kunnen beide parameters (de microbiële DNA- en eiwitsynthese) in één bepaling worden gemeten. Het verband van de groeisnelheid met thymidine-inbouw is constanter dan met leucine-inbouw. Daar staat tegenover dat sommige soorten bacteriën, vooral anaërobe, thymidine niet kunnen inbouwen, terwijl leucine door vrijwel alle bacteriën kan worden ingebouwd.

De incubaties zijn kort (1-2 uren), zodat de groeisnelheid van de bacteriën tijdens de incubatie niet verandert. In principe wordt dus de *in situ* groeisnelheid gemeten. Ook de biomassameting wordt niet beïnvloed door monstername en incubatie, omdat het monster direct na de monstername wordt gefixeerd en geconserveerd met formaldehyde.

#### *Genetische diversiteit*

De genetische diversiteit van bacteriën is door Alterra bepaald door middel van Denaturatie-Gradiënt Gel Electroforese (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993). Microbieel DNA is geëxtraheerd uit de grond, gezuiverd en vermenigvuldigd door middel van PCR (Polymerase Chain Reaction). De genetische samenstelling van het DNA is met behulp van DGGE in kaart gebracht in de vorm van een bandenpatroon. Het aantal banden is een afspiegeling van het aantal genotypen ("soorten"). De intensiteit van een band is een maat voor de relatieve abundantie van de betreffende groep. De bandenpatronen zijn met het programma GelCompar II op de PC geanalyseerd en gekwantificeerd.

#### *Functionele groepen nematoden*

De samenstelling van de nematodenpopulatie geeft een indicatie van het relatieve belang van verschillende biologische processen in de bodem: afbraak van organische stof door bacteriën of door schimmels, aantasting van plantenwortels of predatie van nematoden door andere (predatore) nematoden.

Nematoden zijn door Alterra uit de grond geïsoleerd met een Oostenbrink-trechter (elutriator) en vervolgens geteld en gedetermineerd onder de microscoop (Bouwman *et al.*, 1994). Op basis van de morfologie van de monddelen zijn vier functionele groepen onderscheiden:

- bacterivoren (eten bacteriën);
- fungivoren (eten schimmels);
- herbivoren (of phytofagen, eten van plantenwortels);
- omnivoren/predatoren (eten allerlei voedsel, waaronder andere nematoden).

## **2.6 Statistische bewerkingen**

Significatieverschillen zijn berekend met behulp van ANOVA (Analyses of Variance) en student T-toets (t-toets). Voor de berekeningen is gebruik gemaakt van Microsoft Excel 97. Als significantieniveau  $\alpha$  is 0,05 aangehouden.

### 3. Resultaten

#### 3.1 Veldwerk

Ten gevolge van gewijzigd terreingebruik of de situatie ter plaatse bleek een aantal van de oorspronkelijk door Edelman (1984) gebruikte monsterpunten niet bereikbaar. Dit betrof monsterpunten op de locaties Duin en Kruidberg, Eendenkooi 't Broek en de Oeverlanden van de Linge. In Duin en Kruidberg is het monsterpunt circa 100 meter landinwaarts verplaatst. Het oorspronkelijke monsterpunt is in gebruik genomen als fietsenstalling voor bezoekers van het strand. Op de locatie Eendenkooi 't Broek is het perceel aangrenzend aan de eendenkooi bemonsterd. Vanwege mogelijke verstoring is geen toestemming verkregen om in de eendenkooi zelf te bemonsteren. Het monsterpunt op de Oeverlanden van de Linge was niet toegankelijk, omdat dit onder water stond. Het monsterpunt is daarom enkele meters verplaatst. In bijlage IV zijn situatieschetsen met de monsterpunten opgenomen. In bijlage V zijn de veldbeschrijvingen weergegeven.

#### 3.2 Fysisch-chemische analyses

Tabel 3 geeft de resultaten weer van de fysisch-chemische analyses. De verschillende locaties vertonen een grote verscheidenheid in bodemsamenstelling. Hierin is een driedeling te maken. De monsters afkomstig van het blauwgrasland nabij de Zijdebrug, Eendenkooi 't Broek en Oeverlanden van de Linge kunnen worden gekarakteriseerd als klei, de monsters van Duin en Kruidberg, Fortmond en Kampina als zand en de monsters van de locaties de Blauwe Hel en het Korenburgerveen als veen.

*Tabel 3. Fysisch-chemische parameters van de onderzoekslocaties, vergeleken met Edelman (1984). Percentages ten opzichte van het drooggewicht.*

locatie	grondsoort	droge stof (%)	vochtgehalte (%)	WHC	organische stof		pH-KCl		textuur (lutum: silt: zand)	
					geme-ten	Edel-man	geme-ten	Edel-man	gemeten	Edelman
Blauwe Hel	veen	11	967	1133	88	63	5,5	5,3	2: 0: 98	20: 56: 24
Blauwgrasland bij de Zijdebrug	klei	29	301	371	45	52	4,5	3,8	55: 39: 6	55: 43: 2
Duin en Kruidberg	zand	95	5	37	<1,0	3,4	7,0	6,8	2: 1: 97	0: 1: 99
Eendenkooi 't Broek	klei	70	46	61	10	9,5	5,6	6,2	60: 37: 3	54: 44: 2
Fortmond	zand	93	7	35	1,2	2,3	3,7	3,5	6: 5: 89	3: 3: 95
Kampina	zand	79	28	65	7,1	7,8	3,2	3,2	7: 11: 82	2: 17: 81
Korenburgerveen	veen	28	446	644	44	96	4,0	2,9	8: 10: 82	18: 60: 22
Oeverlanden Linge	klei	60	75	70	16	10	5,6	6,8	49: 34: 17	43: 48: 8

Vanwege het hoge percentage organisch materiaal en daardoor het hoge vochtabsorberende vermogen, is de WHC van de monsters van de Blauwe Hel en Zijdebrug hoog. De monsters afkomstig van de Blauwe Hel bevatten een grote hoeveelheid organisch materiaal met duidelijk herkenbare plantenresten, zodat strikt genomen (nog) geen sprake van bodem.

De gemeten pH-waarden wijken in het algemeen weinig af van de waarden in Edelman (1984). Alleen de zuurgraad van het blauwgrasland bij de Zijdebrug en van het Korenburgerveen zijn een halve tot één eenheid hoger dan in 1984. In het Korenburgerveen is ten bate van natuurontwikkeling de grondwaterstand verhoogd (Ma, persoonlijke mededeling), wat wellicht invloed heeft op de zuurgraad. De pH van de Oeverlanden aan de Linge verschilt één eenheid. Hierbij moet worden opgemerkt dat vanwege de toegankelijkheid niet op dezelfde locatie als Edelman (1984) is bemonsterd.

De bodemtextuur, de fractieverdeling over lutum, silt en zand, wijkt met uitzondering van de Blauwe Hel, Korenburgerveen en de Oeverlanden van de Linge weinig af van de resultaten van Edelman (1984). Bij Korenburgerveen en Oeverlanden Linge kan dit mede worden veroorzaakt door de eerder genoemde verhoging van de grondwaterstand respectievelijk de verplaatsing van de monsterlocatie. De verschillen op de locatie de Blauwe Hel zijn mogelijk veroorzaakt doordat op een andere locatie is bemonsterd dan Edelman (1984).

### **3.3 Chemische analyses**

#### **3.3.1 Zware metalen, spoorelementen en organische verontreinigingen**

Tabel 4 geeft de resultaten weer van de chemische analyses van de onderzochte locaties. Met uitzondering van de cadmiumconcentraties op Kampina en het Korenburgerveen, de loodconcentraties in het blauwgrasland bij de Zijdebrug en het Korenburgerveen en de nikkel- en zinkconcentraties in de Blauwe hel, worden er geen streefwaarden overschreden.

Tabel 5 geeft de resultaten weer van de analyses op spoorelementen en enkele macro-nutriënten op de locaties de Blauwe Hel, Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek. De gehalten aan aluminium, kobalt, ijzer kalium en magnesium zijn hoog op Eendenkooi 't Broek en, met uitzondering van magnesium, laag op Duin en Kruidberg. Alleen op Eendenkooi 't Broek is natrium gemeten. Op geen van de locaties wordt de streefwaarde voor kobalt overschreden (zie bijlage VI). Voor de resterende metalen zijn geen streef- en interventiewaarden vastgesteld.

Tabel 4. Zware metalen in de bodem van de onderzoekslocaties in mg kg<sup>-1</sup> DW. Onderstreepte waarden overschrijden de streefwaarden.

locatie	grond-soort	Arseen	Cadmium	Chroom	Koper	Kwik	Lood	Nikkel	Zink
Eendenkooi 't Broek	klei	16	0,60	48	31	<0,1	48	46	130
Oeverlanden Linge	klei	23	0,87	49	30	0,13	57	49	140
Blauwe Hel	veen	9,5	1,80	15	37	<0,1	89	<u>16</u>	<u>343</u>
Blauwgrasland bij de Zijdebrug	klei	22	0,80	52	24	0,3	<u>180</u>	35	115
Korenburerveen	veen	<5,0	<u>3,8</u>	<10	11,5	<0,3	<u>110</u>	7,2	115
Duin en Kruidberg	zand	<5,0	<0,2	<10	<5,0	<0,1	12	<5,0	23
Fortmond	zand	<5,0	<0,2	10	<5,0	<0,1	18	7,5	23
Kampina	zand	<5,0	<u>0,73</u>	<10	<5,0	<0,1	14	<5,0	16

toetsingswaarden voor een standaardbodem (10% organische stof en 20% lutum) <sup>2</sup>									
streefwaarde		29	0,8	100	36	0,3	85	35	140
interventiewaarde		55	12	380	190	10	530	210	720

Tabel 5. Spoorelementen en metalen in de bodem van de onderzoekslocaties in mg kg<sup>-1</sup> DW.

locatie	grond-soort	Aluminium	Calcium	Kobalt	IJzer	Kalium	Magnesium	Natrium	Vanadium
Eendenkooi 't Broek	klei	22000	10000	16	35000	1650	8000	105	49
Blauwe Hel	veen	1750	12000	2,1	10000	500	640	<100	62
Duin en Kruidberg	zand	870	11000	<2,0	3800	240	910	<100	<10

toetsingswaarden voor een standaardbodem (10% organische stof en 20% lutum, zie ook voetnoot 2)									
streefwaarde		-	-	9	-	-	-	-	-
interventiewaarde		-	-	240	-	-	-	-	-

Tabel 6 geeft de gehalten van de organische verbindingen in de bodems van de onderzochte locaties weer. De PAK-gehalten (16 EPA PAK) zijn laag (beneden de streefwaarde) en op de meeste locaties niet detecteerbaar. In de bodems zijn voornamelijk hoogmoleculaire PAK gemeten. Met uitzondering van Duin en Kruidberg zijn in alle bodems EOX gemeten. Op de locaties de Blauwe Hel, Fortmond, Kampina en de Oeverlanden van de Linge wordt de streefwaarde voor EOX net overschreden. De richtlijnen voor het verkennend bodemonderzoek schrijven aanvullende analyses op polychloorbifenylen (PCB), organochloorbestrijdingsmiddelen (OCB) en chloorbenzenen voor wanneer het EOX-gehalte hoger is dan 3,0 mg/kg ds (NNI, 1999). Dit is op geen van de locaties het geval. Op geen van de locaties is minerale olie gemeten. De uitkomst van de toetsing aan de Wet Bodembescherming is opgenomen in bijlage VI.

<sup>2</sup> Streef- en interventiewaarden worden gecorrigeerd voor het percentage lutum en organische stof. In bijlage VI staan de streef- en interventiewaarde voor de afzonderlijke locaties vermeld.

Tabel 6. PAK, EOX en minerale olie in de bodems van de onderzochte locaties in mg kg<sup>-1</sup> DW. Onderstreepte waarden overschrijden de streefwaarden.

locatie	grondsoort	PAK (EPA) <sup>3</sup>	EOX	Minerale olie <sup>3</sup>
Blauwe Hel	veen	<1,2	<u>1,3</u>	<100
Blauwgrasland bij de Zijdebrug	veen	1,1	<u>0,7</u>	< 60
Duin en Kruidberg	zand	<0,1	<0,1	< 20
Eendenkooi 't Broek	klei	<0,2	0,3	< 20
Fortmond	zand	<0,2	<u>0,2</u>	< 20
Kampina	zand	<0,2	<u>1,1</u>	< 20
Korenburerveen	veen	1,4	<u>0,9</u>	< 20
Oeverlanden Linge	klei	0,3	<u>0,5</u>	< 20

toetsingswaarden voor een standaardbodem (10% organische stof en 20% lutum, zie ook voetnoot 2 op bladzijde 2)

streefwaarde	1	0,3	50
interventiewaarde	40	-	5000

### 3.3.2 Ruimtelijke verdeling binnen de locatie

Om inzicht te verkrijgen in de ruimtelijke verdeling van een aantal stoffen zijn op drie locaties bodemmonsters genomen uit een drietal vakken. Tabel 7 geeft de resultaten van deze analyses weer.

Tabel 7. Variatie van verontreinigingen binnen de onderzoekslocaties. Concentraties in mg kg<sup>-1</sup> DW.

locatie	grondsoort	vak	chromium	nikkel	koper	zink	cadmium	lood	arsen	EOX
Eendenkooi 't Broek	klei	1	47	38	27	145	0,9	62	15	<0,1
		2	49	48	34	120	0,37	42	17,5	0,2
		3	49	51	32	125	0,67	40	15	0,1
De Blauwe Hel	veen	1	17	13	28	300	2,1	135	<5,0	0,6
		2	12	20	56	440	1,85	76	8,5	2,5
		3	<10	14,5	26	290	1,45	57	10,5	0,8
Duin en Kruidberg	zand	1	<10	<5,0	<5,0	20	<0,2	<10	<5,0	<0,1
		2	<10	<5,0	<5,0	27	0,2	13	<5,0	<0,1
		3	<10	<5,0	<5,0	21	<0,2	11	<5,0	<0,1

De gemeten stoffen zijn vrij homogeen verdeeld op de locaties Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek. Alleen cadmium, lood en zink in de bodem op de laatst genoemde locatie lijken in een enkel vak hoger. De verdeling op de locatie de Blauwe Hel is minder homogeen. De gehalten aan PAK en minerale olie liggen op deze drie locaties beneden de detectiegrens.

<sup>3</sup> De detectiegrenzen zijn afhankelijk van de hoeveelheid droge stof in de bodemmonsters.

### 3.4 Ecotesten

De ruwe data van de ecotesten zijn te vinden in bijlagen VII-XIV.

#### 3.4.1 Acute bioassays

##### *Microtox-test*

De gemeten gehalten aan zuurstof, nitriet en ammonium, de zuurgraad en het elektrisch geleidingsvermogen voldoen aan de gestelde randvoorwaarden.

In alle bodemextracten is de remming van de bioluminescentie kleiner dan 10% ten opzichte van de blanco (verdunningsmedium). Dit houdt in dat er geen toxische effecten zijn gemeten.

#### 3.4.2 Chronische bioassays

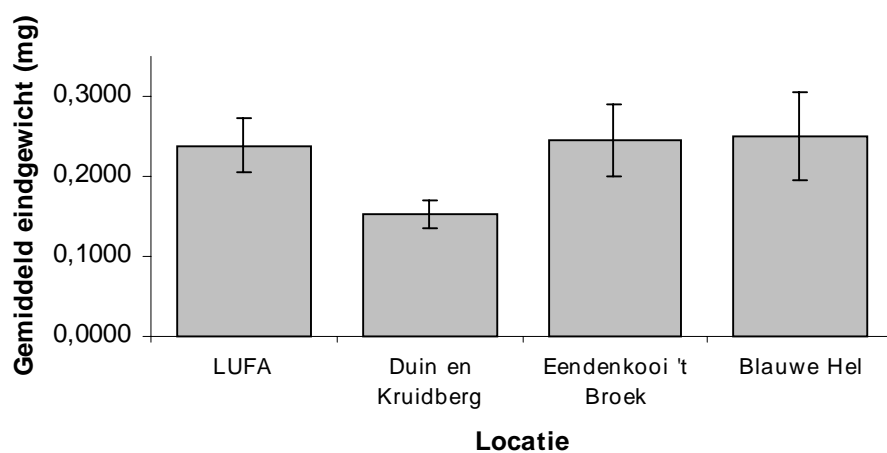
##### *Bioassays met de springstaart Folsomia candida*

Tussen de locaties zijn geen verschillen te zien in de overleving van de springstaarten. Deze is op alle locaties rond 80 procent. Figuur 2 laat zien dat de springstaarten op de locatie Duin en Kruidberg minder zijn gegroeid en qua gewicht duidelijk zijn achterbleven bij de overige locaties. Dit verschil is significant (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Bovendien zijn deze springstaarten na vier weken blootstelling grijs gekleurd in plaats van wit. Reproductie op deze locatie is vergelijkbaar met Eendenkooi 't Broek en de LUFA-grond. Reproductie op de gronden van de Blauwe Hel is significant hoger (ANOVA,  $p < 0,01$ ) dan voor de overige locaties (figuur 3).

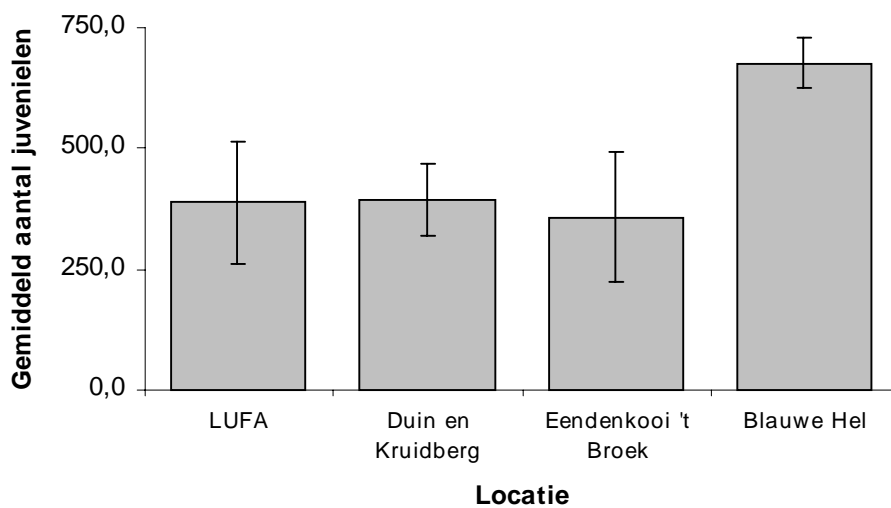
##### *Bioassays met sla*

Kieming na één week is met gemiddeld ( $\pm$ SD,  $n=5$ )  $8,0 \pm 1,4$  planten per pot het hoogste in de grond van Duin en Kruidberg. Op de gronden van de locaties Eendenkooi 't Broek en de Blauwe Hel zijn respectievelijk  $5,2 \pm 1,6$  en  $4,2 \pm 2,6$  (gemiddelde  $\pm$ SD) slaplanten ontkiemd. Bij het beëindigen van de test zijn optisch duidelijke verschillen waargenomen in de grootte van de planten van de verschillende locaties. De groei van de slaplanten was het grootst op de gronden van Eendenkooi 't Broek en het minst op de Blauwe Hel. De planten zagen er op alle locaties gezond uit; gele of bruine bladeren door voedselgebrek zijn niet waargenomen.

Figuur 4 geeft de drooggewichten van de slaplanten weer. De planten op de grond van de Blauwe Hel zijn in groei achtergebleven bij die op de locaties Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg. Deze twee locaties vertoonden een vergelijkbaar drooggewicht. Echter de spreiding in zowel het droog- als versgewicht is groot. Desondanks is het drooggewicht van de planten uit de Blauwe Hel significant kleiner (ANOVA,  $p=0,019$ ).



*Figuur 2. Gemiddeld eindgewicht van Folsomia candida na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van een controlegrond (LUFA), Duin en Kruidberg (zand), Eendenkooi 't Broek (klei) en de Blauwe Hel (veen). Foutbalken geven de standaarddeviatie weer (n=10).*



*Figuur 3. Gemiddelde reproductie van Folsomia candida na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van een controlegrond (LUFA), Duin en Kruidberg (zand), Eendenkooi 't Broek (klei) en de Blauwe Hel (veen). Foutbalken geven de standaarddeviatie weer (n=10).*



*Figuur 4. Gemiddeld drooggewicht van de slapplanten na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van Eendenkooi 't Broek (klei), Duin en Kruidberg (zand) en de Blauwe Hel (veen). Foutbalken geven de standaarddeviatie weer (n=25).*

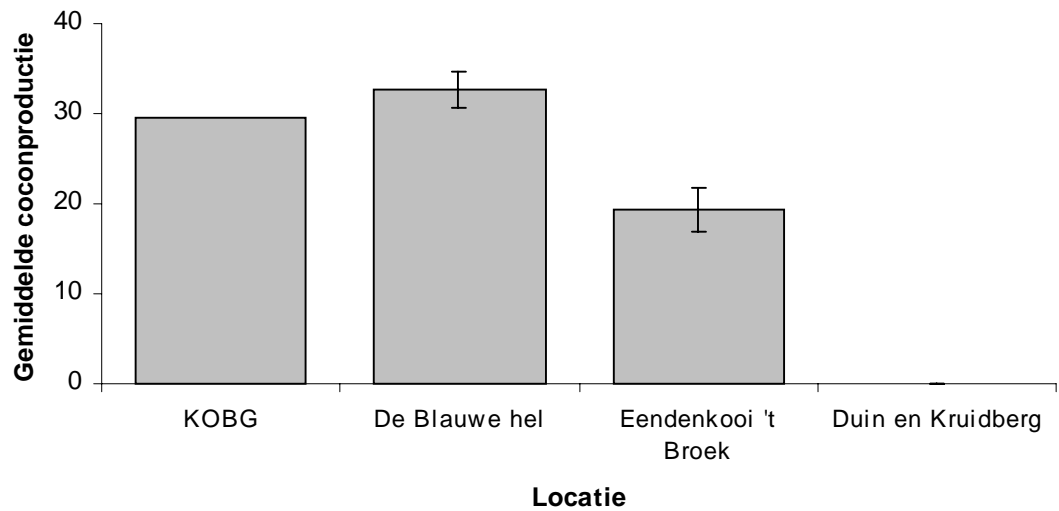
#### *Bioassay met de regenworm Lumbricus rubellus*

Sterfte in de KOBG-controlegrond is meer dan 10 procent, wat erop kan duiden dat de proefdieren in een niet-optimale conditie verkeerden. Dit is echter alleen geconstateerd in een van de zes replica's en kan daarom op toeval berusten. Gemiddeld zijn er 30 cocons in deze grond geproduceerd.

In de gronden van de locaties de Blauwe Hel en Eendenkooi 't Broek is een sterfte van circa 20 procent geconstateerd. In Duin en Kruidberg hebben minder wormen de test overleefd. De sterfte bedraagt hier 37 procent. Bovendien zijn er veel wormen aan de oppervlakte teruggevonden. Dit kan erop wijzen dat de zandige grond van Duin en Kruidberg geen aantrekkelijk medium voor de regenwormen is geweest.

De coconproductie is alleen bepaald in de potten waar alle wormen de test hebben overleefd. De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 5. De coconproductie is het hoogst bij de wormen die zijn blootgesteld aan de gronden van de Blauwe Hel. De wormen in deze grond hebben gemiddeld ( $\pm$ SD, n=3)  $33\pm 2,1$  cocons geproduceerd. In de grondmonsters zijn ook andere, kleinere cocons aangetroffen die vermoedelijk al in de grond aanwezig waren. Deze cocons zijn niet meegeteld. De coconproductie van de wormen in Eendenkooi 't Broek is gemiddeld ( $\pm$ SD, n=3)  $19\pm 2,5$  cocons. Dit is significant lager (T-test,  $p=0,002$ ) dan de coconproductie in de Blauwe Hel. De wormen in de grond van Duin en Kruidberg hebben geen cocons geproduceerd. De coconproductie in de controlegrond bedroeg 32 (n=2).





*Figuur 5. Gemiddelde reproductie van Lumbricus rubellus na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van een controlegrond (KOBG), de Blauwe Hel (veen), Eendenkooi 't Broek (klei) en Duin en Kruidberg (zand). Foutbalken geven de standaarddeviatie weer (n=3).*

De groei van de regenwormen is eveneens bepaald in de replica's waarin overleving maximaal was. De grootste groei is waargenomen in de gronden van de Blauwe Hel. Het gewicht van de regenwormen is met gemiddeld ( $\pm$ SD, n=3)  $911 \pm 172$  mg toegenomen. De regenwormen van Eendenkooi 't Broek zijn gemiddeld ( $\pm$ SD, n=3)  $280 \pm 418$  mg zwaarder geworden. Het verschil tussen deze twee is slechts marginaal (t-test,  $p=0,07$ ) ten gevolge van de grote spreiding in de gewichtstoename in Eendenkooi 't Broek. In de grond van Duin en Kruidberg was de groei minimaal (132 mg, n=1) en de groei op de controlegrond bedroeg 1279 mg (n=2).

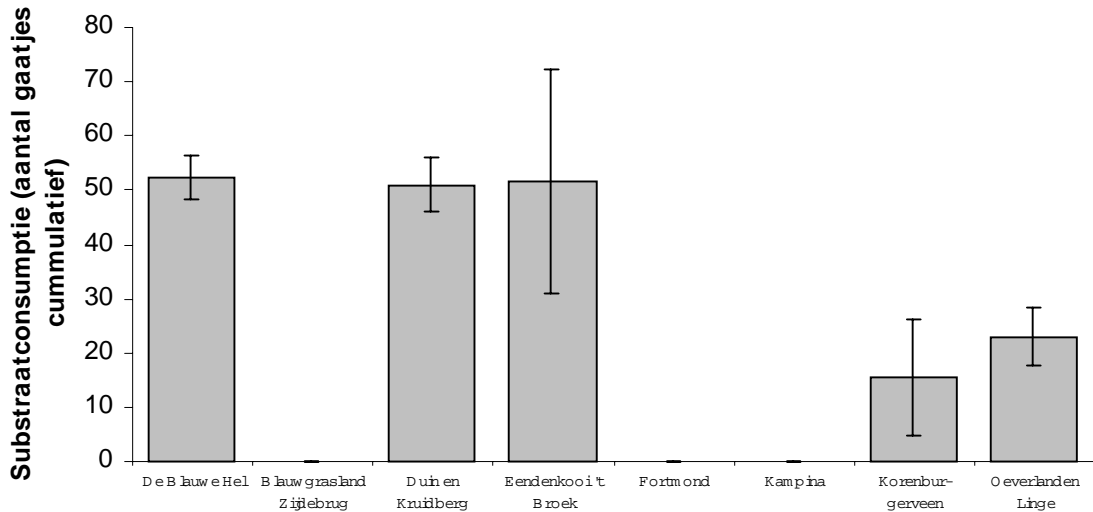
### **3.4.3 Microbiologische analyses en veldinventarisaties**

#### *Bait lamina-test*

De Bait lamina-test is uitgevoerd op alle onderzoekslocaties. Bij het beëindigen van de test zijn rondom enkele strips in de bodemonsters van de Blauwe Hel schimmels geconstateerd. In één strip (Eendenkooi 't Broek) is een larve, vermoedelijk van een kever, aangetroffen die zich waarschijnlijk heeft gevoed met het substraat. In zowel de strips met schimmels als met de larve was sprake van substraatconsumptie.

In figuur 6 zijn de resultaten weergegeven als de gemiddelde substraatconsumptie per pot. Uit deze figuur blijkt dat er grote verschillen aanwezig zijn tussen de verschillende locaties. In de zandgronden van Fortmond en Kampina en het kleiige veen van de Zijdebrug is geen substraatconsumptie geconstateerd. De substraatconsumptie op de locaties de Blauwe Hel, Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek is hoog en is onderling vergelijkbaar. De consumptie op de locaties Korenburgerveen en de Oeverlanden van de Linge is lager. De

spreiding tussen de replica's is zeer groot. Een enkele maal is geconstateerd dat substraatconsumptie in één pot vrijwel maximaal was, terwijl in de replica('s) geen substraat is geconsumeerd.

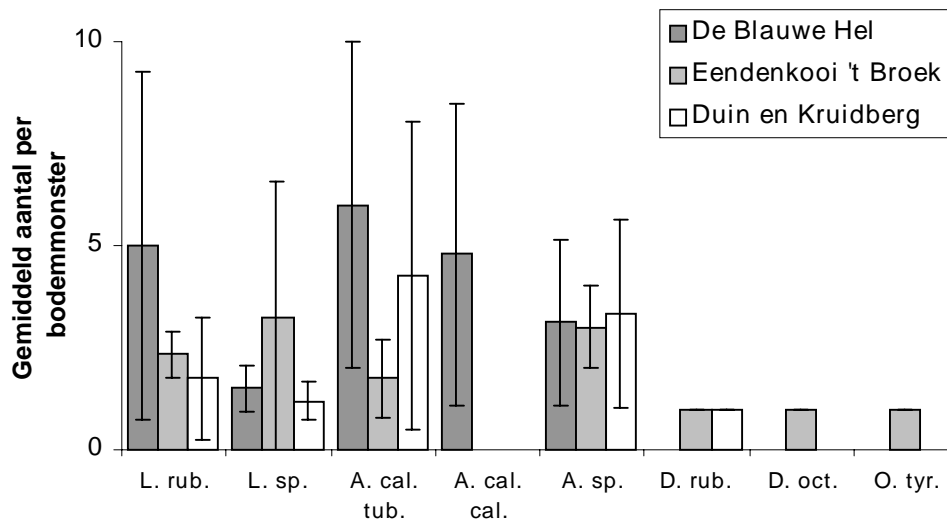


Figuur 6. Gemiddelde cumulatieve substraatconsumptie in de Bait lamina-test na vier weken blootstelling aan gronden afkomstig van de onderzoekslocaties. Foutbalken geven de standaarddeviatie weer.

#### Veldinventarisatie van regenwormen

In figuur 7 zijn de resultaten van de veldinventarisatie van regenwormen weergegeven. Alleen subadulte en adulte regenwormen kunnen op soort worden gedetermineerd. Dit is niet mogelijk bij juveniele wormen, omdat deze de specifieke kenmerken nog niet hebben ontwikkeld. Deze wormen worden dan ook met de aanduiding sp. (species) achter de geslachtsnaam in figuur 7 weergegeven. Tabel 8 geeft een overzicht van de biomassa en aantal regenwormen per m<sup>2</sup>, het percentage aangetroffen adulte regenwormen en het aantal soorten op de locaties de Blauwe Hel, Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg.

In de Blauwe Hel is een drietal regenwormensoorten aangetroffen, namelijk *Lumbricus rubellus*, *Aporrectodea caliginosa caliginosa* en *A. caliginosa tuberculata*. In de bodem van Eendenkooi 't Broek zijn daarnaast de soorten *Octolasion tyrtaeum*, *Dendrobaena rubida* en *D. octaedra* aangetroffen. *A. caliginosa caliginosa* is op deze locatie niet aangetroffen. Op de locatie Duin en Kruidberg is een drietal soorten aangetroffen, namelijk *L. rubellus*, *A. caliginosa tuberculata* en *D. rubida*. Het voorkomen van *L. rubellus* duidt er waarschijnlijk op dat deze populatie is aangepast aan de omstandigheden. In de bioassays met deze soort op deze locatie is namelijk een grote sterfte en geringe reproductie geconstateerd.



Figuur 7. Gemiddeld aantal regenwormen per genomen monster van 0,25 m<sup>2</sup> op een drietal Edelmanlocaties. Foutbalken geven de standaarddeviatie weer (n=8). *L. rub.* = *Lumbricus rubellus*, *L. sp.* = *Lumbricus* species, *A. cal. tub.* = *Aporrectodea caliginosa tuberculata*, *A. cal. cal.* = *Aporrectodea caliginosa caliginosa*, *A. sp.* = *Aporrectodea* species, *D. rub.* = *Dendrobaena rubida*, *D. oct.* = *Dendrobaena octaedra*, *O. tyr.* = *Octolasion tyrtaeum*.

Op alle drie de locaties zijn de soorten *Lumbricus rubellus* en *A. caliginosa tuberculata* dominant aanwezig. De regenwormensoorten *D. rubida*, *D. octaedra* en *O. tyrtaeum* zijn niet in de Blauwe Hel aangetroffen. Omdat deze soorten op de overige locaties relatief zeldzaam zijn, kan niet worden uitgesloten dat deze soorten niet in de Blauwe Hel zullen voorkomen.

Tabel 8. Biomassa en aantal regenwormen per m<sup>2</sup> (gemiddelde±SD, n=8), percentage adulte regenwormen en aantal aangetroffen regenwormensoorten op de onderzochte locaties.

locatie	grondsoort	biomassa (g m <sup>-2</sup> )	aantal m <sup>-2</sup>	percentage adulte regenwormen	aantal soorten
De Blauwe Hel	veen	26,5 ± 15,1	60,0 ± 25,2	55,8	3
Eendenkooi 't Broek	klei	6,6 ± 5,1	19,6 ± 14,4	28,2	5
Duin en Kruidberg	zand	8,9 ± 6,7	20,4 ± 20,4	31,7	3

De grootste biomassa van regenwormen is aangetroffen in de Blauwe Hel. Deze is significant hoger dan op de overige twee locaties (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Tussen de locaties Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg zijn de verschillen niet significant. In de Blauwe Hel zijn eveneens de grootste aantallen regenwormen aangetroffen. Dit aantal is significant hoger dan op de overige twee locaties (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

De hoge waarden voor het aantal en de biomassa aan regenwormen op de Blauwe Hel kunnen zijn veroorzaakt door het hoge percentage adulte regenwormen. Dit suggereert dat de populatiegroeisnelheid op deze locatie hoger is dan op de overige locaties.

#### *Biomassa en groeisnelheid bacteriën*

De bacteriële biomassa (per gram droge stof) is hoog in de Blauwe Hel ( $1200 \mu\text{g C g}^{-1}$ ) en laag in Duin en Kruidberg ( $10 \mu\text{g C g}^{-1}$ ) (Tabel 9). Dit is ook terug te vinden in de resultaten van de groeisnelheid. De inbouw van thymidine is eveneens hoog in de Blauwe Hel ( $350 \text{ picomol g}^{-1} \text{ uur}^{-1}$ ) en laag in Duin en Kruidberg ( $0,5 \text{ picomol g}^{-1} \text{ uur}^{-1}$ ). De leucine-inbouw van  $6800 \text{ picomol g}^{-1} \text{ uur}^{-1}$  in de Blauwe Hel is hoog in vergelijking tot de overige locaties.

Met name in de kleigrond van Eendenkooi 't Broek is de spreiding tussen de 3 replica's (van 3 verschillende plots) hoog (tabel 9), wat wijst op een grote ruimtelijke variatie in het veld. De grote spreiding in Duin en Kruidberg kan een gevolg zijn van de lage waarden die dicht tegen de detectiegrens aanzitten.

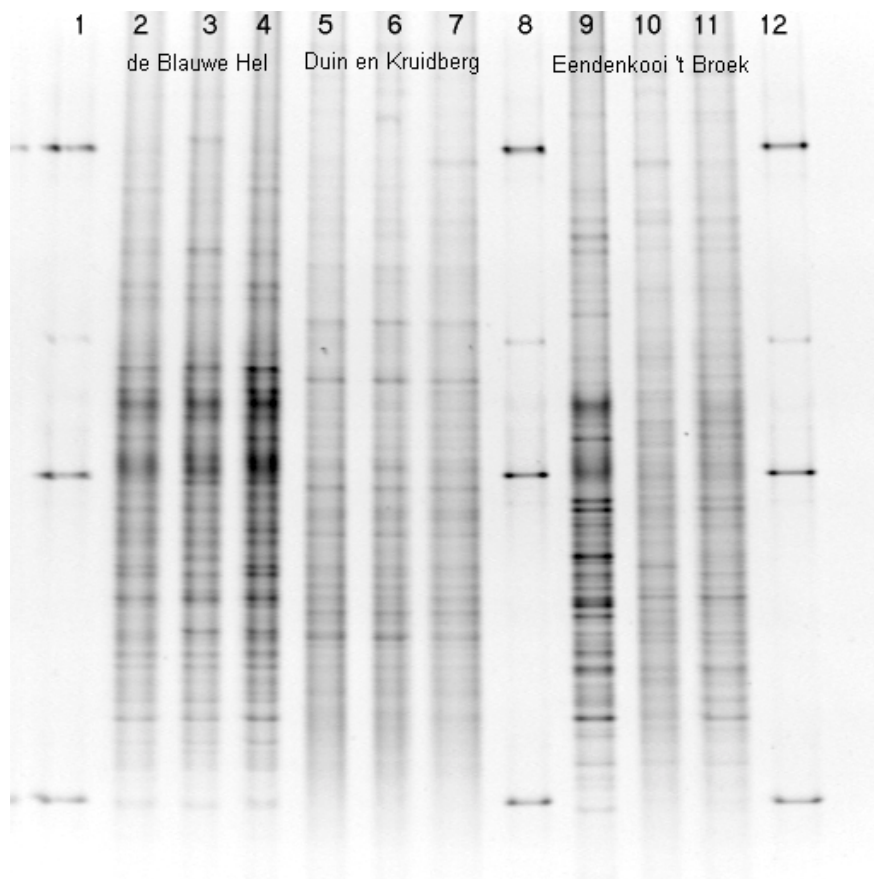
*Tabel 9. Bacteriële biomassa, DNA-synthese (thymidine-inbouw), eiwitsynthese (leucine-inbouw) en genetische diversiteit (aantal DNA-banden) op de onderzochte locaties. Waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardfout.*

locatie	grondsoort	bacteriën ( $\mu\text{g C g}^{-1}$ )	thymidine-inbouw ( $\text{pmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	leucine-inbouw ( $\text{pmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	aantal DNA banden
Eendenkooi 't Broek	klei	48,1 $\pm$ 37,6	34,8 $\pm$ 10,1	331,3 $\pm$ 15,9	55,3 $\pm$ 2,0
de Blauwe Hel	veen	1229 $\pm$ 172	352 $\pm$ 76,5	6782 $\pm$ 2010	53,0 $\pm$ 0,6
Duin en Kruidberg	zand	10,6 $\pm$ 7,2	0,5 $\pm$ 6,0	84,6 $\pm$ 92,9	52,3 $\pm$ 2,7

De genetische diversiteit van de bacteriegemeenschap is op alle drie de locaties hoog met 52 tot 55 DNA-banden (genotypen) (tabel 9). De DNA-profielen verschillen per locatie (figuur 8), terwijl de verschillen tussen de replica's erg klein zijn. Wel is duidelijk dat één monster van Eendenkooi 't Broek duidelijk afwijkt van de andere twee (ruimtelijke variatie).

#### *Functionele groepen nematoden*

In bijlage XIV is het aantal nematoden gegeven per 100 g veldvochtige grond zoals dat in het veld is bepaald. Het aantal nematoden in 100 g veldvochtige grond is laag in de Blauwe Hel (circa 200 per 100 g grond). Hierdoor is het in een aantal gevallen niet mogelijk om de spreiding te bepalen.



*Figuur 8. DNA-profielen van de bacteriën (in drievoud) op de onderzochte locaties. Het aantal banden is een afspiegeling van het aantal genotypen (“soorten”), en de intensiteit van een band is een maat voor de relatieve abundantie van de betreffende groep.*

Tabel 10 geeft het aantal nematoden weer per 100 g droge grond. Door omrekening naar droge grond ligt het aantal nematoden in de Blauwe Hel in de range van niet antropogeen belaste bodems. De nematoden zijn het talrijkst in de kleigrond van Eendenkooi 't Broek.

*Tabel 10. Totale aantal nematoden en het aantal in verschillende functionele groepen op de onderzochte locaties per 100 g droge grond. Waarden zijn de gemiddelden  $\pm$  standaardfout ( $n=3$ ).*

locatie	grond-soort	aantal nematoden				
		totaal	bacterivoren	fungivoren	herbivoren	omnivoren/ predatoren
Eendenkooi 't Broek	klei	9417 $\pm$ 1048	2016 $\pm$ 548	493 $\pm$ 38	6015 $\pm$ 1843	890 $\pm$ 322
de Blauwe Hel	veen	3886 $\pm$ 466	1730 $\pm$ nb	337 $\pm$ nb.	1774 $\pm$ nb.	29 $\pm$ nb.
Duin en Kruidberg	zand	2368 $\pm$ 439	1703 $\pm$ 465	61 $\pm$ 2	501 $\pm$ 47	99 $\pm$ 38

NB: niet bepaald

In Duin en Kruidberg vormen bacterivore nematoden het grootste gedeelte van de totale populatie, terwijl in Eendenkooi 't Broek het aandeel herbivoren het grootst is. In de

Blauwe Hel wordt de populatie gedomineerd door zowel herbivore als bacterivore nematoden. Fungivoren en omnivoren/predatoren zijn minimaal vertegenwoordigd.

Tabel 11. Gemiddelde taxonomische verdeling (%) per 100 g veldvochtige grond. Getallen tussen haakjes geven de absolute aantallen weer.

taxa (familie/geslacht)	de Blauwe Hel	Duin en Kruidberg	Eendenkooi 't Broek
<b>grondsoort</b>	veen	zand	klei
<b>bacterivoren</b>			
<i>Rhabditis</i>	4,8 (11)	35,8 (641)	8,8 (445)
Cephalobidae		13,8 (247)	8,0 (406)
<i>Plectus</i>	17,7 (41)	1,3 (24)	2,4 (121)
<i>Anaplectus</i>			1,4 (69)
<i>Prismatolaimus</i>	0,9 (2)	3,9 (70)	0,7 (33)
<i>Monhystera</i>	19,0 (44)	3,8 (68)	0,2 (8)
<i>Wilsonema</i>		5,8 (103)	
<i>Metateratocephalus</i>		4,9 (87)	
<i>Teratocephalus</i>	3,9 (9)	2,2 (39)	
<i>Panagrolaimus</i>	3,9 (9)	0,1 (2)	
<i>Diplogaster</i>	0,9 (2)	0,3 (5)	
<b>totaal bacterivoren</b>	<b>51,1 (118)</b>	<b>71,9 (1286)</b>	<b>21,4 (1082)</b>
<b>fungivoren</b>			
<i>Aphelenchus</i>		0,6 (11)	0,9 (44)
<i>Aphelenchoides</i>		2,0 (36)	4,2 (210)
<i>Psilenchus</i>			0,2 (11)
<b>totaal fungivoren</b>		<b>2,6 (47)</b>	<b>5,2 (265)</b>
<b>herbivoren</b>			
<i>Paratylenchus</i>	1,7 (4)	0,4 (8)	7,5 (379)
<i>Pratylenchus</i>	2,2 (5)	0,2 (3)	6,9 (349)
<i>Tylenchorhynchus</i>	0,9 (2)	5,5 (98)	1,9 (96)
<i>Rotylenchus</i>	0,9 (2)	2,5 (45)	0,6 (28)
<i>Heterodera/Meloidogyne</i>		0,2 (3)	
<i>Criconemoides</i>		0,7 (12)	
<i>Criconema</i>		0,1 (2)	
Tylenchidae	42,4 (98)	11,7 (210)	47,1 (2382)
<b>totaal herbivoren</b>	<b>48,1 (111)</b>	<b>21,3 (381)</b>	<b>63,9 (3284)</b>
<b>omnivoren en predatoren</b>			
<i>Dorylaimus</i>	0,9 (2)	3,3 (59)	2,9 (149)
<i>Prodorylaimus</i>			5,9 (296)
<i>Diphtherophora</i>		0,3 (5)	0,7 (33)
<i>Mononchus</i>		0,2 (3)	
<i>Choanolaimus</i>		0,4 (8)	
<b>totaal omnivoren en predatoren</b>	<b>0,9 (2)</b>	<b>4,2 (75)</b>	<b>9,4 (5059)</b>
<b>totaal</b>	<b>100 (231)</b>	<b>100 (1789)</b>	<b>100 (5059)</b>

Tabel 11 geeft het percentage van de verschillende soorten nematoden weer. Taxa die op familie-niveau worden gepresenteerd, zoals Cephalobidae en Tylenchidae, omvatten meerdere geslachten en soorten. Van de familie Cephalobidae zijn bijvoorbeeld de geslachten *Acrobeles*, *Heterocephalobus*, *Cephalobus* en *Acrobeloides* waargenomen. Van het geslacht *Acrobeloides* zijn zowel *A. bütschlii* als *A. tricornis* waargenomen. Ook de geslachten *Teratocephalus*, *Monhystera*, *Dorylaimus* et cetera zijn met meerdere soorten vertegenwoordigd.

In de Blauwe Hel is het procentuele aandeel van *Monhystera* sp. groot in vergelijking tot de overige locaties. In Duin en Kruidberg is daarentegen het aandeel aan *Rhabditis* sp. groter en het aandeel van de familie Tylenchidae kleiner. Opvallende bewoners in Duin en Kruidberg zijn de mariene/brakwatersoort *Choanolaimus papillatus* en juvenielen van de plantparasitaire *Heterodera/Meloidogyne*.

## 4. Discussie

### 4.1 Achtergrondgehalten

#### 4.1.1 Geschiktheid als referentielocaties

Op basis van de resultaten van de chemische analyses kan worden gesteld dat op de onderzochte Edelmanlocaties de streefwaarden over het algemeen niet worden overschreden. Alleen op enkele locaties is sprake van een lichte overschrijding voor enkele metalen en EOX. Door Edelman (1984) zijn op een aantal van de onderzochte locaties eveneens lichte overschrijdingen van de streefwaarden gemeten. De onderzochte locaties voldoen dus aan de eisen die aan referentiegronden worden gesteld, namelijk niet (noemenswaardig) antropogeen belast met verontreinigingen.

#### 4.1.2 Zware metalen

##### *Extractiemethoden*

Op diverse Edelmanlocaties zijn in het verleden de gehalten aan zware metalen in de bovenste 10 cm van de minerale bodem bepaald (Edelman, 1984; Ma *et al.*, 1992; Van Gestel *et al.*, 1992). Doordat door de verschillende onderzoekers verschillende extractie- en analysemethoden zijn gebruikt, is het niet mogelijk om alle resultaten met elkaar te vergelijken.

Edelman (1984) heeft voornamelijk gebruik gemaakt van Neutronenactiviteitsanalyses (NAA). Daarnaast zijn enkele metalen geëxtraheerd middels koken in salpeterzuur (Al<sup>4</sup>, Ca, Cu, Fe en Mg) of koken in zoutzuur (Cd, Ni en Pb). Ma *et al.* (1992) hebben een zestal metalen (Cd, Cu, Pb, Zn, Hg en Ni) gemeten met een extractie in kokend zoutzuur. In het onderzoek van Van Gestel *et al.* (1992) is evenals in het onderhavige onderzoek gebruikt gemaakt van extractie met koningswater (mengsel van salpeter- en zoutzuur), waarbij het monster in luchtdicht afgesloten vaatjes is verhit met microgolven (magnetron). In bijlage XV zijn de resultaten van de verschillende auteurs met de bijbehorende extractietechnieken opgenomen.

NAA is een totaal-analyse, waarbij ook de metalen in het kristalrooster worden gemeten. Door Edelman (1984) is aangetoond dat NAA leidt tot hogere gehalten aan aluminium, ijzer en magnesium in vergelijking tot ontsluiting met kokend salpeterzuur. Op basis van de resultaten van het onderhavige onderzoek bestaat het vermoeden dat dit ook opgaat voor de metalen chroom, kalium en natrium, waarbij wordt verondersteld dat tussen de twee onderzoeken geen noemenswaardige veranderingen van de bodemkwaliteit zijn opgetreden. Ma *et al.* (1992) constateerden dat voor zink NAA en ontsluiting met kokend zoutzuur leiden tot vergelijkbare resultaten, zodat de resultaten van Edelman (1984) en van dit project voor zink kunnen worden vergeleken.

Ontsluiting met een mengsel van zuren is geen totaal-analyse, omdat het kristalrooster met de daarin aanwezige metalen niet wordt gedestruëerd (Van Gestel *et al.*, 1992) en zal daarom tot lagere waarden leiden dan NAA. Omdat zware metalen in het kristalrooster

<sup>4</sup> De gehalten aan aluminium, ijzer en magnesium zijn door Edelman (1984) eveneens bepaald met behulp van NAA.



alleen vrij komen bij het oplossen van mineralen, een van nature zeer langzaam proces, geeft een ontsluiting met zuur een beter, maar geen volledig beeld van de potentieel beschikbare metaalfractie. De potentiële beschikbaarheid kan bepaald worden met bijvoorbeeld een milde zuurextractie zoals 0,43 M salpeterzuur of een complexerend reagens zoals EDTA (Otte *et al.*, 2000).

Hoewel het principe van ontsluiting met koningswater vergelijkbaar is met koken in zout- of salpeterzuur, lijkt de efficiëntie van ontsluiting afhankelijk te zijn van bodemeigenschappen. Vergelijking van de resultaten van het onderhavige onderzoek met de resultaten van Edelman (1984) en Ma *et al.* (1992) is daarom niet zonder meer mogelijk. Wel kunnen de resultaten van het onderzoek worden vergeleken met het onderzoek van Van Gestel *et al.* (1992).

#### *Vergelijking met voorgaande onderzoeken*

In het algemeen zijn sinds de voorgaande onderzoeken de gehalten aan zware metalen onveranderd. Alleen op de Blauwe Hel en het blauwgrasland nabij de Zijdebrug zijn enkele gehalten aan zware metalen toegenomen met een factor 2 à 3 (respectievelijk zink en lood) sinds het onderzoek van Edelman (1984). In het Korenburgerveen zijn hogere gehalten gemeten aan cadmium, lood en zink (factor 2 à 3) in vergelijking tot voortgaand onderzoek (Van Gestel *et al.*, 1992). Voortgaande atmosferische depositie kan een oorzaak zijn van de waargenomen verhoging, maar ook methodische verschillen en bodemvariabiliteit. Het toegenomen gehalte aan lood in het blauwgrasland nabij de Zijdebrug kan mogelijk worden gerelateerd aan het gemotoriseerd verkeer langs het gebied.

#### **4.1.3 Organische verbindingen**

Door Edelman (1984) zijn de locaties uitgebreid onderzocht op de aanwezigheid van organische verontreinigingen, waaronder chloorbenzenen, hexachloorhexanen, chloorfenolen, DDE en DDT. Tevens is het EOCl-gehalte bepaald, een bepaling waarbij het gemeten chloorgehalte indicatief is voor een groot aantal gechlorideerde organische verbindingen. In de onderhavige studie is alleen het EOX-gehalte gemeten, wat een indicatie vormt voor een aantal gehalogeneerde organische verbindingen (chloorbenzenen, chloorfenolen, OCB, PCB en enkele vluchtige gehalogeneerde koolwaterstoffen).

Over het algemeen is er een duidelijke relatie zichtbaar tussen de EOX-gehalten in het onderhavige onderzoek en de EOCl-gehalten in het onderzoek van Edelman (1984). In beide onderzoeken zijn de gehalten in Duin en Kruidberg het laagste, in de Blauwe Hel het hoogst. Op de locatie Duin en Kruidberg is geen EOX gevonden (tabel 6). Zowel EOX als EOCl hangt vaak samen met de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen. De locatie Duin en Kruidberg ligt niet in de directe omgeving van landbouwgronden. De locatie wordt omsloten door de Noordzee aan de westzijde en enkele kilometers duinlandschap aan de overige zijden. De overige locaties grenzen aan of liggen in de directe omgeving van landbouwgronden, wat de gemeten gehalten aan EOX kan verklaren.

#### 4.1.4 Relaties tussen zware metalen en bodemeigenschappen

Er zijn relaties te leggen tussen de gehalten aan zware metalen en bodemeigenschappen, in het bijzonder met lutum en organische stof. Een duidelijke relatie is te vinden tussen aluminium en lutum, omdat aluminium een belangrijk bestanddeel is van klei. De gemeten gehalten op Eendenkooi 't Broek zijn daardoor hoger dan op de locaties Duin en Kruidberg en de Blauwe Hel. Deze relatie is eveneens op te maken uit de resultaten van Edelman (1984) en Van Gestel *et al.* (1992). Ook kobalt vertoont een relatie met het lutumgehalte, wat correspondeert met de resultaten van andere onderzoeken (Edelman, 1982; Van Gestel *et al.*, 1992).

Door Edelman (1984) zijn met uitzondering van cadmium, kwik en natrium, significante lineaire relaties gevonden tussen het lutumgehalte en vrijwel alle metalen. Van Gestel *et al.* (1992) hebben met uitzondering van cadmium en kwik vergelijkbare relaties gevonden. In dit onderzoek zijn duidelijke lineaire relaties aangetoond tussen het lutumgehalte en de metalen chroom ( $r^2=0,9558$ ) en nikkel ( $r^2=0,8572$ ). Het aantal bemonsterde locaties is met 8 overigens veel lager dan in het onderzoek van Edelman (1984) ( $27 > n > 40$ ) en van Van Gestel *et al.* (1992) ( $n=19$ ).

Tussen het gehalte aan zware metalen en het percentage organische stof zijn duidelijke significante relaties gevonden voor arseen, cadmium, natrium en lood en in mindere mate voor kwik en zink (Edelman, 1984). Door Van Gestel *et al.* (1992) zijn significante relaties gevonden voor organische stof met cadmium, kwik en lood. In dit onderzoek zijn relaties tussen zware metalen en organisch stof niet aangetoond, waarschijnlijk door het lage aantal monsters. Wel zijn in één vak op Eendenkooi 't Broek de gehalten aan cadmium en lood hoger dan in de beide andere vakken (tabel 7). Het betreffende vak is humusrijker dan de beide andere.

Voor de locaties waar het ijzergehalte is gemeten, is een duidelijke positieve correlatie zichtbaar tussen ijzer en arseen. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Edelman (1984). Dit kan verklaard worden doordat ijzer met het aanwezige arseen een complex vormt.

#### 4.1.5 Ruimtelijke verdeling van chemische stoffen over de locatie

In de Blauwe Hel zijn zware metalen en EOX inhomogeen over de locatie verdeeld (tabel 7). Een verklaring kan zijn dat ten gevolge van het hoge percentage organische stof zware metalen en EOX hecht aan het veen zijn gebonden en daardoor niet via het poriewater diffunderen. Door Edelman (1984) is in gebieden met hoge percentages organisch materiaal (>50%), waaronder de Blauwe Hel en het Korenburgerveen, eveneens een inhomogene verdeling van zware metalen over de locatie gemeten. Ook op de locatie Eendenkooi 't Broek zijn in het meest humusrijkste vak de gehalten aan zware metalen hoger dan in de overige vakken. Dit kan verklaard worden met de eerder besproken positieve correlatie tussen het organisch stofgehalte en de gehalten aan zware metalen (Edelman, 1984; Van Gestel, 1992, zie ook paragraaf 0). In Duin en Kruidberg zijn metalen homogeen over het gebied verdeeld.

## 4.2 Bodemsamenstelling in relatie tot resultaten van ecotesten

### 4.2.1 Acute bioassays

#### *Microtox-test*

In dit onderzoek is naar voren gekomen dat bodemeigenschappen geen invloed hebben op de bioluminescentie. De resultaten zijn vergelijkbaar met het eerder genoemde NOBIS-project. Ook hier is met de Microtox-test op schone gronden met verschillende bodemsamenstelling geen negatief effect waargenomen (NOBIS, 2000).

Andere onderzoekers hebben daarentegen wel effecten waargenomen die zijn veroorzaakt door bodemeigenschappen. Ringwoord *et al.* (1997) hebben met de Microtox-test op extracten van sediment een afname van de bioluminescentie aangetoond bij toenemende percentages aan silt. Door Van Gestel *et al.* (1992) is het poriewater afkomstig van een groot aantal Edelmanlocaties beoordeeld met de Microtox-test. In dit onderzoek zijn duidelijke verschillen gevonden tussen locaties die varieerden tussen een afname van de bioluminescentie met 30% tot een toename met enkele procenten ten opzichte van het verdunningsmedium. Op de locaties Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg is door Van Gestel *et al.* (1992) een lichte afname (tot 7%) gevonden en op de locatie Korenburgerveen een lichte toename (8%). Een relatie met de pH en de geleidbaarheid van het poriewater kon niet worden aangetoond. De extracten van de genoemde onderzoeken zijn in tegenstelling tot het onderhavige onderzoek en het NOBIS-onderzoek (NOBIS, 2000) niet gefiltreerd, zodat verschillen mogelijk kunnen worden verklaard door adsorptie van bacteriën aan bodemdeeltjes.

### 4.2.2 Chronische bioassays

#### *Bioassays met de springstaart Folsomia candida*

Reproductie van *Folsomia candida* is op de veengrond van de Blauwe Hel hoger dan op de zandgrond van Duin en Kruidberg en de kleigrond van Eendenkooi 't Broek (figuur 3). Dit lijkt niet te zijn veroorzaakt door verschillen in de zuurgraad of het vochtgehalte, waarvan het bekend is dat beide invloed hebben op het functioneren van *Folsomia candida*. Reproductie van *Folsomia candida* neemt af bij afnemende pH (Sandifer en Hopkin, 1996). Door Crommentuijn *et al.* (1997) is daarentegen een afname van de reproductie geconstateerd bij toenemende pH. *Folsomia candida* prefereert een pH van circa 6 (Crommentuijn *et al.*, 1997). De locaties de Blauwe Hel en Eendenkooi 't Broek hebben een vergelijkbare pH (circa 5,5), de pH van Duin en Kruidberg is 7,0. Tussen de locaties Eendenkooi 't Broek en Duin en Kruidberg zijn geen verschillen gevonden in reproductie. Toenemende vochtgehalten leiden tot een toename van de reproductie van *Folsomia candida* (Van Gestel en Van Diepen, 1997). De bioassay met de springstaart *Folsomia candida* is echter uitgevoerd bij een voorgeschreven vochtgehalten van 40% WHC. De bodems van de drie onderzochte Edelmanlocaties zijn conform het voorschrift bevochtigd, zodat kan worden aangenomen dat de beschikbaarheid van vocht in alle gronden vergelijkbaar is. Verschillen kunnen dan ook niet worden verklaard door verschillen in vochtgehalten. Het valt zelfs te verwachten dat de beschikbaarheid van vocht op de locatie

de Blauwe Hel lager zal zijn dan op de overige locaties en daardoor zou kunnen leiden tot een verminderde reproductie. Dit is echter niet het geval.

Een mogelijke oorzaak is het verschil in gehalte aan organisch stof. De Blauwe Hel is, in tegenstelling tot de overige twee onderzochte locaties, een veengrond (organisch stofgehalte 88%). Door Crommentuijn *et al.* (1997) is aangetoond dat bij toenemende percentages organisch materiaal de reproductie van *Folsomia candida* toeneemt. *Folsomia candida* bevolkt strooisellagen en de bovenste centimeters van de daaronder liggende minerale bodem. De veengrond van de Blauwe Hel lijkt dan ook optimaler dan de humusarme zandgrond of de kleigrond van respectievelijk Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek, zodat de springstaarten vermoedelijk de beschikking hebben gehad over een additionele voedselbron.

In de literatuur is een grote spreiding te vinden in de resultaten van bioassays met *Folsomia candida*, zelfs bij verschillende testen op dezelfde grond. Smit en Van Gestel (1996) rapporteerden in humusarme zandgronden aantallen juvenielen die vergelijkbaar zijn met de Blauwe Hel. Reproductie op LUFA-grond was in hun onderzoek circa een factor 2 hoger dan de in het onderhavige project geteste LUFA-grond. Op OECD-kunstgrond (10% organisch materiaal en 20% lutum) zijn aantallen juvenielen van meer dan 1000 gerapporteerd (Crommentuijn *et al.*, 1993). De grote verschillen kunnen mogelijk zijn veroorzaakt doordat in de diverse testen verschillende populaties zijn gebruikt of door de conditie van de testorganismen op het moment van de test.

#### *Bioassays met sla (Lactuca sativa)*

Groei van slaplanten hangt af van de bodemsamenstelling. Op de veengrond van de Blauwe Hel is de groei lager dan op de locaties Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek (figuur 4). In vergelijking tot de overige locaties hebben de slaplanten op de Blauwe Hel een verhoogde droog:versgewichtverhouding. Dit houdt in dat het percentage vocht in de slaplanten lager is dan in de slaplanten van de overige locaties, wat een aanwijzing kan zijn voor stress ten gevolge van bodemeigenschappen.

Groei van slaplanten op onbelaste gronden blijkt sterk van de zuurgraad af te hangen. Bij een pH van 3,5 of minder is niet tot nauwelijks sprake van kieming en/of groei (Van Gestel *et al.*, 1992). De pH van de grond afkomstig van de Blauwe Hel bedraagt 5,5, zodat een verminderde groei niet lijkt te kunnen worden verklaard door een niet optimale pH. Verschil in groei kan ook niet worden verklaard door een tekort aan voedingsstoffen, aangezien vrijwel dagelijks nieuwe nutriënten werden toegevoegd en aan de planten geen symptomen te zien waren die duiden op een tekort aan voedingsstoffen, zoals gele bladeren. Een verklaring kan zijn dat door het hoge percentage vocht van de bodem het wortelstelsel onvoldoende is ontwikkeld als gevolg van anaërobie.

Door Van Gestel *et al.* (1992) is eveneens een grote variatie waargenomen tussen groei van slaplanten op een groot aantal Edelmanlocaties. De verhoudingen droog:versgewicht liepen toen uiteen van 0,05 tot 0,30. De verhoudingen op de locaties Duin en Kruidberg en

Eendenkooi 't Broek (Waardenburg) zijn lager dan de resultaten van dit onderzoek. In de verschillende onderzoeken zijn echter verschillende rassen gebruikt.

#### *Bioassays met de regenworm Lumbricus rubellus*

Tussen de verschillende locaties zijn grote verschillen waarneembaar in de overleving, groei en reproductie van *Lumbricus rubellus*. Op de rijk organische grond van de Blauwe Hel leveren de regenwormen de beste prestaties (figuur 5). Door Kamerman en Van Gestel (1991) is geconstateerd dat toevoeging van mest leidt tot een verhoogde coconproductie van *Eisenia fetida*. Op organisch bemeste landbouwgronden komen meer regenwormen voor dan op niet-bemeste gronden (Ma, 1982). De hoge prestatie van regenwormen op de Blauwe Hel kan dus worden verklaard door het hoge percentage organisch materiaal.

De prestatie van regenwormen op de zandgronden van Duin en Kruidberg is minder dan op de overige twee locaties. Sterfte op deze grond is hoog en groei en coconproductie minimaal. Bovendien zijn aan de oppervlakte regenwormen waargenomen, wat duidt op vluchtgedrag. Verondersteld kan worden dat de grond van Duin en Kruidberg geen aantrekkelijk medium is voor *Lumbricus rubellus*, ondanks het feit dat deze worm zandgronden preferereert boven kleigronden vanwege de losse structuur (Ma, 1982). De minimale presentatie in grond van Duin en Kruidberg kan mogelijk worden verklaard door een hoge pH (>7), maar wellicht moet eerder worden gedacht aan het schadelijk en afstotend effect van scherp zand dat in deze grond voorkomt.

#### **4.2.3 Microbiologische analyses en veldinventarisaties**

##### *Bait lamina-test*

De verschillende locaties vertonen grote verschillen in substraatconsumptie, ook tussen locaties die qua vochtgehalte, organisch stofgehalte en textuur met elkaar overeenkomen, zoals de locaties Duin en Kruidberg en Fortmond (zand) en Eendenkooi 't Broek en de Oeverlanden van de Linge (klei) (tabel 1, figuur 6). In tegenstelling tot bioassays worden geen testorganismen aan het bodemmonster toegevoegd, maar meet de Bait lamina-test de activiteit van de aanwezige bodemlevensgemeenschap die wordt bepaald door soortensamenstelling en dichtheden van bodemorganismen. Niet alleen bodemsamenstelling heeft invloed op de soortensamenstelling en dichtheden, maar ook factoren als vochtgehalte en temperatuur van de bodem, natuurlijke of antropogene verstoring, weersomstandigheden en dergelijke. Verschillen in substraatconsumptie tussen de locaties zijn daarom veroorzaakt door verschillen in de soortensamenstelling en dichtheden aan de bodemorganismen.

Op grond van de resultaten van de bacteriële biomassa en de groeisnelheid van de bacteriën, die toenemen bij toenemend percentage organisch materiaal (paragraaf 3.4.3), valt te verwachten dat de substraatconsumptie op de veengrond van de Blauwe Hel hoger zal zijn dan op de zandgrond van Duin en Kruidberg. Dit is echter niet het geval. Door Helling *et al.* (1998) is aangetoond dat ook macrofauna (springstaarten en enchytreën) zich voeden met het substraat van de Bait lamina-strips. De bodemmonsters zijn niet ontdaan van macrofauna, zodat substraatconsumptie door deze organismen waarschijnlijk is. Tijdens de controle van de strips is een enkele keer macrofauna aangetroffen, waaronder een (kever)larve die zich door de strip heeft gegeten. De aanwezigheid van macrofauna kan

eveneens de grote variatie tussen de verschillende replica's verklaren, omdat de kans dat deze in alle potten met dezelfde dichtheden aanwezig zijn klein is.

Tussen de zuurgraad en de substraatconsumptie lijkt een lineaire relatie waarneembaar te zijn ( $r^2=0,7095$ ). Op de locaties Kampina, Fortmond en het blauwgrasland nabij de Zijdebrug is geen substraatconsumptie waargenomen. De pH van deze locaties varieert tussen 3,2 en 4,5. Substraatconsumptie is hoog op de locaties met een pH tussen 5,5 en 6,8. Dit verband kan worden verklaard doordat in zure milieus in de regel minder bodemfauna aanwezig is.

Vooralsnog ontbreken standaardtestvoorschriften voor de Bait lamina-test. Voor in-situ metingen zijn aanbevelingen gedaan (Kratz, 1998), voor laboratoriumgebruik ontbreken deze geheel. In voorgaand onderzoek is de Bait lamina-test uitgevoerd in combinatie met een bioassay met de regenworm *Eisenia andrei*, waarbij de grond is bevochtigd tot 50% van de Water Holding Capacity (NOBIS, 2000). Voor dit project zijn, om de microbiologische processen in de grond niet te beïnvloeden en zoveel mogelijk de veldsituatie te benaderen, de gronden niet op een vergelijkbaar vochtgehalte gebracht.

#### *Veldinventarisatie van regenwormen*

Op de locaties de Blauwe Hel en Duin en Kruidberg komen regenwormen van het geslacht *Aporrectodea* het meest voor, op de locatie Eendenkooi 't Broek is het voorkomen van *Aporrectodea sp.* vergelijkbaar met *Lumbricus sp.* (figuur 7). Dit is in overeenstemming met de resultaten van Ma (1982), waar *Aporrectodea sp.* het hoogste voorkomen heeft in landbouwgebieden. Het voorkomen van *Lumbricus rubellus* is het hoogst in de Blauwe Hel. *Lumbricus rubellus* komt van nature voor in een rijk organische omgeving zoals strooisellagen. Door Ma (1982) is aangetoond dat het verrijken van landbouwgronden met organische mest leidt tot een verhoogd voorkomen van deze soort. Het voorkomen van *Lumbricus rubellus* in de grond van Duin en Kruidberg doet vermoeden dat het hier gaat om een (genetisch) aangepaste populatie, omdat deze soort niet groeide en reproduceerde in de bioassay. Ook is het mogelijk dat in het veld de regenwormen kunnen overleven in microsites die meer organisch materiaal bevatten dan de omgeving.

Het aantal regenwormen lijkt af te hangen van de hoeveelheid organische stof in de bodem. Op de organisch arme gronden van Duin en Kruidberg en Eendenkooi 't Broek is het aantal regenwormen lager dan op de organisch rijke gronden van de Blauwe Hel.

#### *Biomassa en groeisnelheid bacteriën*

De bacteriële biomassa van  $10 \mu\text{g C g}^{-1}$  in de grondmonsters afkomstig van Duin en Kruidberg is laag vergeleken met waarnemingen in arme zandgronden (0-10 cm diepte) met grasvegetatie op de Veluwe en Schiermonnikoog. Hierbij zijn bacteriële biomassa's gevonden van 20 tot  $180 \mu\text{g C g}^{-1}$ . In gras op zand is door Van den Munckhof *et al.* (1998) een bacteriële biomassa van  $300 \mu\text{g C g}^{-1}$  gevonden. Over het algemeen is de bacteriële biomassa op kleigronden minimaal twee maal hoger dan op zandgronden. De resultaten van dit onderzoek bevestigen dit (tabel 9). Onder gras op vruchtbare klei zijn waarden tot  $600 \mu\text{g C g}^{-1}$  gemeten (Schouten *et al.*, 1999). De bacteriële biomassa is hoog in de veengrond van de Blauwe Hel, mogelijk veroorzaakt door het hoge percentage organisch materiaal.

De bacteriële groeisnelheid, de inbouw van radioactief thymidine en leucine, is laag op Duin en Kruidberg en hoog in de Blauwe Hel (tabel). Eerder gemeten waarden variëren van 0 tot 350 picomol g<sup>-1</sup> uur<sup>-1</sup>. De inbouw van leucine van 6800 picomol g<sup>-1</sup> uur<sup>-1</sup> in de Blauwe Hel is veel hoger dan eerder waargenomen waarden (0-1300 picomol g<sup>-1</sup> uur<sup>-1</sup>) (Schouten *et al.*, 1999).

Het duinzand van Duin en Kruidberg is zeer arm aan organisch materiaal (< 1,0%). Dit is een mogelijke reden voor de zeer lage microbiële biomassa en activiteit. De zeer hoge waarden in de Blauwe Hel zijn mogelijk veroorzaakt doordat dit monster voornamelijk uit plantenmateriaal bestaat (eerste stadium van veenvorming). In het veld breekt dit nauwelijks af doordat het zuurstofgehalte de beperkende factor is. Na monsternamen kan de afbraak en de bacteriële activiteit zijn gestimuleerd doordat de zuurstofbeperking is verminderd. De relatief hoge leucine-inbouw kan wijzen op een hoge activiteit van anaërobe bacteriën, waarvan de meeste geen thymidine maar wel leucine inbouwen. Er zijn weinig metingen in veengrond gedaan.

Met name in de kleigrond van Eendenkooi 't Broek is de spreiding tussen de drie replica's (van 3 verschillende vakken) hoog, wat wijst op een grote ruimtelijke variatie in het veld. Tijdens bemonstering is waargenomen dat een van de vakken duidelijk humusrijker is dan de overige twee. De spreiding kan worden uitgemiddeld door bij toekomstige bemonsteringen mengmonsters (nog wel in twee- of drievoud) samen te stellen voor een grotere oppervlakte (hectares) dan de enkele vierkante meters die voor dit project zijn bemonsterd. De grote spreiding in Duin en Kruidberg kan een gevolg zijn van de lage waarden die dicht tegen de detectiegrens aanzitten.

De genetische diversiteit van de bacteriegemeenschap is vergelijkbaar met andere schone gronden (Schouten *et al.*, 1999). In verontreinigde gronden kan het aantal genotypen zijn afgenomen tot 30 à 40. Ten gevolge van de samenstelling van de bacteriepopulatie verschillen de DNA-profielen per locatie, terwijl de verschillen binnen de locatie (plots) klein zijn. Het afwijkende DNA-profiel van een van de drie replica's in Eendenkooi 't Broek kan worden verklaard door het tijdens de bemonstering waargenomen hoge humusgehalte van een van de drie plots. De DNA-profielen (fingerprints) kunnen verder worden geanalyseerd (bijvoorbeeld met Principale Componenten Analyse) om de mate van verschil (clustering) tussen verschillende bodemecosystemen zichtbaar te maken en te kwantificeren. Vanwege het kleine aantal locaties is dat hier niet gedaan.

#### *Functionele groepen nematoden*

Nematoden zijn het talrijkst in de kleigrond van Eendenkooi 't Broek. Bacterivore nematoden komen in alle gronden veel meer voor dan fungivoren (tabel 10). Dit wijst erop dat in alle systemen bacteriën het grootste deel van de organische stofafbraak uitvoeren. De hoge bacteriële biomassa en groeisnelheid in de Blauwe Hel (tabel 9) wordt niet weerspiegeld door hoge aantallen (bacterivore) nematoden. Dit is een aanwijzing voor anaërobe omstandigheden in de grond van de Blauwe Hel. In tegenstelling tot bacteriën zijn nematoden namelijk niet in staat te overleven in een anaëroob milieu.

Op de locaties de Blauwe Hel en Eendenkooi 't Broek zijn herbivore nematoden talrijk. Op de laatst genoemde locatie maken ze het grootste deel uit van de populatie (64%). Dit kan verklaard worden door verschillen in plantengroei. De locaties de Blauwe Hel en Eendenkooi 't Broek worden gekenmerkt door een zeer dichte vegetatie en veel plantaardig materiaal in de bodem, terwijl Duin en Kruidberg is begroeid met een schrale duinvegetatie. Op de laatste locatie is het aandeel herbivore nematoden circa 22%.

### **4.3 Meerwaarde van referentiegegevens**

De beschikbaarheid van een dataset met referentiegegevens maakt het gebruik van een lokale referentie niet overbodig. Een lokale referentie heeft altijd de voorkeur, omdat deze het meest betrouwbaar is. Bij het beoordelen van de resultaten van bioassays worden namelijk de waargenomen effecten uitgedrukt ten opzichte van een als schoon beoordeelde referentiegrond met dezelfde eigenschappen. Op basis van de grootte van de effecten zal met behulp van een toetsingskader het actueel ecologisch risico van de bodem worden vastgesteld. Het is echter niet in alle gevallen zeker of de gebruikte referentie geschikt is, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van niet-geanalyseerde verontreinigingen in het referentiemonster. Een niet-geschikte referentie kan leiden tot een onder- of overschatting van het actueel ecologisch risico met verkeerde of onnodige (beleidsmatige) maatregelen als mogelijk gevolg. Door de resultaten van de lokale referentiegrond te toetsen aan een dataset met referentiegegevens kan met zekerheid worden gesteld of er in het referentiemonsters factoren aanwezig zijn die de resultaten van ecotesten kunnen beïnvloeden. Een betrouwbare interpretatie is het gevolg.

In tabel 12 worden de verschillende uitkomsten van de toetsing van de referentiegrond aan een dataset met referentiegegevens weergegeven. Hierbij is een tweetal aannames gemaakt, namelijk:

1. de afstand tussen de referentie- en de verontreinigde locatie is minimaal; verschillen qua bodemsamenstelling en fysisch-chemische bodemparameters zijn zoveel als mogelijk uitgesloten;
2. de resultaten op de kwaliteitscontrole (interne standaard) voldoen aan alle criteria; de test is correct uitgevoerd en geldig.



*Tabel 12. Bruikbaarheid van lokale referenties en een referentiedataset. Verklaring: - = geen negatief effect; + = wel negatief effect.*

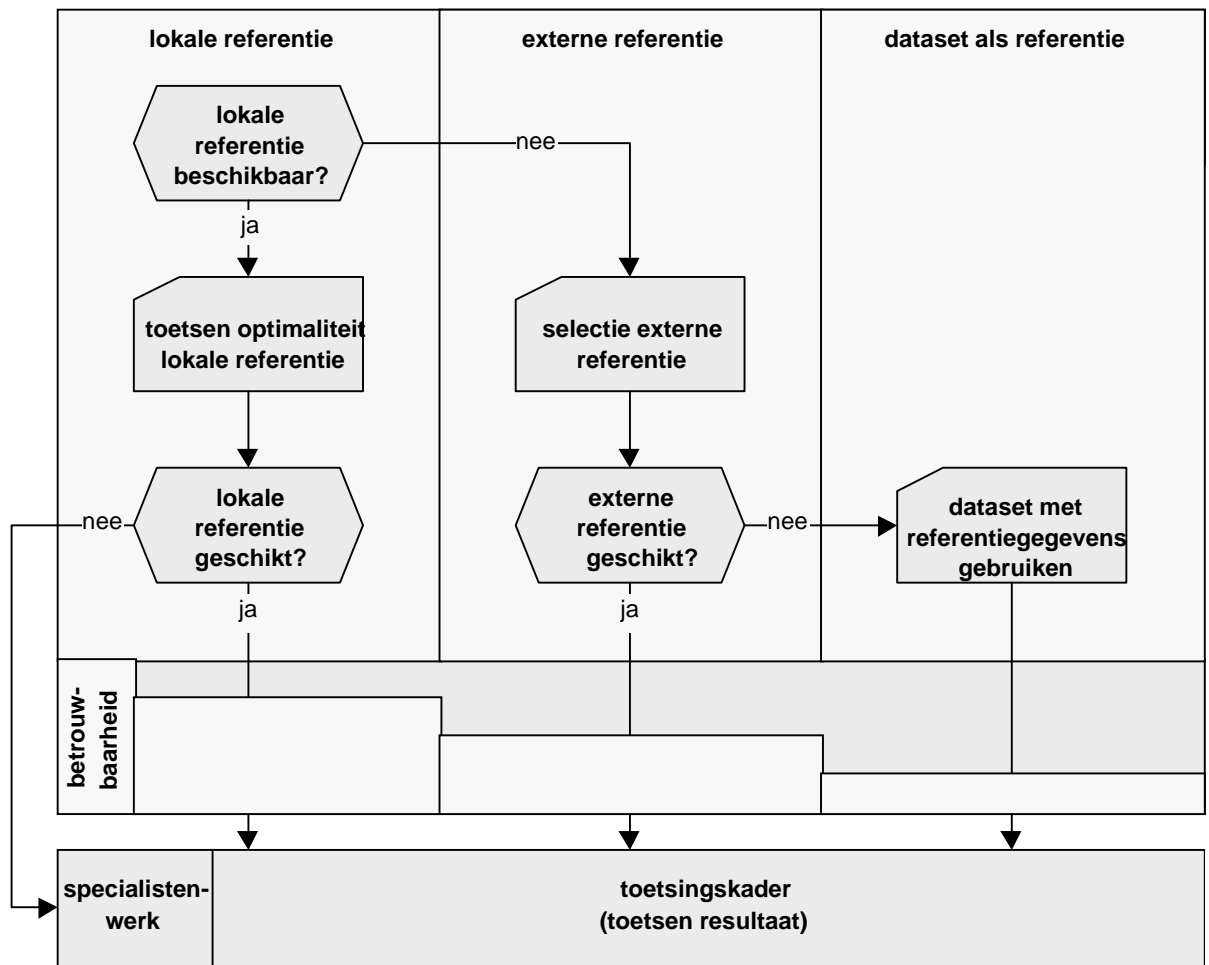
toetsresultaat lokale referentie ten opzichte van een referentiedataset	toetsresultaat verdachte monster ten opzichte van een lokale referentie	mogelijke oorzaken negatief effect van lokale referentie	conclusie
-	-		geen toxiciteit; lokale referentie bruikbaar
-	+		toxiciteit; lokale referentie bruikbaar
+	-	lokale referentie is ook verontreinigd	toxiciteit; effect bepalen ten opzichte van een referentiedataset; toetsing onbetrouwbaar
		zowel lokale referentie als verdachte monster zijn verontreinigd met een onbekende stof	toxiciteit; effect bepalen ten opzichte van een referentiedataset; toetsing onbetrouwbaar
		bodemeigenschappen veroorzaken het effect; de gekozen referentie uit de referentiedataset voldoet niet	geen toxiciteit, maar toetsing mogelijk onbetrouwbaar
+	+	referentie is ook verontreinigd	toxiciteit; effect bepalen ten opzichte van een referentiedataset; toetsing onbetrouwbaar
		zowel lokale referentie als verdachte monster zijn verontreinigd met een onbekende stof	toxiciteit; effect bepalen ten opzichte van een referentiedataset; toetsing onbetrouwbaar
		bodemeigenschappen veroorzaken het effect; de gekozen referentie uit de referentiedataset voldoet niet	toxiciteit; toetsing mogelijk, maar onbetrouwbaar

Uit tabel 12 blijkt dat bij een ongeschikte lokale referentie de betrouwbaarheid van de afleiding van actuele ecologische risico's wordt bemoeilijkt. Er kunnen wel uitspraken worden gedaan over toxiciteit, maar het effect kan niet worden uitgedrukt ten opzichte van de gekozen lokale referentie. De enige mogelijkheid is dan om terug te vallen op een externe referentie of een dataset met referentiegegevens, tenzij aannemelijk kan worden gemaakt dat het gevonden effect bij de lokale referentie wordt veroorzaakt door bodemeigenschappen. In dit geval komt de lokale referentie niet voor in de dataset met referentiegegevens. Een toetsing is dan wel mogelijk, het gemeten effect in het verontreinigde monster wordt dan immers veroorzaakt door de aanwezigheid van verontreiniging(en). De toetsing zal echter minder betrouwbaar zijn, aangezien het niet zeker is of de gevonden waarden bij de referentiegrond normaal zijn voor dat type bodem.

Wanneer op de locatie of in de directe omgeving geen geschikte referentie aanwezig is, kan gebruik worden gemaakt van een referentie afkomstig van elders. Een dataset met referentiegegevens is dan een geschikt hulpmiddel bij het vinden van de juiste referentie. Bij deze werkwijze wordt een dataset geraadpleegd met als input-variabelen bodemsamenstelling en fysisch-chemische parameters. Een dataset zal dan als output gronden met vergelijkbare bodemsamenstelling en de herkomst van deze gronden geven, zodat deze kunnen worden bemonsterd of wellicht worden geleverd door een grondbank. Omdat bij deze werkwijze een indicatie wordt gekregen over de resultaten van ecotesten, kan deze referentiegrond eveneens als kwaliteitscontrole worden meegenomen. Deze werkwijze zal echter leiden tot een afname van de betrouwbaarheid van het onderzoek, aangezien niet is uitgesloten dat er verschillen bestaan tussen de gekozen referentie en de te onderzoeken locatie die invloed hebben op de resultaten van ecotesten.

Wanneer geen lokale of externe referentiegronden beschikbaar zijn of de lokale referentie ongeschikt is, kunnen de resultaten van de verontreinigde monsters worden vergeleken met een dataset van referentiegegevens. Vergelijking met alleen een dataset zal echter leiden tot een minder betrouwbare interpretatie, omdat bijvoorbeeld ook de condities van de gebruikte toetsorganismen en uitvoeringstechnische omstandigheden invloed hebben op de uitkomsten. Het gebruik van alleen een dataset als referentiemateriaal moet daarom worden gezien als een uiterste “redmiddel”. Een kwaliteitscontrole is bij deze optie van belang. Het geschetste referentiekader met de betrouwbaarheid van de interpretatie wordt in figuur 9 weergegeven.

Door de vele interacties die ecotesten hebben met bodemeigenschappen, blijft de interpretatie van de resultaten ook bij beschikbaarheid van een referentiekader kritisch. Daardoor blijft een goede interpretatie specialistenwerk.



*Figuur 9. Schema voor gebruik referentiegegevens bij ecotesten.*

## 5. Conclusies en aanbevelingen

### 5.1 Conclusies

Doelstelling van het uitgevoerde project is het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van een referentiekader voor het gebruik van ecotesten bij de afleiding van actuele ecologische risico's van bodemverontreiniging. Dit is gedaan door ecotesten uit te voeren op een aantal onbelaste locaties. Hierdoor wordt het inzicht in de relatie tussen bodemeigenschappen en de resultaten van ecotesten vergroot en wordt de basis gelegd voor een landelijke dataset met referentiegegevens voor ecotesten. Tevens is een bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van selectiecriteria voor ecotesten en zijn de resultaten van voorgaande onderzoeken op deze zogenaamde Edelmanlocaties geactualiseerd.

#### *Edelmanlocaties geschikt als referentie*

Met dit onderzoek zijn de resultaten van de voorgaande onderzoeken geactualiseerd. Wanneer rekening wordt gehouden met de verschillende extractiemethoden voor zware metalen die in voorgaande onderzoeken zijn toegepast, zijn op enkele locaties de gehalten van sommige metalen met een factor 2 à 3 toegenomen. Voortgaande atmosferische depositie lijkt de voornaamste oorzaak. Op een enkele lichte overschrijding van de streefwaarde na voldoen de gevonden gehalten aan verontreinigingen echter nog steeds aan de achtergrondwaarden voor de bodemkwaliteit en kunnen daarmee als referentie dienen voor ecotesten op schone grond.

#### *Bodemeigenschappen beïnvloeden de resultaten van ecotesten*

Uit het onderzoek is gebleken dat bodemeigenschappen de resultaten van ecotesten beïnvloeden. Hoe de resultaten van ecotesten worden beïnvloed, lijkt af te hangen van de gekozen ecotest. De resultaten onderstrepen het belang van een geschikte referentie wanneer ecotesten worden ingezet bij de beoordeling van actuele ecologische risico's van bodemverontreiniging. Eén standaardreferentie kan niet volstaan als referentiegrond voor alle in Nederland voorkomende bodemtypen.

#### *Verfijning in bodemtypen nodig*

Met het project is een bruikbare set met referentiegegevens gegenereerd, maar deze is te beperkt als referentiekader voor alle gronden in Nederland. In die zin is de opzet van dit project om landsdekkend referentiegegevens voor ecotesten te verzamelen voor veel voorkomende bodemtypen (zand, klei en veen) niet geslaagd. Uit het onderzoek is namelijk gebleken dat de resultaten van ecotesten op verschillende zand-, klei- en veengronden onderling verschillen. Deze indeling is te grof.

#### *Dataset vergroot de betrouwbaarheid van de interpretatie van resultaten*

Een dataset met referentiegegevens zal het gebruik van een lokale of externe referentie niet overbodig maken, maar zal juist bijdragen aan het verhogen van de betrouwbaarheid bij de afleiding van actuele ecologische risico's. Door de resultaten van een lokale referentie te vergelijken met een set van referentiegegevens kan aannemelijk worden gemaakt dat er in

het referentiemonsters geen factoren aanwezig zijn die de resultaten van ecotesten negatief beïnvloeden. Het referentiemonster is dan geschikt en het waargenomen effect op het verontreinigde monster kan met een hoge mate van betrouwbaarheid worden getoetst aan het (nog te ontwikkelen) toetsingskader.

#### *Dataset draagt bij aan de ontwikkeling van een selectiekader*

Met het onderzoek is een bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van selectiecriteria voor ecotesten, doordat het inzicht in de relatie tussen bodemeigenschappen en de resultaten van ecotesten is vergroot. Het is gebleken, dat de bioassays met de regenworm *Lumbricus rubellus* en het meten van biomassa en groeisnelheid van bacteriën niet geschikt zijn voor arme schrale (duin)zandgronden zoals Duin en Kruidberg. De Bait lamina-test lijkt ongeschikt te zijn voor zure en organisch arme gronden. Dichtheid en samenstelling van nematodenpopulaties is eveneens afhankelijk van de op de locatie aanwezige vegetatie. Daarentegen lijkt de Microtox-test wel geschikt voor een breed scala van gronden. In geen van de acht onderzochte locaties zijn met deze test effecten gevonden.

## **5.2 Aanbevelingen**

#### *Opzetten landelijke dataset*

Voor het opstellen van selectiecriteria en een referentiekader is het wenselijk om de dataset met referentiegegevens uit de breiden door ecotesten uit te voeren met een groter aantal onbelaste bodems in Nederland. Een dataset met referentiegegevens draagt immers bij aan het verhogen van de betrouwbaarheid bij de afleiding van actuele ecologische risico's en leidt tot een gemotiveerde selectie van geschikte ecotesten voor de te testen bodem. Niet alleen de relatie van ecotesten met bodemeigenschappen dient inzichtelijk te worden gemaakt, maar ook de relaties met bijvoorbeeld vegetatie en bodemgebruik. Daarom is het van belang referentiegegevens te verzamelen voor gronden met een andere vorm van bodemgebruik dan natuur. Voor bodems met de functie landbouw kan worden aangesloten bij het Biologisch Meetnet van het RIVM om zodoende de set met referentiegegevens uit te breiden.

Het opnemen van de resultaten van dit en toekomstig onderzoek in een databank verdient de aanbeveling om de resultaten inzichtelijk en toegankelijk te maken. In het kader van de Stichting Kennisontwikkeling en Kennisoverdracht Bodem (SKB) wordt thans gewerkt aan de realisatie van een dergelijke databank.

#### *Herhaaldelijk onderzoek en verificatie vergroot betrouwbaarheid*

Microbiologische bodemparameters worden naast bodemsamenstelling ook beïnvloed door het seizoen en de aanwezige begroeiing. Daarom is herhaaldelijk onderzoek nodig om een betrouwbare set referentiegegevens te verkrijgen, bijvoorbeeld door het uitvoeren van deze testen in meerdere jaargetijden. Ook is het wenselijk om voorafgaand aan de microbiologische metingen de grond vier weken te incuberen bij een constante temperatuur en vochtgehalte om invloeden van bijvoorbeeld toevallige weersomstandigheden uit te schakelen.

Ten slotte is het van belang de resultaten van dit onderzoek te verifiëren.

## 6. Referenties

Bloem, J., 1995. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In "Molecular Microbial Ecology Manual" (A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn, eds), pp. 4.1.8:1-12. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bloem, J., M. Veninga and J. Shepherd, 1995a. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 926-936.

Bloem, J., P.R. Bolhuis, M.R. Veninga and J. Wieringa, 1995b. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry" (K. Alef and P. Nannipieri, eds), pp. 162-173. Academic Press, London.

Bouwman, L.A., J. Bloem, P.H.J.F. van den Boogert, F. Bremer, G.H.J. Hoenderboom and P.C. de Ruiter, 1994. Short-term and long-term effects of bacterivorous nematodes and nematophagous fungi on carbon and nitrogen mineralization in microcosms. *Biology and Fertility of Soils* 17, 249-256.

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

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

Edelman, Th., 1984. Achtergrondgehalten van een aantal anorganische en organische stoffen in de bodem van Nederland, een eerste verkenning. *Bodembescherming deel 34*, Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Staatsuitgeverij 's Gravenhage.

FWVO, 1997. Voorlopige handleiding toepassing acute toxiciteitstesten. Project implementatie totaal effluent toxiciteit. FWVO-nota 97.03.

Gestel, C.A.M. van and A.M.F. van Diepen., 1997. The influence of soil moisture content on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 123-132.

Gestel, C.A.M. van, E.M. Dirven-van Breemen en J.W. Kamerman, 1992. Beoordeling van gereinigde grond. IV. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegronden. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. RIVM rapport no. 216402004, Bilthoven.

Helling, B., G. Pfeiff and O. Larink., 1998. A comparison of feeding activity of collembola and enchytraeids in laboratory studies using the bait-lamina test. *Applied Soil Ecology* 7, 207-212.

Kamerman, J.W. en C.A.M. van Gestel., 1991. Beoordeling van gereinigde grond, III. De ontwikkeling van bioassays. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. RIVM rapport no. 216402003, Bilthoven.

Kratz, W., 1998. The Bait-Lamina test. General aspects, applications and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 5, 94-96.

Løkke, H. and C.A.M. van Gestel., 1998. Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester.

Ma, W-Ch., 1982. Regenwormen als bio-indicators van bodemverontreiniging. Bodembescherming deel 15, Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Staatsuitgeverij 's Gravenhage.

Ma, W-Ch, H. van Wezel en D. van den Ham, 1992. Achtergrondgehalten van vijftien metaalelementen in de bodem, vegetatie en de bodemfauna van twaalf natuurgebieden in Nederland. Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek. RIN-rapport 92/11, Arnhem.

Michel, P.H., and J. Bloem., 1993. Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 943-950.

Muijs, B., M.F.X. Veul, W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, W.C. Ma en J. Bloem, 2000. Haalbaarheidsonderzoek databank ecotesten als basis voor ecologische risicobeoordeling. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek deel 27, Wageningen.

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



Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

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

NNI., 1999. NEN 5740. Bodem. Onderzoeksstrategie bij verkennend bodemonderzoek. Onderzoek naar de milieuhygiënische kwaliteit van bodem en grond. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NOBIS, 2000. Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Nederlands Onderzoeksprogramma Biologische in-situ Sanering, Gouda

Otte, J.G., P.F.A.M. Römken, A. Tiktak en W. de Vries., 2000. Partitierelaties voor zware metalen (Cd, Cu, Pb, Zn) voor diffuus verontreinigde Nederlandse bodems. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek deel 30, Wageningen.

Ringwood, A.H., M.E. DeLorenzo, P.E. Ross, A.F. Holland., 1997. Interpretation of Microtox® solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1135-1140.

RIZA, 1996. RIZA Handboek “Toxicologie en lozingsvergunningen”. J. Botterweg (red.). Notanr. 96.045. Rijksinstituut voor Intergraal Zoetwaterbeheer en Afwaterbehandeling RIZA, Lelystad.

Rutgers, M., J. Faber, J. Postma en H. Eijsackers, 1998. Locatiespecifieke ecologische risico's: Een basisbenadering voor functiegerichte beoordeling van bodemverontreiniging. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, deel 15, Wageningen.

Sandifer, R.D. and S.P. Hopkin., 1996. Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system. *Chemosphere* 33, 2475-2486.

Schouten, A.J., A.M. Breure, J. Bloem, W. Didden, P.C. de Ruiter and H. Siepel, 1999. Life support functies van de bodem: operationalisering t.b.v. het biodiversiteitsbeleid. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIVM rapport no. 607601003, Bilthoven.

Smit, C.E. and C.A.M. van Gestel, 1996. Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Applied Soil Ecology* 3, 127-136.

## **Bijlage I. Achtergrondinformatie over ecotesten**

### **1. INLEIDING**

Met ecotesten wordt aan de hand van waarneembare effecten bij organismen de ecologische schade van milieuverontreiniging bepaald. Ecotesten is een verzamelnaam en omvat bioassays, veldinventarisaties, bioaccumulatie en biomarkers.

Bij bioassays worden organismen aan een milieumonster toegevoegd en gedurende een voorgeschreven tijd blootgesteld. De effecten van milieuverontreiniging worden gemeten met parameters als overleving, groei en reproductie. Milieuverontreiniging leidt tot een afname van deze parameters. Hoe sterker de respons, des te ernstiger de ecologische schade en des te groter het actuele ecologisch risico. Er zijn reeds gestandaardiseerde bioassays aanwezig, veelal voor het aquatische milieu. Het aantal terrestrische bioassays is echter beperkt.

Met veldinventarisaties wordt aan de hand van aanwezige dier- en plantensoorten en de samenstelling of activiteit van de microflora de mogelijke ecologische schade van verontreiniging bepaald. Hierbij wordt bijvoorbeeld gelet op de aanwezigheid van indicatorsoorten, soortensamenstelling, biodiversiteit en vegetatiedekking. Verontreinigingen kunnen een negatieve invloed hebben op de hoeveelheid aanwezige organismen, soortensamenstelling en biodiversiteit van flora en fauna. Ook hebben bepaalde typen verontreinigingen invloed op de aan- of afwezigheid van plant- en diersoorten. Ecotesten kunnen daarom iets vertellen over het actuele ecologisch risico van de aanwezige verontreiniging doordat zij de ecologische schade meten.

Het meten van door organismen opgenomen verontreinigingen geeft aanvullende informatie over de risico's voor organismen en voor organismen hoger in de voedselketen. Bioaccumulatie van verontreinigingen door organismen is sterk afhankelijk van bodemeigenschappen zoals de zuurgraad en organisch stof gehalte en is dan ook een maat voor de biologische beschikbaarheid van verontreinigingen.

Bij biomarkers wordt het effect van verontreinigingen gemeten aan de hand van een gestimuleerde of gereduceerde (bio)chemische of biologische reactie in het organisme. De aanwezigheid van contaminanten leidt vaak tot verstoring of stimulering van (bio)chemische en biologische processen in organismen, bijvoorbeeld remming van stofwisselingsprocessen of de aanmaak van stress-eiwitten.

### **2. ONTWIKKELING TERRESTRISCHE BIOASSAYS**

In het navolgende is, zonder pretentie van volledigheid, een korte schets van de ontwikkeling en het gebruik van bioassays in Nederland gegeven. In 1982 is een begin gemaakt met het onderzoek naar de rol van regenwormen als bioindicatoren voor bodemverontreiniging. Uit dit onderzoek bleek dat de respons van regenwormen (overleving, groei, reproductie *et cetera*) werd beïnvloed door in de bodem aanwezige verontreinigingen zoals zware metalen en bestrijdingsmiddelen. De respons bleek ook af te hangen van bodemeigenschappen, waaronder de pH en het gehalte aan organische stof (Ma, 1982). De ontwikkeling van de bioassay met de regenworm *Eisenia fetida* is begonnen bij het werk van Marquenie *et al.* (1987, 1988) en Adema *et al.* (1987) en in de jaren erna verder ontwikkeld en getest (Kammerman en Van Gestel, 1991; Van Gestel, 1991; Van Gestel *et al.*, 1992a,b). Tegelijkertijd werden door eerder genoemde auteurs bioassays met planten ontwikkeld en getest. Daarnaast heeft er veel onderzoek plaatsgevonden naar de ontwikkeling van andere bioassays, waaronder de bioassay met de springstaart *Folsomia candida* (zie onder andere Posthuma *et al.*, 1998; Smit, 1997). Veel van in deze onderzoeken genoemde testen betroffen bestaande bioassays op kunstmatige grond voor het testen van chemicaliën die werden gebruikt en geoptimaliseerd voor toepassing op veldgronden.

In de jaren daarop is herhaaldelijk onderzoek uitgevoerd naar de bruikbaarheid van bioassays ter beoordeling van het actueel ecologisch risico van verontreinigde gronden. In een onderzoek van Van den Munckhof en Veul (1994) bleek dat de respons van bioassays (onder andere *Folsomia candida* en Microtox-test) afnam bij afnemende olievervuiling. In 1996 is er, in het kader van een PGBO-project een inventariserend onderzoek uitgevoerd naar de bruikbaarheid van bioassays ter beoordeling van de toxiciteit van verontreinigde bodems. Op een drietal concentratiereeksen van verontreinigde gronden (zware metalen, minerale olieproducten en PAK) zijn een aantal terrestrische bioassays uitgevoerd. Het betrof hier bioassays met de springstaart *Folsomia candida* en de regenworm *Eisenia fetida*. Alle bioassays vertoonden een duidelijke respons op de in de bodem aanwezige verontreiniging (Van den Munckhof *et al.*, 1998). In een NOBIS project is op een gradiënt met olieverontreiniging een groot aantal acute en chronische bioassays getest. De bioassays vertoonden veelal een negatieve respons op de aanwezige olieverontreiniging. Door een mogelijke verontreiniging met zware metalen in enkele van de monsters, vertoonden de bioassays op deze monsters een sterkere respons dan op basis van alleen de olieverontreiniging verwacht kan worden (Bioclear *et al.*, 1998).

Ook buiten Nederland vindt onderzoek plaats naar de bruikbaarheid van bioassays. Voor Canada is door Keddy *et al.* (1995) onderzoek gedaan naar geschikte bioassays voor de beoordeling van de kwaliteit van bodems. In dit onderzoek is een testbatterij voorgesteld met daarin aanbevolen bioassays en bioassays die hierop een extra aanvulling geven. In Duitsland is door Hund en Traunspurger (1994) onderzoek gedaan naar de effectiviteit van bioassays bij de beoordeling van een saneringsproces van met PAK verontreinigde bodems. Hieruit bleek dat bioassays een goede respons vertoonden met de afnemende PAK verontreiniging.

### 3. BESCHIKBARE TERRESTRISCHE BIOASSAYS

Een voorbeeld van gangbare bioassays ter beoordeling van het actueel ecologisch risico van verontreinigde bodems is opgenomen in tabel 1. Er wordt onderscheid gemaakt tussen acute en chronische bioassays. Bij acute bioassays ondervinden de gebruikte testorganismen een kortstondige blootstelling aan contaminanten in vergelijking tot hun levensduur. Acute testen duren meestal dan ook slechts enkele minuten tot enkele dagen. Het betreft veelal aquatische bioassays die uitgevoerd worden op grondwater of bodemextracten. Veel gebruikte parameters zijn overleving, groei of (bio)chemische reacties.

Daarentegen worden bij chronische bioassays de organismen relatief lang ten opzichte van hun levensduur aan contaminanten blootgesteld. Door de lange blootstellingsduur, vaak tot enkele weken, worden bij deze bioassays ook de naleveringseffecten meegenomen. Omdat organismen voornamelijk contaminanten opnemen vanuit het poriewater, daalt de concentratie in het poriewater. In tegenstelling tot acute bioassays, worden chronische testen in grond uitgevoerd, waar een evenwicht bestaat tussen concentraties in het poriewater en grond. Door de testorganismen opgenomen contaminanten kunnen vanuit de grond worden aangevuld.

Verder meten chronische bioassays sub-letale parameters zoals reproductie en groei. Daar sub-letale parameters gevoeliger zijn dan letale parameters, geven chronische bioassays een gevoeliger risicoschatting, maar zijn ook gevoeliger voor verschillen in fysisch-chemische bodemeigenschappen. Dit maakt de keuze van een goede referentie dus ook extra belangrijk.

Veel van de gebruikte bioassays voor het bepalen van het ecologisch risico zijn afgeleid van standaardtoxiciteitstesten voor het beoordelen van op de markt gebrachte chemicaliën. In vergelijking tot aquatische bioassays zijn terrestrische bioassays schaars. Vaak wordt voor risicobeoordeling van verontreinigde bodems de toevlucht gezocht tot aquatische bioassays die worden uitgevoerd op poriewater of bodemextracten, waarvan de Microtox-test met de bioluminescerende bacterie *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*) waarschijnlijk de meest bekende en gebruikte is. Voor gebruik direct in de bodem bestaan weinig gestandaardiseerde bioassays. Enkele voorbeelden zijn de chronische testen met

Tabel 1. Gangbare acute en chronische bioassays.

Toetsorganisme/naam test	Blootstellingduur	Toetsingsparameter	Toetsingsmedium
<b>acute bioassays</b>			
Zoetwateralg <i>Raphidocelis subcapitata</i>	48 en 72 uur	groei en groeisnelheid	water, bodemextract
Sla <i>Lactuca sativa</i>	96 uur	wortellengtegroei	extract op agar
ECHA test <i>Bacillus</i> sp.	24 uur	bacteriële groeiremming	water, bodemextract
Nematode <i>Plectus acuminatus</i>	24, 48, 72 en 96 uur	immobiliteit	water, bodemextract
Springstaart <i>Folsomia candida</i>	24, 48, 72 en 96 uur	immobiliteit	water, bodemextract
Microtox <i>Vibrio fischeri</i>	5, 15 en 30 minuten	afname bioluminescentie	water, bodemextract
Watervlo <i>Daphnia magna</i>	24 en 48 uur	immobiliteit	water, bodemextract.
<b>chronische bioassays</b>			
Sla <i>Lactuca sativa</i>	4 weken	groei en kieming	grond
Regenworm <i>Eisenia fetida</i>	4 weken	groei, overleving, reproductie	grond
Springstaart <i>Folsomia candida</i>	4 weken	groei, overleving, reproductie	grond
Bait lamina test	24 dagen	afbraakactiviteit microflora en bodemfauna	grond
Protozoa <i>Colpoda steinii</i>	1-2 weken	overleving, reproductie	grond

planten (OECD, 1984), de acute test met de regenworm *Eisenia fetida* (ISO, 1993), de chronische test met deze worm (ISO, 1998) en de test met de springstaart *Folsomia candida* (ISO, 1998). Een niet-gestandaardiseerde test voor bodems is de Bait lamina-test. Hierbij wordt een strip met substraat in de bodem gestoken, al waar het door bodemorganismen wordt afgebroken. De gedachte achter deze test is dat de mate van verontreiniging de hoeveelheid en de activiteit van organismen in de bodem bepaalt en dus ook de afbraaksnelheid van het substraat (Kratz, 1998).

#### 4. VELDINVENTARISATIES

Bij het onderzoek naar de bruikbaarheid van ecotesten van Van den Munckhof *et al.* (1998) zijn ook enkele veldinventarisaties meegenomen. Verstoring van de bodem door bijvoorbeeld verontreiniging kan invloed hebben op de samenstelling van zowel de bacterie- als de nematodenpopulatie. Uit dit onderzoek bleek dat een toenemende verontreiniging met nikkel en chroom negatieve effecten had op de groeisnelheid (80% reductie) en biomassa (66% reductie) van de bacteriën. Ook de biodiversiteit van de bacteriën was veranderd. Er was een significant verschil van 37% tussen de DNA-profielen (soortensamenstelling) van de verontreinigde en de schone grond (Bloem *et al.*, publicatie in voorbereiding). Mogelijk als gevolg van de

geremde bacteriegroei nam bij toenemende verontreiniging ook het aantal bacterivore nematoden sterk af (-90%). Bij een matige verontreiniging was het totale aantal nematoden nog niet verlaagd, maar bestond de populatie voornamelijk uit herbivoren. Bij de hoogste verontreiniging waren alle functionele groepen nematoden met circa 90% gereduceerd. Toenemende olieverontreiniging liet echter een toename zien van het aantal bacteriën en daardoor een toename van (bacterivore) nematoden. De maturity index geeft de verhouding weer tussen nematoden met respectievelijk een r- en K-strategie. Snelgroeende en voortplantende r-strategen zijn voornamelijk te vinden in verstoorde grond, terwijl langzaam groeiende en voortplantende K-strategen op gronden zijn te vinden die biologisch gezien reeds ontwikkeld zijn. Een verstoring van de grond door verontreiniging zal het aantal r-strategen doen toenemen, waardoor de maturity index zal verschuiven. De bovengenoemde verontreinigingen bleken echter nauwelijks effect te hebben op deze index (Van den Munckhof *et al.*, 1998).

De aan- of afwezigheid van plant- en diersoorten kan iets vertellen over een mogelijke aanwezigheid en aard van verontreinigingen. De aanwezigheid van zinkviooltjes (*Viola calaminaria*) en engels gras (*Armeria maritima*) duiden op de aanwezigheid van hoge zinkconcentraties in de bodem. Deze soorten worden daarom vaak aangetroffen op voormalige zinksmelterijen en -mijnen. Door Ernst (1974) is geconstateerd dat een afnemende verontreiniging met zware metalen leidde tot een toename van de vegetatiebedekking en biodiversiteit. Tevens veranderde de soortensamenstelling van planten. Het is dan ook mogelijk aan de hand van vegetatiebedekking en soortensamenstelling een indicatie te krijgen van de mate van verontreiniging. Ook dieren zijn geschikt als indicator-organismen, mits deze niet te mobiel zijn. De eerder genoemde populatiesamenstelling van nematoden is een goed voorbeeld van geschikte dieren voor veldinventarisaties.

## 5. BIOACCUMULATIE

Bioaccumulatie kan een goede indicatie geven voor het actueel ecologische risico. De opname van contaminanten door organismen hangt af van de biologische beschikbaarheid die wordt bepaald door onder andere de zuurgraad en hoeveelheid organische stof. Bioaccumulatie is ook van belang vanwege doorgifte van contaminanten naar hogere trofische niveaus. Mollen die leven in verontreinigde gebieden hadden een hogere interne concentratie contaminanten dan mollen in schone gebieden. Zij kregen de contaminanten binnen via hun voedsel, wat voor het grootste deel uit regenwormen bestaat (Pankakoski, 1993; Ma, 1994).

Door Van Gestel *et al.* (1992a) is een referentiekader opgesteld voor interne concentraties zware metalen in regenwormen van de soort *Eisenia fetida* die waren blootgesteld aan onbelaste gronden. Hiermee kan het mogelijk zijn om bij veldinventarisaties verzamelde wormen te vergelijken met dit referentiekader en uitspraak te doen over de mate en ernst van de verontreiniging. Nadelen van het meten van bioaccumulatie zijn dat er wederom op een selectie van contaminanten wordt gemeten en dat geen rekening wordt gehouden met combinatietoxiciteit (Muijs, 1997). Bovendien zijn organismen in staat om de interne concentraties van essentiële zware metalen als zink en ijzer te reguleren. Voor deze metalen is daarom ook nauwelijks een toename te zien van de interne concentraties bij toenemende bodemconcentraties en geven interne concentraties daarom ook geen goede indicatie van de biologische beschikbaarheid van deze metalen, tenzij deze worden gerelateerd aan de conditie van het organisme. Interne regulatie van essentiële metalen kost energie en kan negatieve gevolgen voor de conditie van het organisme hebben bij hoge (en lage) mate van verontreiniging met zware metalen (Van Gestel *et al.*, 1993; Muijs, 1997; Smit, 1997).

## 6. BIOMARKERS

Een recente ontwikkeling op het gebied van ecotesten zijn biomarkers. Dit zijn veelal testen in het laboratorium waar aan de hand van (bio)chemische of biologische reacties van het organisme het actueel ecologisch risico bepaald kan worden. Een voorbeeld van een biomarker is de Neutral Red Retention Time test. Hiertoe wordt aan cellen van organismen een kleurstof toegevoegd die door de lysosomen van de cel worden opgenomen. Doordat deze kleurstof het membraan van de lysosoom aantast, zal deze verdwijnen en de cel doen kleuren. De snelheid waarmee dit gebeurt is afhankelijk van de conditie van het organisme,

waarbij aangenomen wordt dat contaminanten een negatieve invloed hierop hebben. Dit proces is te volgen onder een microscoop. Deze biomarker is reeds met succes toegepast bij verschillende organismen, waaronder regenwormen (Svendsen *et al.*, 1996; Svendsen en Weeks, 1997a, b). Andere biomarkers maken bijvoorbeeld gebruik van stresseiwitten die organismen kunnen aanmaken om hoge concentraties van verontreinigingen te kunnen overleven (Köhler *et al.*, 1996, 1998). Het voordeel van biomarkers is dat deze ook bij hogere organismen kunnen worden toegepast. Hierbij zijn bloed- of weefselmonsters vaak voldoende en is het niet noodzakelijk organismen te verwonden of te doden. De ontwikkeling en het gebruik van biomarkers staan echter nog in de kinderschoenen. Bovendien is vaak nog onduidelijk wat de respons van een biomarker betekent voor de effecten op hogere organismale niveaus, zoals reproductie van het organisme.

## REFERENTIES

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

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

Ernst, W.H.O. (1974). Schwermetallvegetation der Erde. Gustav Fischer Verslag, Stuttgart.

Gestel, C.A.M. van (1991). Earthworms in ecotoxicology. Proefschrift Rijksuniversiteit Utrecht.

Gestel, C.A.M. van, Dirven-van Breemen, E.M., Kamerman, J.W. (1992a). Beoordeling van gereinigde gronden. IV. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op referentiegrond. RIVM rapportnummer 216402004.

Gestel, C.A.M. van, Dirven-van Breemen, E.M., Kamerman, J.W. (1992b). Beoordeling van gereinigde grond. V. Toepassing van bioassays met planten en regenwormen op verontreinigde en gereinigde gronden. RIVM rapportnummer 21640205.

Gestel, C.A.M. van, Dirven-van Breemen, E.M., Baerselman, R. (1993). Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). Science of the Total Environment, Supplement, 585-597.

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

ISO (1993) Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part I: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. International standard ISO 11268-1, International Standardization Organisation.

ISO (1998) Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. International standard ISO 11268-2, International Standardization Organisation.

ISO (1999). Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*). International standard ISO 11267, International Standardization Organisation.

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

- Keddy, J.C., Greene, J.C., Bonnell, M.A. (1995). Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 221-251.
- Köhler, H. R., Rahman, B., Graff, S., Berkus, M., Triebkorn, R. (1996). Expression of the stress-70 protein family (HSP70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: An approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere*, 33, 1327-1340.
- Köhler, H.-R., Belitz, B., Eckwert, H., Adam, R., Rahman, B., Trontelj, P. (1998). Validation of *hsp70* stress gene expression as a marker of metal effects in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata): correlation with demographic parameters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 2246-2253.
- Kratz, W. (1998). The bait-lamina test – general aspects, applications and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 5, 94-96.
- Ma, W.C. (1982). Regenwormen als bio-indicators van bodemverontreiniging. Bodembescherming, rapportnummer 15, Staatsuitgeverij, 's-Gravenhage.
- Ma, W.C. (1994). Methodological principles of using small mammals for ecological hazard assessment of chemical soil pollution, with examples on cadmium and lead. In: M.H. Donker et al. (eds.) *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Lewis Publishers, CRC Press. pp. 357-371.
- Marquenie, J.M., Crawley, D.K., de Jong, P., Jenner, H.A. (1988). Growth and metal uptake of the plant *Cyperus esculentus* and the worm *Eisenia fetida* in a worst-case experiment on coal fly-ash and Rhine sediment. *KEMA Scientific and Technical Reports* 6, 113-121.
- Marquenie, J.M., Simmers, J.W., Kay, S.H. (1987). Preliminary assessment of bioaccumulation of metals and organic contaminants at the Times Beach confined disposal site, Buffalo, N.Y. (USAWES Miscellaneous Paper EL-87-6). Vicksburg, Mississippi: Department of the Army, Waterways Experimental Station, Corps of Engineers.
- Muijs, B. (1997). Bruikbaarheid van bioassays ter beoordeling van de toxiciteit van verontreinigde bodems. stageverslag Vrije Universiteit Amsterdam.
- Munckhof, G.P.M. van den, Veul, M.F.X. (1994). Milieuhygiënische beoordeling van het biologisch reinigingsproces van met olieproducten verontreinigde grond door middel van uitloogproeven en bioassays. Samenvattingen Nationaal Symposium Bodem Breed. 6 en 7 december 1994. De Blije Wereld, Lunteren, 142-144.
- Munckhof, G.P.M. van den, Veul, M.F.X., van Gestel, C.A.M., Bloem, J. (1998). Bodemkwaliteitsparameters – stimulerend gebruik ecotesten. Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, rapportnummer 14.
- OECD (1984). OECD guideline for testing of chemicals no.208. Terrestrial plants, growth test. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Pankakoski, E. (1993). Accumulation of heavy metals in the mole in Finland. *Environmental Pollution* 80, 9-16.
- Posthuma, L., van Gestel, C.A.M., Smit, C.E., Bakker, D.J., Vonk, J.W. (1998). Validation of toxicity data and risk limits for soils: final report. RIVM report no. 607505004.
- Smit, E. (1997). Field relevance of the *Folsomia candida* soil toxicity test. Proefschrift, Vrije Universiteit Amsterdam.

Svendsen, C., Meharg, A. A., Freestone, P., Weeks, J. M. (1996). Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire. *Applied Soil Ecology*, 3, 99-107.

Svendsen, C., Weeks, J. M. (1997a). Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, 72-79.

Svendsen, C., Weeks, J. M. (1997b). Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. II. Validation and applicability under field conditions in a mesocosm experiment with *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, 80-88.





## **Bijlage II. Ligging van de onderzochte Edelmanlocaties**



### Bijlage III. Samenstelling voedingsoplossing voor de bioassay met sla

#### *Voedingsoplossing voor de bioassays met sla*

naam	afkorting	concentratie (g/L)
Stockoplossing A		
Calciumnitraat	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6,4
Kaliumnitraat	$\text{KNO}_3$	7,9
Ammoniumnitraat	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2,0
Ijzersulfaat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,056
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,074
Stockoplossing B		
Kaliumnitraat	$\text{KNO}_3$	30,22
Kaliumfosfaat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,00
Magnesiumsulfaat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,90
Mangaansulfaat	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,22
Zinksulfaat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,145
Boorzuur	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,196
Kopersulfaat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,019
Ammoniummolybdeenoxide	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,76
Natriumnitraat	$\text{NaNO}_3$	25,41

Stockoplossing A en B 275 keer verdunnen. Verhouding A:B = 1:1



## **Bijlage IV. Situatietekeningen**





















## Bijlage V. Beschrijving veldlocaties

locatie	beschrijving monsters	globale vegetatiebeschrijving	bijzonderheden
Blauwgrasland nabij de Zijdebrug	venig klei	blauwgrassen, smalbladige weegbree	
de Blauwe Hel	veen	riet, zwarte els, watermunt, wilg <sup>2</sup>	
Duin en Kruidberg	zwak siltig, matig fijn zand	duindoorn, kruipwilg, drie-istel, mos, ijslands mos	paddestoelen aanwezig
Eendenkooi 't Broek	matig humeuze klei	distels, brandnetels, smeewortel, grassen, koninginnenkruid, wilgen	zwak roesthoudend
Fortmond	matig siltig, zwak humeus matig fijn zand	spar, lijsterbes, eik, mos	strooisellaag aanwezig
Kampina	zwak siltig, matig humeus matig fijn zand	(dop)hei, zeer vergrast	
Korenburgerveen	veen	riet, pitrus, zwarte els, wilgen	
Oeverlanden Linge	zwak siltige, sterk humeuze klei	riet, brandnetels, smeewortel	regenwormen aanwezig, zeer nat

<sup>1</sup> Tijdens het veldwerk heeft geen uitvoerige planteninventarisatie plaatsgevonden. Alleen opvallende planten zijn genoemd.

<sup>2</sup> Het trilveen wordt omsloten door een blauwgrasland met onder meer riet, watermunt en brandnetels





## **Bijlage VI. Analyseresultaten grondmonsters**





























## Bijlage VII. Resultaten Microtox-test

### Eendenkooi 't Broek

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	96,87	0	92,73	0					
	60,15	0	61,09	0					
	88,08	87,32	82,8	79,21	88,56	89,37	93,09	88,75	88,77
	84,26	86,63	85,8	84,88	91,04	84,63	88,9	90,49	90,78
	57,57	57,16	54,88	53,44	59,31	60,46	61,59	58,56	57,29
	55,81	57,68	54,47	55,35	62,03	54,99	58,54	60,83	57,89

### Duin en Kruidberg

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	97,62	0	95,99	0					
	66,01	0	65,78	0					
	91,5	92,95	91,41	91,16	100,22	94,24	96,29	90,14	97,15
	94,2	90,9	90,86	91,63	98,51	96,46	106,33	102,06	97,87
	62,84	61,94	62,75	61,04	67,82	64,64	66,66	62,09	63,94
	61,79	62,32	61,61	62,46	67,95	63,46	71,96	72,67	73,09

### Kampina

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	97,74	0	97,8	0					
	71,98	0	73,84	0					
	97,26	96,11	96,73	89,51	95,15	93,85	98,18	84,49	95,86
	106,61	99,63	94,15	89,62	98,52	103,39	104,92	97,77	98,49
	73,41	73,72	72,93	69,71	71,2	69,58	73,27	58,53	70,23
	81,14	79,18	71,16	67,61	74,13	79,91	81,22	75,6	74,09

### Fortmond

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	98,24	0	101,97	0					
	80,31	0	86,95	0					
	93,3	93,9	99,5	89,03	98,57	94,71	98,42	127,18	95,25
	82,57	87,31	90,82	94,31	96,11	100,43	98,05	96,83	87,89
	70,89	75,38	81	68,24	81,84	72,9	82,18	108,09	76,85
	63,45	71,95	78,41	72,37	80,63	83,59	82,07	81,46	72

### Korenburgerveen

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	97,98	0	98,03	0					
	66,82	0	70,14	0					
	97,02	93,93	97,26	105,49	107,1	104,1	103,91	97,85	99,04
	99,93	96,7	97,56	102,21	103,86	104,45	105,09	107,16	106,23
	67,21	60,87	67,1	75,96	72,59	72,48	68,84	63,81	63,51
	67,75	66,01	66,13	72,44	75,02	73,99	74,11	73,27	70,47



**Blauwgrasland nabij de Zijdebrug**

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	93,8	0	97,15	0					
	67,82	0	69,84	0					
	86,64	94,68	92,77	109,55	93,97	93,79	89,62	94,68	92,13
	93,11	90,63	89,84	92,7	92,01	93,07	84,34	97,41	99,96
	64,28	68,52	66,71	75,81	70,62	63,73	61,09	64,94	60,73
	66,47	63,36	66,83	70,8	67,36	66,11	58,03	67,35	68,12

**Oeverlanden van de Linge**

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	95,22	0	89,36	0					
	73,08	0	72,29	0					
	84,45	91,79	87,99	88,17	91,39	95,79	87,19	91,49	87,25
	94,5	90,53	94,33	83,82	94,85	97,98	91,13	87,12	86,89
	67,5	72,17	70,31	74,74	73,83	76,7	70,15	72,74	64,2
	72,28	70,79	73,35	71,38	76,66	74,56	72,97	71,82	67

**De Blauwe Hel**

concentratie	0,193359	0,386719	0,773438	1,546875	3,09375	6,1875	12,375	24,75	49,5
bioluminescentie	98,65	0	88,24	0					
	88,05	0	81,53	0					
	90,91	90,74	91,64	83,96	92,24	86,25	84,44	88,49	80,26
	92,02	90,55	93,29	83,73	93,37	85,22	91,87	55,36	96,94
	85,59	82,83	87,67	79,56	93,7	77,77	78,87	86,14	74,56
	86,47	82,29	87,33	78,55	93,44	78,77	77,84	85,83	88,81

## Bijlage VIII. Resultaten bioassay met de springstaart *Folsomia candida*

### groei begingewicht ( $\mu\text{g}$ )

17,0	11,8	24,0
21,2	18,3	24,3
17,9	8,6	27,7
17,2	35,4	13,5
23,4	17,1	12,0

DK = Duin en Kruidberg  
EB = Eendenkooi 't Broek  
BH = de Blauwe Hel

### eindgewichten (mg)

	LUFA	DK	EB	BH	
1	0,2463	0,1557	0,256	0,2847	
2	0,291	0,1372	0,2095	0,328	
3	0,2265	0,1687	0,3255	0,2761	
4	0,2247	0,1768	0,2369	0,2197	
5	0,1706	0,1548	0,2511	0,1709	
6	0,2551	0,135	0,1926	0,2416	
7	0,2697	0,1203	0,1943	0,1571	
8	0,2681	0,1642	0,2985	0,3063	
9	0,2154	0,1653	0,2791	0,2581	
10	0,2176	0,1426	0,2148	0,264	

### overleving

	LUFA	DK	EB	BH	
1	8	9	4	10	
2	8	9	8	8	
3	6	10	7	9	
4	8	6	9	8	
5	6	7	10	8	
6	5	5	9	10	
7	10	9	8	10	
8 0 ?		9	9	10	
9	7	5	9	9	
10	8	9	8 pot weg		

### reproductie

	LUFA	DK	EB	BH	
1 dia te donker			472	129	591
2 dia te donker			278	317	697
3	435		445	331	609
4	299		349 dia onscherp		655
5	332		355	457	718
6 dia onscherp		dia te donker		362	706
7	609		325	319	720
8 0 ?		dia te donker		534	740
9	257		450	536	649
10	402		474	235 pot weg	



## Bijlage IX. Resultaten bioassays met sla (*Lactuca sativa*)

### versgewichten (g)

#### Eendenkooi 't Broek

	a	b	c	d	e
1	0,5699	0,5748	0,1636	0,3073	0,1945
2	0,4725	0,5428	0,3754	0,432	0,3681
3	0,3458	0,3182	0,218	0,3845	0,2555
4	0,419	0,6295	0,372	0,2484	
5	0,7509	0,4596	0,2358	0,3202	0,3516

#### Duin en Kruidberg

	a	b	c	d	e
1	0,3381	0,2307	0,1916	0,3643	0,4323
2	0,3007	0,2919	0,2481	0,3327	0,3154
3	0,1552	0,5602	0,245	0,4975	
4	0,177	0,2567	0,3954	0,1628	0,2516
5	0,3571	0,1038	0,4099	0,2229	0,3401

#### Blauwe Hel

	a	b	c	d	e
1	0,2905	0,1981	0,3933	0,2446	0,3972
2	0,1047	0,1839	0,087	0,2402	0,0529
3	0,2519	0,4433	0,0888		
4	0,2921	0,437	0,156	0,2654	0,453
5					

### drooggewichten (g)

#### Eendenkooi 't Broek

	a	b	c	d	e
1	0,05	0,0594	0,0182	0,0309	0,0184
2	0,0432	0,0472	0,0282	0,0318	0,039
3	0,0308	0,0291	0,0233	0,0361	0,0269
4	0,0461	0,0593	0,0392	0,0305	
5	0,0644	0,0428	0,0265	0,0309	0,0388

#### Duin en Kruidberg

	a	b	c	d	e
1	0,0338	0,0263	0,0242	0,0449	0,0497
2	0,0363	0,038	0,0284	0,0402	0,0316
3	0,0163	0,0533	0,0321	0,0667	
4	0,0287	0,0258	0,0385	0,0199	0,0283
5	0,0436	0,0167	0,0492	0,0324	0,0395

#### Blauwe Hel

	a	b	c	d	e
1	0,0272	0,0194	0,0373	0,0264	0,0423
2	0,0083	0,0169	0,0118	0,0227	0,008
3	0,0264	0,0418	0,0088		
4	0,0331	0,049	0,017	0,0277	0,0557
5					

### drooggewicht/versgewicht

#### Eendenkooi 't Broek

	a	b	c	d	e
1	0,087735	0,086987	0,305623	0,162707	0,257069
2	0,10582	0,092115	0,133191	0,115741	0,135833
3	0,144592	0,157134	0,229358	0,130039	0,195695
4	0,119332	0,079428	0,134409	0,201288	
5	0,066587	0,10879	0,212044	0,156152	0,142207

#### Duin en Kruidberg

	a	b	c	d	e
1	0,147885	0,216732	0,26096	0,13725	0,11566
2	0,166279	0,171292	0,201532	0,150286	0,158529
3	0,322165	0,089254	0,204082	0,100503	
4	0,282486	0,19478	0,126454	0,307125	0,198728
5	0,140017	0,481696	0,121981	0,224316	0,147016

#### Blauwe Hel

	a	b	c	d	e
1	0,172117	0,252398	0,127129	0,204415	0,125881
2	0,477555	0,271887	0,574713	0,20816	0,94518
3	0,198491	0,11279	0,563063		
4	0,171174	0,114416	0,320513	0,188395	0,110375
5					



## Bijlage X. Resultaten bioassay met de regenworm *Lumbricus rubellus*

### overleving

KOBG	De Blauwe hel	Eendenkooi 't Broek	Duin en Kruidberg
4	5	5	3
5	5	2	1
4	5	5	2
1	2	4	5
5	3	4	4
4	4	5	4

### gewichtstoename per 5 wormen na vier weken (mg)

KOBG	De Blauwe hel	Eendenkooi 't Broek	Duin en Kruidberg
1272	1065	-137	132
1285	943	279	
	726	698	

### coconproductie in potten met 5 overlevende wormen

KOBG	De Blauwe hel	Eendenkooi 't Broek	Duin en Kruidberg
27	31	17	0
32	35	22	0
	32	19	0



## Bijlage XI. Resultaten Bait lamina-test

locatie	de Blauwe Hel potnummer				locatie	Blauwgrasland Zijdebrug potnummer			
strip	1	2	3	4	strip	1	2	3	4
a	9	9	1	11	a	0	0	0	0
b	10	14	1	12	b	0	0	0	0
c	15	6	1	15	c	0	0	0	0
d	9	14	7	10	d	0	0	0	0
e	5	10	1	8	e	0	0	0	0

locatie	Duin en Kruidberg potnummer				locatie	Eendenkooi 't Broek potnummer			
strip	1	2	3	4	strip	1	2	3	4
a	weg	14	9	0	a	6	0	12	10
b	12	6	14	0	b	8	0	12	14
c	16	14	7	0	c	5	0	15	10
d	14	7	9	0	d	1	0	15	13
e	14	10	7	0	e	8	2	11	15

locatie	Fortmond potnummer				locatie	Kampina potnummer			
strip	1	2	3	4	strip	1	2	3	4
a	0	0	0	0	a	0	0	0	0
b	0	0	0	0	b	0	0	0	0
c	0	0	0	0	c	0	0	0	0
d	0	0	0	0	d	0	0	0	0
e	0	0	0	0	e	0	0	0	0

locatie	Korenburgerveen potnummer				locatie	Oeverlanden van de Linge potnummer			
strip	1	2	3	4	strip	1	2	3	4
a	0	9	0	1	a	0	1	8	0
b	10	9	0	1	b	3	2	2	3
c	8	2	3	3	c	0	14	2	2
d	0	5	3	0	d	0	0	0	14
e	4	2	1	1	e	0	12	7	2





## Bijlage XII. Veldinventarisaties regenwormen

### De Blauwe Hel

monster	soort	ontwikkeling			gewicht in mg		
		adult	subadult	juveniel	adult	subadult	juveniel
1	L. Rub	5			4172		
	A. cal. tub.	4	5		2808	2144	
	A. cal. cal.	7			2087		
	A. sp.			4			591
2	L. rub	4	1		3854	326	
	L. sp.			2			185
	A. cal. cal.	9	1		2532	236	
	A. sp.			2			185
3	L. Rub	1	1		692	410	
	L. sp.			2			274
	A. cal. tub.			5			1083
	A. cal. cal.	4			1060		
	A. sp.			1			58
4	L. rub	3	2		2947	635	
	a. cal. tub.	4			2350		
	A. cal. cal.	2			539		
	A. sp.			1			263
5	L. rub.	2			1971		
	A. cal. cal.	1			326		
	A. sp.			3			324
6	L. rub.	14			11598		
	L. sp.			1			290
	A. cal. tub.		1			393	
	A. sp.			2			253
7	L. sp.			1			196
	a. cal. tub.	5	6		1451	2068	
	A. sp.			6			985
8	L. rub	2			2390		
	A. sp.			6			1247

### Eendenkooi 't Broek

monster	soort	ontwikkeling			gewicht in mg		
		adult	subadult	juveniel	adult	subadult	juveniel
1	L. sp			3			654
	A. cal. tub.		1			370	
2	A. sp.			2			389
3	A. cal. tub.		1			355	
	D. oct.	1			83		
4	L. rub.	2	1		1840	317	
	L. sp.			1			125
	A. cal. tub.	2			926		
5	L. rub.	1	1		680	417	
	L. sp.			1			193

**Eendenkooi 't Broek (vervolg)**

monster	soort	ontwikkeling			gewicht in mg		
		adult	subadult	juveniel	adult	subadult	juveniel
6	L. sp.			8			1761
	A. sp.			4			863
7	O. tyr.	1			551		
	D. rub.	1			181		
8	L. rub.	2			1465		
	a. cal. tub.	1	2		449	784	
	A. sp.			3			812

**Duin en Kruidberg**

monster	soort	ontwikkeling			gewicht in mg		
		adult	subadult	juveniel	adult	subadult	juveniel
1	A. cal. tub.	3	2	2	1913	790	281
2	L. rub.	1			1012		
	L. sp.			2			307
	A. cal. tub.	3	5		1253	1432	
	A. sp.			6			1058
3	L. rub.		1			736	
	L. sp.			1			318
	A. sp.			2			432
4	A. cal. tub.	1			955		
	A. sp.			2			514
5	L. sp.			1			144
6	L. rub.	1			955		
	L. sp.			1			187
	D. rub.			1			57
7	L. rub.	4			2404		
8	L. sp.			1			266
	A. cal. tub.		1			671	

## **Bijlage XIII. Resultaten onderzoek biomassa en groeisnelheid bacteriën**



**Resultaten onderzoek biomassa en groeisnelheid bacteriën**

	Dry m (%)	Dry m (%) (average)	Bacteria (µg C/g fresh soil)	Bacteria (µg C/g dry soil)	Thymidine (pmol/g fresh)	Thymidine (pmol/g.2h)	Thymidine incorporation (pmol/g.h)	Leucine (pmol/g fr)	Leucine (pmol/g.2h)
<b>De Blauwe Hel</b>	6,40	6,82	106,055	1554,30	68,97	1010,77	505,39	651,18	9543,43
	7,92	6,82	66,222	970,52	37,02	542,54	271,27	1199,79	17583,62
	6,15	6,82	79,341	1162,79	38,28	561,06	280,53		
<b>Duin en Kruidberg</b>	74,23	75,58	2,064	2,73	18,84	24,93	12,46	406,82	538,29
	77,47	75,58	18,845	24,94	-7,43	-9,83	-4,91	17,07	22,59
	75,03	75,58	3,187	4,22	-9,06	-11,99	-5,99	-40,11	-53,07
<b>Eendenkooi 't Broek</b>	51,88	53,73	66,15	123,12	21,39	39,80	19,90	383,47	713,69
	55,13	53,73	3,96	7,38	32,65	60,76	30,38	359,86	669,75
	54,18	53,73	7,39	13,76	58,10	108,13	54,06	324,72	604,36

	Leucine incorporation (pmol/g.h)	Bacteria (µg C/g)	Thymidine (pmol/g.h)	Leucine (pmol/g.h)	Thym/bac	Leu/bac	DNA bands (number)
<b>De Blauwe Hel</b>	4771,72	1554,30	505,39	4771,7	0,33	3,07	53
	8791,81	970,52	271,27	8791,8	0,28	9,06	52
		1162,79	280,53		0,24	0,00	54
<b>Duin en Kruidberg</b>	269,15	2,73	12,46	269,1	4,56	98,58	54
	11,29	24,94	-4,91	11,3	-0,20	0,45	56
	-26,54	4,22	-5,99	-26,5	-1,42	-6,29	47
<b>Eendenkooi 't Broek</b>	356,85	123,12	19,90	356,8	0,16	2,90	59
	334,88	7,38	30,38	334,9	4,12	45,39	52
	302,18	13,76	54,06	302,2	3,93	21,97	55



## Bijlage XIV. Resultaten nematodentellingen

*Aantal nematoden (gemiddelde $\pm$ SD) in 100 gram veldvochtige grond*

locatie	grondsoort	totaal	bacterivoren	fungivoren	herbivoren	omnivoren/ predatoren
Eendenkooi 't Broek	klei	5060 $\pm$ 975	1083 $\pm$ 510	265 $\pm$ 35	3232 $\pm$ 1715	478 $\pm$ 300
Duin en Kruidberg	zand	1790 $\pm$ 575	1287 $\pm$ 609	46 $\pm$ 2	379 $\pm$ 61	75 $\pm$ 50
De Blauwe Hel	veen	265 $\pm$ 55	118	23	121	2





**Bijlage XV. Gehalten aan zware metalen in dit en voorgaande onderzoeken  
(mg kg<sup>-1</sup> d.w.)**











## Bijlage XVI. Verklarende woordenlijst

AAS	Atomic Absorption Spectofotometrie. Analysetechniek voor onder andere zware metalen waarbij de te analyseren stoffen worden vergast en de concentraties in de gaswolk worden bepaald door het meten van de adsorptie van licht met een golflengte die specifiek is voor het betreffende element.
Abundantie	dichtheid waarin organismen in een bepaald gebied voorkomen.
Actuele ecologisch risico	het risico, afgeleid uit effecten die in het veld worden waargenomen als gevolg van aanwezige verontreinigingen.
Antropogeen	door mensen.
Aquatisch milieu	milieu bestaande uit water.
Bentisch milieu	milieu in de bovenste lagen van het sediment (waterbodem).
BEVER	Beleidsvernieuwing Bodem. Recentelijke beleidsomgeving waarin de risico's van bodemverontreiniging worden gerelateerd aan de functie of de bodemgebruiksvorm van de locatie.
Bioassays	analysemethode waarbij met behulp van aan een milieumonster toegevoegd toetsorganisme de kwaliteit van het monster wordt bepaald.
Idem, acuut	bioassay met een blootstellingsduur die kort is in vergelijking met de levensduur van het toetsorganisme. Acute bioassays meten daardoor vaak alleen parameters zoals immobiliteit of overleving.
Idem, chronisch	bioassays met een blootstellingsduur die lang is in vergelijking tot de levensduur van het toetsorganisme en daardoor meerdere levensstadia kan omvatten. Veel gemeten parameters zijn groei en reproductie.
Biologische beschikbaarheid	de fractie van de in het milieu aanwezige chemicaliën (verontreinigingen, voedingsstoffen) die door de organismen kan worden opgenomen.
Combinatietoxiciteit	het toxische effect van twee of meer chemicaliën in een mengsel. Twee of meer chemicaliën kunnen elkaars toxische werking verminderen, maar ook versterken.
Ecologische niche	milieu waarin organismen optimaal presteren.
Ecotesten	instrumenten om met behulp van biologische parameters de ernst van milieuverontreiniging te meten.
FIAAS-koude damp	analysemethode voor onder andere kwik waarbij de stof bij kamertemperatuur wordt verdampt en de concentraties in de damp worden gemeten.



GC/MS	Gas chromatografie met daaraan gekoppelde massa spectrometrie. Techniek om concentraties en samenstelling van een groot aantal organische chemicaliën te meten.
ICP/AES	Inductive Conductivity Plasma Atomic Emission Spectrometry, techniek om de concentraties aan zware metalen in een oplossing te meten.
Kwaliteitscontrole	het bij de test meenemen van een standaardgrond waarvan de resultaten bekend zijn en waarvoor geldigheidscriteria zijn opgesteld. Wanneer de resultaten van de standaardgrond voldoen aan de criteria, is de test geldig.
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer. Levert standaardgronden voor onderzoek naar het gedrag en toxiciteit van chemicaliën in de bodem.
microcoulombmetrie	analysemethode voor onder andere EOX waarbij de chloorionen worden gebonden aan zilver-ionen. De hoeveelheid stroom die nodig is om voldoende zilverionen te vormen om alle chloorionen neer te slaan is een maat voor het chloorgehalte.
NAA	Neutronen Activiteit Analyse. Analysetechniek voor onder andere zware metalen waarbij de verontreinigingen in het monsters worden geactiveerd met neutronen. Wanneer de geactiveerde atomen terugvallen in de normale toestand, komt gamma-straling vrij. Door analyse van deze straling kunnen de concentraties en samenstelling bepaald worden.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO). Ontwikkelt onder andere richtlijnen voor het bepalen van de milieurisico's van chemische stoffen.
Referentiegrond	niet verontreinigde grond die qua bodemeigenschappen niet verschilt met de te testen bodemonsters, zodat gemeten toxische effecten kunnen worden uitgedrukt ten opzichte van deze niet verontreinigde grond. Een lokale referentie is afkomstig van de onderzoekslocatie of aangrenzende percelen, een externe referentie van elders.
Veldinventarisatie	vaststellen van de milieukwaliteit aan de hand van in het veld waargenomen of in het laboratorium gemeten samenstelling en abundantie van organismen.



## Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek

- | deel | titel                                                                                                                                                                                                        |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.   | Ouboter, P.S.H., P. Bloemen, R. van den Berg, H. Eijsackers en W. Salomons, 1995<br>Kennisbehoefte actief bodembeheer.                                                                                       |
| 2.   | Guchte, C. van de, H. Eijsackers, P.J. den Besten, C.A.M. van Gestel, T. Aldenberg, T.P.Traas en P.C. de Ruiter, 1996<br>Ecotoxicologische risicobeoordeling van verontreinigde (water-)bodems - Hoe verder? |
| 3.   | Ammerlaan, R.A. en D. Pereboom, 1996<br>Monitoring en controle van bodem en grondwater - Beleidsrelevantie van monitoringssystemen.                                                                          |
| 4.   | Nijhof, A.G., 1996<br>Risicobeoordeling bij bodemverontreiniging: inventarisatie van knelpunten en oplossingsrichtingen.                                                                                     |
| 5.   | Kooper, W.F., 1996<br>Classificatie van bodemverontreiniging - Inventarisatie van mogelijkheden en knelpunten in verband met onderzoekprogrammering.                                                         |
| 6.   | Programmabureau Bodemonderzoek, 1996<br>Stimuleringsprogramma's voor bodem- en waterbodemonderzoek in Nederland, anno 1996 - Doelstellingen, programmering, toekomstvisies.                                  |
| 7.   | Schipper, L., I. Canter Cremers en R.F. Kroes, 1996<br>Vluchtige organische chloorverbinding in de bodemsaneringspraktijk en onderzoekbehoefte.                                                              |
| 8.   | Chardon, W.J., O. Oenema, O.F. Schoumans, P.C.M. Boers, B. Fraters en Y.C.W.M. Geelen, 1996<br>Verkenning van de mogelijkheden voor beheer en herstel van fosfaatlekkende landbouwgronden.                   |
| 9.   | Ouboter, P.S.H., L. Derks en Th. Edelman, 1996<br>Communicatie over bodemverontreiniging - Gesprek tussen een deskundige, een psycholoog en een ambtenaar                                                    |
| 10.  | Weenk, A., 1997<br>Beslissingsondersteuning van bodemgerelateerde werkprocessen bij gemeenten en provincies - Verkenning.                                                                                    |
| 11.  | Dobben, H.F. van, en J.H. Faber, 1997<br>Natuurontwikkeling op vervuilde bodems - Aanzet tot onderzoekprogrammering vanuit de praktijk.                                                                      |
| 12.  | Japenga, J., P.F.A.M. Römkens en J. Dolfing, 1997<br>Het concept bodemkwaliteitsbeoordeling als uitgangspunt bij het nemen van beslissingen op het gebied van de ruimtelijke ordening en bodemsanering.      |
| 13.  | Programmabureau Bodemonderzoek, 1997<br>Stimuleringsprogramma's voor bodem- en waterbodemonderzoek in Nederland anno 1997.                                                                                   |
| 14.  | Munckhof, G.P.M. van den, M.F.X. Veul, C.A.M. van Gestel en J. Bloem, 1998<br>Bodemkwaliteitsparameters - stimulering gebruik ecotesten.                                                                     |
| 15.  | Nijhof, A.G. and J.G.M. Koolenbrander, 1998<br>Assessing risks from soil pollution: inventory of bottlenecks and possible solutions <sup>1)</sup> .                                                          |
| 16.  | Rutgers, M., J. Faber, J. Postma en H. Eijsackers, 1998<br>Locatiespecifieke ecologische risico's: Een basisbenadering voor functiegerichte beoordeling van bodemverontreiniging.                            |
| 17.  | Koopmans, G.F., W.J. Chardon, J. Bril, P.C. de Ruiter and J. Dolfing, 1998<br>Applicability of immobilizing agents for the remediation of heavy metal polluted soils in The Netherlands.                     |

18. Derks, L., 1998  
Gedachtenmonsters. Gesprekken over de beleving van bodemverontreiniging.
19. Schelwald-van der Kley, A.J.M., S.W. Moolenaar en P. Doelman, 1999  
Kennishoofte en kennisaanbod ten aanzien van gedrag en effecten van verontreinigingen in de diepere ondergrond.
20. Welling, R.B.A.M. en J.J. van der Waarde, 1999  
Verkennde studie naar de ontwikkeling en normalisatie van bodemonderzoekmethoden.
21. Canter Cremers, I., E.O.A.M. de Swart, E. Turnhout en A. Souren, 1999  
Zienswijzen natuurontwikkeling op verontreinigde gronden.
22. Chardon W.J. and H.G. van Faassen, 1999  
Soil indicators for critical source areas of phosphorus leaching
23. Van der Gun J.H.J. en J. Joziase, 1999  
In-situ waterbodemsanering - voorstelbaar en haalbaar?
24. Japenga J., 1999  
Fytoremediëring: Klaar voor gebruik in Nederland?
25. Leenaers H., J. de Boer, D. Boels, M. Hoogerwerf en A. Weenk, 1999  
Bodemkwaliteitsbeeld 2005: de lokale en regionale informatiebehoefte.
26. Timmermans G.H.F., samensteller, 1999  
Transformatie - Van PGB0 naar SKB.
27. Muijs B., M.F.X. Veul, W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, Wei Chun Ma en J. Bloem, 2000  
Haalbaarheidsonderzoek databank ecotesten als basis voor ecologische risico-beoordeling.
28. Rutgers M., J. Faber, J.F. Postma and H. Eijsackers, 2000  
Site-specific ecological risks: A basic approach to the function-specific assessment of soil pollution<sup>2</sup>).
29. Rutgers M., J.F. Postma en J.H. Faber, 2000  
Uitwerking van de Basisbenadering voor de locatiespecifieke, functiegerichte, ecologische risicobeoordeling van bodemverontreiniging voor de praktijk.
30. Otte J.G., P.F.A.M. Römken, A. Tiktak en W. de Vries, 2000  
Partitierelaties voor zware metalen (Cd, Cu, Pb, Zn) voor diffuus verontreinigde Nederlandse bodems.
31. Japenga J., L.A. Bouwman, J. Harmsen, P.F.A.M. Römken, C. Draaisma en A.J. Zweers, 2000  
Fytoremediëring - Experimenteel onderzoek naar het gebruik van planten voor kwaliteitsverbetering van verontreinigde grond en baggerspecie.
32. Nijboer M.H., S.C. Bos, M. Hoogerwerf, J. Joziase en J. Raes, 2000  
RMK voor de sanering van waterbodems - Een verkenning van mogelijkheden.
33. Witte L., H. Leenaers en E.R.V. Busink, 2000  
Bodemkwaliteit in het rivierbed - Over de toekomstige rol van bodemkwaliteitskaarten in de vergunningverlening en handhaving bij inrichtingsmaatregelen in het rivierbed.
34. Boels D., A.J. Zweers, J.G. te Beest, P.F.A.M. Römken en J. Bril, 2000  
Evaluatie actief bodembeheer Krimpenerwaard - Een methode voor de verificatie van de landbouwkundige risico's (Tussenrapport, fase 1).
35. Veul M.F.X., B. Muijs en H.J.P. Eijsackers, 2000  
Bagger op de kant - Openstaande kennisvragen.
36. Muijs B., W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, J. Bloem en W.C. Ma, 2000  
Genereren en beoordelen van referentiegegevens voor terrestrische ecotesten.

- 1) Engelse versie van deel 4
- 2) Engelse versie van deel 16