

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIËNE
BILTHOVEN

rapportnr. 719102043

**Toxische effecten van combinaties
van cadmium, zink en koper
op terrestrische oligochaeten
in relatie tot bodem-chemische interacties**

L. Weltje, L. Posthuma, F.C. Mogo*, E.M. Dirven-
van Breemen & R.P.M. van Veen

april 1995

* IHE-student, Delft.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht en ten laste van
Directoraat Generaal Milieubeheer, directie Bodem,
Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer,
Rijnstraat 8, 2515 XP Den Haag.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, 3721 MA Bilthoven.
telefoon: 030-743015, telefax: 030-251925

VERZENDLIJST

1 t/m 3	Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Bodem
4	Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer - dr.ir. B.C.J. Zoeteman
5	Prof.dr. W. Seinen (UU/RITOX, Utrecht)
6	Dr. J.L.M. Hermens (UU/RITOX, Utrecht)
7	Prof.dr. N.M. van Straalen (VU, Amsterdam)
8	Dr.ir. C.A.M. van Gestel (VU, Amsterdam)
9	Drs. P.J. Hensbergen (VU, Amsterdam)
10	Dr. M.H.S. Kraak (UvA, Amsterdam)
11	Prof. W.H. van Riemsdijk (LUW, Wageningen)
12	Drs. G. Korthals (LUW, Wageningen)
13	Dr.ir. W.-C. Ma (IB-DLO, Arnhem)
14	Dr. J.J. Vegter (TCB, Den Haag)
15	Dr. J. Hemelraad (GTD Oost-Brabant, Boxtel)
16	Drs. M.P.J.C. Marinussen (LUW, Wageningen)
17	Drs. A.C.C. Plette (LUW, Wageningen)
18	Drs. S.M.G.J. Pelgrom (KUN, Nijmegen)
19	Dr. B. Muys (Universiteit van Gent, België)
20	Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
21	Directie RIVM
22	Dr.ir. G. de Mik
23	Dr. H.J.P. Eijsackers
24	Drs. J.H. Canton
25	Dr.ir. J. Notenboom
26	Ir. T.H.M. Hamers
27	Drs. J.C. Boonman
28	Dr. P. van Beelen
29	Drs. T. Aldenberg
30	Dr.ir. W.J.G.M. Peijnenburg
31	ir. R.P.T. Janssen
32	Dr.ir. M.A.G.T. van den Hoop
33	Dr.ir. D. van de Meent
34	Drs. Th.P. Traas
35	Dr. M.P.M. Janssen
36	Dr. W. Slob
37	Ir. R. van den Berg
38	Dr.ir. F.A. Swartjes
39	Dr. W.H. Könemann
40	Dr.ir. M.N. Pieters
41	Dr. G.H. Crommentuijn
42	Drs.ing. P. Kreule
43	Drs. M.F.W. Waitz

44 t/m 50	Auteurs
51	SBD/Voorlichting & Public Relations
52	Bureau Rapportenregistratie
53 t/m 54	Bibliotheek RIVM
55 t/m 74	Reserve-exemplaren ten behoeve van Bureau Rapportenbeheer
75	Depot ECO

VOORWOORD

Dit rapport is de neerslag van twee jaar praktisch en theoretisch onderzoek naar de effecten van metaalcombinaties op bodemorganismen in het kader van het project Effect Assessment Milieu (voorheen Eco-effecten geheten).

Voor hun bijdrage aan dit onderzoeksproject in de vorm van analyses, discussies en adviezen worden bedankt: Jos Notenboom, Rob Baerselman, Tom Aldenberg, Dick Scholten, Abdi Kalif, Peter Melis, Janneke Hoekstra, Cinthia Griffioen, Elly Smit en Paul Hensbergen.

INHOUD

VERZENDLIJST	2
VOORWOORD	4
INHOUD	5
ABSTRACT	7
SAMENVATTING	8
1. INLEIDING	9
1.1 Aanleiding	9
1.2 Doelstelling	10
1.3 Verantwoording van gemaakte keuzes	10
2. COMBINATIETOXICOLOGIE	15
2.1 Definities	15
2.2 Verwarring van begrippen	16
2.3 Bestudering van mengsels	17
2.4 Modellen voor de analyse van combinatie-effecten	18
2.5 Opzet voor combinatietoxiciteitsexperimenten	23
3. MATERIAAL EN METHODEN	25
3.1 Materialen	25
3.2 Metaal-analyses	26
3.3 Experimentele opzet	28
3.4 Concentratie-effect modellen	30
4. RESULTATEN	33
4.1 Uitgevoerde experimenten	33
4.2 Bodemchemie en opname van zware metalen	34
4.3 Effecten van enkelvoudige blootstelling	42
4.4 Effecten van meervoudige blootstelling	47
5. DISCUSSIE EN CONCLUSIES	53
5.1 Proefopzet	53
5.2 Effecten van metalen op pot- en compostwormen	56
5.3 Vergelijking met andere mengselexperimenten	57
5.4 Eindconclusies	59
6. BELEIDSMATIGE ASPECTEN	61
6.1 Inleiding	61
6.2 Streefwaarden en normstelling voor mengsels	61

6.3	Beoordeling van verontreinigde lokaties met interventiewaardes	62
6.4	Complexiteit van het bodemecosysteem	64
6.5	Aandachtspunten	65
REFERENTIES		67
Bijlage 1:	Parameterwaarden voor concentratie-effect curves van <i>Eisenia</i> -experimenten	73
Bijlage 2:	Parameterwaarden voor concentratie-effect curves van <i>Enchytraeus</i> -experimenten	74
Bijlage 3 t/m 11:	Ruwe data van de <i>Eisenia</i> -experimenten 1 Ea t/m 9 Ea	75
Bijlage 12 t/m 16:	Ruwe data van de <i>Enchytraeus</i> -experimenten 10 Ec t/m 14 Ec	86

ABSTRACT

The joint toxicity of binary heavy metal combinations of cadmium, copper and zinc to *Eisenia andrei* and *Enchytraeus crypticus* was studied in a standardised OECD artificial soil system. Also soil-chemical behaviour of the metals was studied using the Freundlich-isotherm, because a large influence of the soil matrix can be expected on the available fraction of metals for these organisms. The uptake of metals by worms is probably through the skin via the soil water phase. Thus, CaCl₂-extraction procedures were used to determine the available metal concentrations. Dose-response curves were established by using these and total metal concentrations to quantify the effect of the soil matrix on the toxicity of metals.

By applying the toxic unit concept and the isobolographic method, effects of mixtures were evaluated. All metal combinations appeared to have a less than concentration-additive effect on the reproduction of the worms. EC₅₀-values for the mixtures varied between 1.5 and 3 indicating that a 50 % reduction of reproduction activity was established when using a 1.5 to 3 times higher concentration of metals as was expected from the toxicity of individual metals.

When metal concentrations of mixtures were expressed as extractable concentrations a decrease of the EC₅₀ was observed indicating a higher toxicity of the mixture due to soil-chemical interactions. Our soil-chemical results confirmed this by means of the differences in extractability between cadmium and zinc, resulting in an increasing cadmium/zinc ratio in toxic units in the extractable fractions. Competition between cadmium and zinc for soil sorption sites could not be demonstrated with our results.

By the derivation of the Dutch reference values for soils a factor of 100 is used, partly to protect the ecosystem for possible chemical interactions among contaminants. This factor seems to be safe when heavy metals are concerned. At the level of intervention values the joint toxicity of contaminants is ignored. At these higher concentrations more interaction and competition is expected due to saturation of soil sorption sites. In this report a method is proposed to evaluate contaminated sites taking toxicant interactions into account.

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de effecten en milieu-chemie van binaire combinaties van cadmium, zink en koper op de reproductie van twee wormsoorten (*Eisenia andrei* en *Enchytraeus crypticus*) in een standaardtoets met OECD-kunstgrond.

Het grote verschil tussen aquatische en terrestrische systemen is de aanwezigheid van de vaste bodemfase, die een belangrijke rol speelt bij sorptieprocessen, die voor een belangrijk deel de biobeschikbare fractie van een stof bepalen. Door de toxiciteitswaarnemingen te interpreteren met totale en extraheerbare metaalconcentraties, wordt de invloed van binding aan de bodemmatrix op de respons van bodemorganismen gekwantificeerd. Tevens zijn extraheerbare concentraties versus totaalconcentraties met Freundlich-isothermen bestudeerd. Effecten op de reproductie worden met het toxic unit model en het isobogram-model beschreven.

Alle toegepaste metaalcombinaties hebben een minder dan concentratie-additief effect op de reproductie van beide wormsoorten. Dat betekent dat de metalen elkaars toxiciteit deels opheffen of onafhankelijk van elkaar werken. De EC_{50} -waarden voor de toegepaste metaalmengsels hebben een grootte van 1.5 tot 3 Toxic Units. Dat betekent dat er 1.5 tot 3 keer zo veel metaal nodig is om 50 % effect te bereiken als verwacht wordt op grond van de concentratie-effect curves van de individuele metalen. Bij gebruik van extraheerbare concentraties verschuift het combinatie-effect in de richting van concentratie-additie ($EC_{50} \approx 1$ TU). Dit duidt op interacties op het niveau van de bodemmatrix. Milieu-chemisch heeft cadmium -het meest toxische metaal- een hogere beschikbaarheid dan zink en is daardoor in de extracten van het mengsel steeds sterker vertegenwoordigd. Deze verschuiving van de cadmium/zink-ratio kan een veranderende respons teweeg brengen. Voor competitie tussen metalen om sorptieplaatsen in de bodem is geen eenduidig bewijs gevonden.

Voor normstelling van mengsels van metalen lijkt concentratie-additie vooralsnog een veilige benadering. De factor 100 voor de afleiding van streefwaarden voldoet hierin. Bij de huidige interventiewaarden wordt geen rekening gehouden met combinatie-effecten, terwijl juist bij hoge concentraties meer competitie op bodem-chemisch niveau verwacht wordt, omdat er verzadiging van sorptieplaatsen optreedt. Door deze verzadiging wordt er relatief meer metaal beschikbaar. Door bij interventiewaarden concentratie-additie toe te passen (concentraties van toxicanten worden als fractie van hun interventiewaarde uitgedrukt) kan een evenwichtiger beoordeling van verontreinigde lokaties plaatsvinden. In dit rapport is een aanzet voor de te hanteren methodiek gegeven.

1. INLEIDING

1.1 Aanleiding

De aanleiding voor dit onderzoek naar combinatie-effecten van zware metalen bij bodemevertebraten is de vraag naar wetenschappelijke gegevens omtrent de toxiciteit van metaalcombinaties voor het bodemecosysteem. Deze vraag komt voort uit de wens inzicht te krijgen in de ecotoxicologische risico's van elkaar wederzijds beïnvloedende toxische stoffen. Kennis omtrent mengseltoxiciteit is nodig om de risico's van bodemverontreinigingsgevallen in te kunnen schatten, omdat daarbij nagenoeg altijd sprake is van combinaties van verontreinigende stoffen. Door het ontbreken van gegevens is dit onderzoek daarom in eerste instantie gericht op de technisch-wetenschappelijke aspecten van combinatietoxicologie van zware metalen, daarnaast gaat het in op de beleidsmatige vertaling ervan.

In het Nederlandse bodembeschermingsbeleid wordt rekening gehouden met mogelijke interacties van verontreinigende stoffen door bij vaststelling van het verwaarloosbaar risico (VR) het maximaal toelaatbaar risico (MTR) te delen door een veiligheidsfactor van 100. Het MTR is ecotoxicologisch gekoppeld aan de HC₅, die stofconcentratie (Hazardous Concentration) waarbij 5 % van de soorten in het (bodem)ecosysteem mogelijk schade ondervindt (van Straalen & Denneman, 1989; Aldenberg & Slob, 1993). Het VR is het risiconiveau waarvan beleidsmatig de *streefwaarde* voor stoffen in de bodem is afgeleid. De factor 100 tussen het VR en het MTR moet enerzijds voldoende bescherming bieden tegen mogelijk optredende combinatiewerkingen en anderzijds compenseren voor onzekerheden in de risicoschatting. Daarnaast moet de factor 100 voldoende ruimte bieden om het MTR en VR beleidsmatig van elkaar te kunnen onderscheiden (VROM, 1989). Het hanteren van een factor 100 tussen MTR en VR is momenteel een beleidsmatige keuze, waarvoor geen goede wetenschappelijke onderbouwing gegeven is.

Naast de streefwaarde kent het Nederlandse bodembeschermingsbeleid de *interventiewaarde*, bij overschrijding waarvan er sprake is van saneringsnoodzaak. De risicogrens waarvan de interventiewaarde is afgeleid is het ernstig gevaarniveau. Ecotoxicologisch is dit gekoppeld aan de HC₅₀, die concentratie van een stof waarbij 50 % van de soorten in het (bodem)ecosysteem mogelijk schade ondervindt (Crommentuijn *et al.*, 1994). In tegenstelling tot de streefwaarde, wordt bij de afleiding van de interventiewaarde geen rekening gehouden met combinatiewerkingen van verontreinigende stoffen. Impliciet betekent deze keuze dat een saneringsnoodzaak niet aanwezig is als twee of meer stoffen net onder hun interventiewaarde op een lokatie aanwezig zijn. De mogelijke consequenties hiervan zullen in dit rapport worden besproken.

De ecotoxicologische onderbouwing van de *streef-* en *interventiewaarde* is gebaseerd op laboratoriumtoxiciteitsgegevens van enkelvoudige stoffen. Verontreinigingen bestaan echter zeer zelden uit pure stoffen, zoals die in een laboratorium-situatie worden toegepast. Op verontreinigde lokaties is het vóórkomen van een combinatie of mengsel van stoffen eerder regel dan uitzondering. Organismen die op of in de bodem leven, zullen dus vaak blootgesteld worden aan mengsels. Het opstellen van een beleidsadvies, waarin op een technisch-wetenschappelijke manier rekening wordt gehouden met combinatie-effecten van verontreinigende stoffen, is eveneens een doel van dit onderzoek.

Om normen op te stellen voor een groep verwante stoffen (of voor stoffen die vaak in combinatie voorkomen) zijn gegevens nodig over de toxiciteit van mengsels van die stoffen. In de literatuur zijn weinig gegevens te vinden met betrekking tot systematisch onderzoek naar de toxiciteit van mengsels in het bodemecosysteem. Wel zijn er enige terrestrische studies voorhanden, waarin een

effect wordt aangetoond van de aanwezigheid van een stof op de opname of de interne concentratie van een andere stof (voor zware metalen zie onder andere Beyer *et al.*, 1982; van Capelleveen, 1987 en Tranvik, 1992). Methodieken om combinatiewerkingen en -effecten van stoffen te beschrijven kunnen gevonden worden in aquatisch-toxicologische en farmacologische literatuur (Sprague, 1970, De March, 1987, Ashford, 1981 en Gessner, 1988). In dit onderzoek zullen deze methodieken op bruikbaarheid voor de bodemecotoxicologie worden onderzocht. De aquatisch-toxicologische literatuur bevat, naast methodiek, gegevens over combinatie-effecten van metaalmengsels bij aquatische evertibraten, waarmee de resultaten uit dit onderzoek vergeleken kunnen worden. Voor bodemorganismen die via de huid aan (in het bodemvocht opgeloste) toxicanten zijn blootgesteld, kan een soortgelijke metaalinteractie in het dier zelf worden verwacht als in aquatische organismen uit een vergelijkbare diergroep. Het grote verschil in blootstelling tussen aquatische en terrestrische organismen is de matrix waarin de dieren blootgesteld worden. De bodem beschikt over vele sorptieplaatsen in de vorm van organisch materiaal (humuszuren) en kleideeltjes die een belangrijke rol spelen in de verdeling van een stof over de vaste en vloeibare bodemfase. Het is bekend dat zware metalen door verdringingsreacties elkaars sorptiegedrag in de bodem beïnvloeden (zie onder andere Chardon, 1984) waardoor de beschikbaarheid van een metaal in de bodem verandert als gevolg van de aanwezigheid van andere metalen. Het gevolg is dat het terrestrisch milieu ten opzichte van het aquatisch milieu een extra interactie-laag heeft, in de vorm van de vaste bodemfase. In dit onderzoek zal om deze reden óók aandacht worden besteed aan de interacties van metaalionen op bodem-chemisch niveau. Door alle effectwaarnemingen te interpreteren met behulp van zowel totale als extraheerbare metaalconcentraties, wordt getracht het effect van de bodemmatrix op de respons van bodemorganismen op metaalcombinaties te kwantificeren. Tevens zijn de bodemchemische gegevens uitgewerkt met behulp van de Freundlich-isotherm.

1.2 Doelstelling

Het doel van deze studie is tweeledig. Ten eerste: het genereren van toxiciteitsgegevens van combinaties van zware metalen voor verschillende bodemorganismen. Ten tweede: het doen van beleidsaanbevelingen ten aanzien van de omgang met mengsels van contaminanten in het terrestrische milieu.

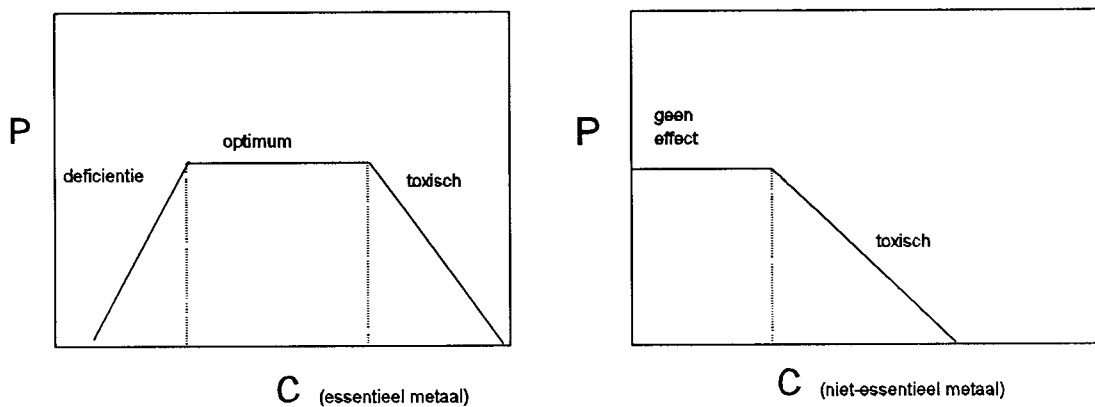
Daartoe zijn toxiciteitsexperimenten in kunstgrond uitgevoerd met twee vertegenwoordigers van de klasse der oligochaeten (borstelwormen) te weten: de compostworm *Eisenia andrei* en de potworm *Enchytraeus crypticus*. Tijdens deze experimenten met cadmium, koper en zink werden bepalingen gedaan aan chemische interacties in de bodem en aan de effecten van deze zware metalen op de reproductie van de wormen. Aan de hand van definities en twee verschillende modellen worden de verkregen resultaten in termen van mengseltoxiciteit beschreven, geïnterpreteerd en vergeleken met literatuurgegevens uit de terrestrische en aquatische ecotoxicologie. Tot slot worden beleidsmatige aspecten van combinatietoxiciteit besproken.

1.3 Verantwoording van gemaakte keuzes

Stoffen.

In het kader van dit onderzoek naar combinatietoxiciteit is gekozen voor de stoffen cadmium, zink en koper. De keuze van cadmium en zink lag voor de hand, daar deze combinatie in het milieu

frequent als bodemverontreiniging voorkomt en met betrekking tot dat aspect beleidsrelevant is. De voornaamste oorzaak voor dit verschijnsel is dat zinkerts van nature verontreinigd is met cadmium (0.2-0.4 massaprocent (Webb, 1979)). Tevens bood deze keuze een goede aansluiting met het "Validatieproject", een samenwerkingsproject van TNO Milieuwetenschappen, RIVM en de Vrije Universiteit Amsterdam, waarin zware metalen centraal staan. Voornoemd project beoogt inzicht te verkrijgen in de veldrelevantie van laboratorium-toxiciteitsgegevens (Notenboom & Posthuma, 1994). Daarnaast is de combinatie van een essentieel metaal (zink, koper) en een niet-essentieel metaal (cadmium) vanuit wetenschappelijk oogpunt interessant wegens het verschillend gedrag van deze stoffen in biota. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van afbeelding 1, waarin het verband weergegeven is tussen effect en concentratie voor een essentieel en een niet-essentieel metaal (naar Hopkin, 1989).



Afbeelding 1. Verband tussen concentratie C en effect op prestatie maat P voor (links) een essentieel metaal en (rechts) een niet-essentieel metaal (naar Hopkin, 1989).

Veel organismen, waaronder regenwormen, zijn in staat de lichaamsconcentratie van zink te reguleren, in tegenstelling tot die van cadmium (van Gestel *et al.*, 1993). Cadmium vertoont grote chemische gelijkenis met zink (Webb, 1979) en fysiologische interacties van deze metalen zijn reeds bij veel aquatische evertrebraten waargenomen (onder andere bij de watervlo *Daphnia magna* (Bodar, 1989), de tubificide worm *Limnodrilus udekemianus* (Back, 1990), de zeester *Asterias rubens* (den Besten, 1991) en de zwanemossel *Anodonta cygnea* (Hemelraad, 1988)). Koper, eveneens een essentieel metaal, vertoont net als zink grote gelijkenis met cadmium en interacties op metabolisch niveau tussen deze twee metalen zijn regelmatig gevonden, onder andere bij vliegen (Aoki & Suzuki, 1984) en kevers (Medici & Taylor, 1967). Combinaties van koper, zink en cadmium worden regelmatig in experimenteel werk toegepast, omdat er juist interactie verwacht wordt op grond van de chemische verwantschap van deze metalen. Volgens het classificatieschema van Nieboer & Richardson (1980) zijn cadmium en koper klasse B metalen; metalen met een voorkeur voor stikstof- en zwavelhoudende groepen, en is zink een metaal uit de "tussengroep", wat inhoudt dat zink zowel klasse A als B eigenschappen heeft. Metalen uit klasse A hebben vooral affiniteit voor zuurstofhoudende groepen. Deze indeling van metalen is van belang voor het transport over celmembranen en de intracellulaire opslag in granula en de vorming van metaalbindende eiwitten (van Straalen & Verkleij, 1991). In het periodiek systeem staan zink en cadmium onder elkaar in groep IIB wat inhoudt dat hun buitenste elektronenconfiguratie grote gelijkenis vertoont, maar dat cadmium groter en zwaarder

is dan zink. Koper, uit groep IB, staat naast zink in het periodiek systeem en is daarom ongeveer even groot en zwaar als zink. In tabel 1 staan de molmassa en ionstralen van de besproken metalen vermeld, om aan te geven hoe de onderlinge verhoudingen zijn. Deze, en andere fysisch-chemische aspecten, geven informatie over de verwantschap van metalen; aspecten die van belang zijn voor hun toxiciteit, biobeschikbaarheid en in het algemeen voor hun gedrag in het milieu en in biota (Bryan & Langston, 1992).

Tabel 1. Ionstraal en molmassa van cadmium, koper en zink
(uit: Handbook of chemistry and physics, 1974).

metaal (2 ⁺ ion)	ionstraal (in Å)	molmassa
Cd	0.97	112.40
Cu	0.72	63.55
Zn	0.74	65.38

Organismen.

De compostworm *Eisenia andrei* en de potworm *Enchytraeus crypticus* zijn in dit onderzoek gekozen als vertegenwoordigers van de bodemvertebratenfauna, omdat deze organismen een belangrijke rol vervullen in het ecosysteem, wijd verbreid zijn en zware metalen kunnen accumuleren (zie onder andere Edwards & Lofty, 1977; Edwards, 1992 en Dirven-van Breemen *et al.*, 1994). Daarnaast zijn ze gemakkelijk te kweken in het laboratorium. Voor beide organismen is een gestandaardiseerde methode beschikbaar om het effect van toxicanten in kunstgrond op de reproductie vast te stellen en zijn massakweken aanwezig op het Laboratorium voor Ecotoxicologie van het RIVM.

Deze hermafrodiete -tweeslachtige- vertegenwoordigers der Oligochaeta (Annelida) -borstelwormen (ringwormen)- worden door hun weke huid en ondergrondse leefwijze voornamelijk blootgesteld aan toxicanten via hun huidoppervlak (van Gestel, 1991 en Dirven-van Breemen *et al.*, 1994). Deze blootstellingswijze, waarbij organismen de toxicant voornamelijk uit de waterfase van de bodem opnemen, maakt het zinvol bodemchemische processen, die een rol spelen bij de verdeling van een stof over de vaste en vloeibare bodemfase, te bestuderen. Op deze manier kan de relatie tussen toxiciteit en beschikbaarheid bestudeerd worden.

Metaal-extracties.

Om de biobeschikbare metaalfraction voor wormen te benaderen en metaalgedrag in de bodem te bestuderen is gebruik gemaakt van twee extractiemethoden, 0.01 M CaCl₂ extractie en 0.43 M HNO₃-extractie. Voor bepaling van metalen met behulp van de 0.01 M CaCl₂ extractie werd in dit onderzoek gekozen om de volgende redering. De met deze methode geëxtraheerde metaalfraction correleert goed met interne concentraties van metaalblootgestelde planten (Häni & Gupta, 1985). Planten betrekken hun nutriënten voornamelijk uit de bodemoplossing. Daar wormen voornamelijk via hun permeabele huid worden blootgesteld aan opgeloste toxicanten (Rietra & Ma, 1994) wordt van deze methode verwacht dat het de voor wormen beschikbare metaalfraction benadert.

Salpeterzuur (0.43 M) is een sterker extractans en maakt meer metaal vrij in oplossing. De HNO₃-extractie kan hiermee informatie geven over de chemische beschikbaarheid en eventuele wederzijdse beïnvloeding van metalen op een niveau dat de totaalconcentratie benadert.

Effectparameter en toxicologisch eindpunt.

In dit onderzoek is de chronische effectparameter reproductie bestudeerd. Voor *Eisenia andrei* werden coconproductie en het aantal juvenielen per tijdsperiode bepaald en voor *Enchytraeus crypticus* alleen het aantal juvenielen (bepaling van de coconproductie is bij *Enchytraeus* niet mogelijk omdat cocons door hun grootte niet uit de bodem kunnen worden geëxtraheerd). Daarnaast is een gevoelige parameter -reproductie i.p.v. sterfte- beter bruikbaar om mengseltoxiciteit te bestuderen, omdat de specifieke werking van stoffen dan beter tot uiting komt (Deneer, 1988). Bij een parameter als sterfte zijn er zó veel factoren in het geding die de vitaliteit van een organisme beïnvloeden, dat iedere toxische stof in een mengsel er op zijn eigen manier een bijdrage aan levert. Dit komt tot uiting in een concentratie-additieve werking van het mengsel (Denneman & van Gestel, 1990).

Als toxicologisch eindpunt in de experimenten is de 50 % effectconcentratie gekozen (EC_{50}) omdat dit punt het meest betrouwbaar te schatten is uit een sigmoïdale concentratie-effect curve die door een aantal observaties wordt gefit. Het EC_{50} -punt is het meest betrouwbaar, omdat het ligt op het steilste deel van de curve; en zodoende de laagste variatie heeft op de concentratie-as (X-as). Hoewel in het bodembeschermingsbeleid normering van toxicanten gericht is op NOEC-niveau (No Observed Effect Concentration) is niet gekozen voor dit toxicologisch eindpunt, omdat de NOEC in vergelijking tot de EC_{50} veel gevoeliger is voor variatie, dus minder stabiel is (zie Noppert *et al.*, 1994, voor een uitgebreide discussie rond de NOEC). Met de in dit rapport gevolgde benadering (zie 2.3) is generalisatie van de conclusies op basis van EC_{50} -waarnemingen naar andere concentratieniveaus toegestaan.

2. COMBINATIETOXICOLOGIE

2.1 Definities

Aan de in dit rapport gehanteerde terminologie liggen een aantal concepten ten grondslag over de al dan niet aanwezige chemische interactie van stoffen en hun werkingsmechanismen. Met werkingsmechanisme wordt hier bedoeld de manier waarop een stof aangrijpt op een receptor. Met interactie wordt bedoeld de beïnvloeding van de toxiciteit van een stof door de andere stof. Interacties kunnen op grofweg drie verschillende niveaus plaatsvinden: het *milieuchemisch* niveau, het *toxicokinetisch* niveau (tijdens fysiologische processen zoals opname, transport, verdeling, excretie en accumulatie) en op het niveau van de target: het *toxicodynamisch* niveau (Calamari & Alabaster, 1980). In tabel 2 staan de vier mogelijke combinaties van twee toxische stoffen voor wat betreft werking en interactie (naar Hewlett & Plackett, 1959).

Tabel 2. Mogelijke combinatiewerkingen van twee stoffen.

interactie ↓ werking →	gelijke werking	ongelijke werking
geen interactie	eenvoudig concentratie-additie	onafhankelijk respons-additie
interactie	complex synergisme/antagonisme/potentiëring	afhankelijk synergisme/antagonisme/potentiëring

Tabel 2 geldt voor een mengsel van twee stoffen; bij een mengsel van meer dan twee stoffen zijn uiteraard allerlei tussenvormen van bovengenoemde combinatiewerkingen mogelijk (Könemann, 1981).

De vier combinatiewerkingen uit de tabel dienen als basis voor het onderscheiden van verschillende combinatie-effecten in dit rapport. Onderstaande definities van combinatie-effecten worden in dit rapport gebruikt zonder vooronderstellingen over het daadwerkelijke werkingsmechanisme van de stoffen in het mengsel. Met andere woorden: het effect is maatgevend voor de term.

combinatie-effecten zonder interactie (onafhankelijk/eenvoudig):

concentratie-additie:

Concentratie-additie is het verschijnsel dat de concentraties van stoffen in een mengsel optelbaar zijn, na schaling in toxiciteit. De stoffen zijn eigenlijk als verdunningen van elkaar te beschouwen. De toxiciteit van het mengsel is uit te rekenen als de toxiciteit van de individuele componenten bekend is.

respons-additie:

De toxiciteit van het mengsel hangt af van de correlatie (r , in theorie variërend van -1 tot 1) tussen gevoeligheden voor de afzonderlijke stoffen van de parameter onder studie.

Bij volledig positieve correlatie ($r = 1$) wordt de toxiciteit van het mengsel

bepaald door de relatief meest toxische component, omdat precies hetzelfde deel van de individuen in het experiment reageert op de relatief minst toxische component, wiens effect daardoor onzichtbaar wordt.

Bij volledig negatieve correlatie ($r = -1$) is het effect van een mengsel gelijk aan de som van de effecten van de stoffen afzonderlijk. Dit is de minst waarschijnlijke waarde voor r , omdat het betekent dat per stof in het mengsel een apart deel van de experimentele populatie reageert.

Bij de afwezigheid van correlatie ($r = 0$) is het effect van het mengsel (E_m) te berekenen als 1 min het produkt van de geen-effectkansen (p_A en p_B) van de afzonderlijke stoffen (A en B). In formulevorm: $E_m = 1 - p_A \cdot p_B$.

Als de correlatie van gevoeligheden kleiner is dan 1, spreekt men ook wel van partiële additie.

combinatie-effecten met interactie (afhankelijk/complex):

synergisme: treedt op als stoffen met een vergelijkbare toxiciteit in een mengsel elkaars toxiciteit verhogen; het effect van het mengsel is groter dan verwacht op grond van concentratie-additie.

antagonisme: treedt op als stoffen in een mengsel elkaars toxiciteit verlagen; het effect van het mengsel is minder dan verwacht op grond van respons-additie met $r = 1$.

potentiëring: is een vorm van synergisme, waarbij een -voor de bestudeerde parameter-niet of nauwelijks toxische stof de toxiciteit van een wel duidelijk toxische stof versterkt.

In paragraaf 2.4 komen bovenstaande begrippen terug in de afbeeldingen die dienen ter uitleg van de modellen, zodat inzichtelijk wordt hoe ze zich tot elkaar verhouden.

De getalsmatige criteria, volgens welke de begrippen gehanteerd worden bij toepassing op experimentele resultaten, zijn in paragraaf 3.4 vermeld.

2.2 Verwarring van begrippen

Bij de bespreking van combinatiewerkingen en -effecten van stoffen is het noodzakelijk om van te voren duidelijk te maken wat precies bedoeld wordt met welke term, omdat er (nog steeds) verwarring heerst over de nomenclatuur van combinatiewerkingen en -effecten. Een goed, eenduidig begrippenapparaat is belangrijk in de communicatie van wetenschappers onderling, maar ook voor die van wetenschappers met beleidmakers. De oorzaak van de niet eenduidige nomenclatuur is het ontstaan van de combinatietoxicologie uit de toxicologie en de farmacologie, in welke disciplines verschillende termen gehanteerd worden.

Verwarring van zowel combinatiewerkingen als -effecten komt helaas maar al te vaak voor. Zo worden respons- en concentratie-additie regelmatig met elkaar verwisseld of door elkaar heen gebruikt. Vaak wordt ook alleen het begrip additie gebruikt, zonder dat duidelijk is of er respons- of concentratie-additie bedoeld wordt (onder andere in VROM, 1989 en Ikeda, 1994). Deze verwarring is enigszins begrijpelijk als bedacht wordt dat concentratie-additie hetzelfde betekent

als respons-additie onder de twee voorwaarden dat a) de concentratie-effect curve lineair is en b) de correlatie tussen de gevoeligheden voor stoffen volledig negatief is. Over het algemeen echter zijn concentratie-effect relaties bij voldoende concentraties beter te beschrijven met een sigmoïdale curve. Daarnaast is een volledig negatieve correlatie tussen gevoeligheden van een parameter voor verschillende stoffen zeer onwaarschijnlijk, daar het in zou houden dat het deel van de populatie dat bijvoorbeeld niet reproduceert onder invloed van stof A volledig ongevoelig is voor stof B en vice versa.

Ook synergisme en potentiëring worden regelmatig door elkaar heen gebruikt. Ook dit is verklaarbaar, omdat het in feite relatieve begrippen zijn. Zo zou een mengsel van cadmium en koper synergistisch, een mengsel van cadmium en chloride potentiërend en een mengsel van chloride en nitraat weer synergistisch kunnen werken. Per tweetal stoffen wordt namelijk gekeken naar de toxiciteit van de één ten opzichte van de ander. Duidelijkheid zou geboden kunnen worden door (voor twee stoffen) een toxiciteitsratio af te spreken waaronder gesproken wordt van synergisme en waarboven van potentiëring. Bovendien is de relatieve toxiciteit van stoffen niet gelijk voor verschillende organismen en zelfs niet voor verschillende aan één organisme bestudeerde parameters. Een andere oplossing is niet te spreken van potentiëring of synergisme, maar van éénzijdige of wederzijdse versterking.

Voor antagonisme geldt dat het een min of meer universeel begrip is. Zowel voor twee "echt toxische" stoffen als één toxicant en een "ongevaarlijke" stof die elkaar tegenwerken, wordt dit begrip gehanteerd.

2.3 Bestudering van mengsels

Combinatiewerkingen zonder interactie (de eerste rij van tabel 2) bieden de mogelijkheid om mengsels van toxische stoffen eenvoudig kwantitatief te bestuderen. Als twee stoffen eenvoudige combinatiewerking vertonen, dus concentratie-additief werken, is het mogelijk op grond van de concentratie-effect curves van de individuele stoffen de respons van een organisme op het mengsel uit te rekenen. Bij onafhankelijk werkende stoffen is het ook mogelijk het effect van het mengsel uit te rekenen, maar dan moet naast kennis over de toxiciteit van de individuele stoffen, tevens de correlatie tussen de gevoeligheden voor de afzonderlijke stoffen van de bestudeerde parameter bekend zijn.

Concentratie-additie wordt bij de bestudering van mengseltoxiciteit vaak gehanteerd als nulhypothese. De toxiciteit van het mengsel wordt dan van te voren uitgerekend, met behulp van de concentratie-effect curves van de individuele stoffen, en vergeleken met de uitkomst van een mengseltoxiciteitsexperiment. Met behulp van statistische toetsing kan vervolgens worden bepaald of de uitkomst van het experiment significant afwijkt van de voorspelling. Een bruikbare toets voor de evaluatie van combinatie-effecten van stoffen op continu variërende parameters, zoals bijvoorbeeld de hoeveelheid geproduceerde juvenielen, is op dit moment niet voorhanden. In het verleden zijn wel toetsen ontwikkeld voor discrete parameters zoals sterfte, omdat dat nagenoeg de enige parameter was die toen bestudeerd werd (zie onder andere Hewlett & Plackett, 1979). Binaire responsen worden per concentratie vastgesteld als het percentage organismen van het totaal aantal blootgestelde individuen dat de respons vertoont. Continue responsen worden bepaald als het gemiddelde van de responsen van individuele organismen bij blootstelling aan een bepaalde concentratie. Het relateren van deze continue respons aan de maximale respons bij een gegeven concentratie is over het algemeen niet mogelijk, omdat de maximale respons vaak niet bekend is. Omzetten van een continue respons (bijvoorbeeld het aantal geproduceerde juvenielen)

naar een binaire (wel of geen juvenielen geproduceerd) heeft verlies van waardevolle informatie tot gevolg. Toetsen voor binaire -alles of niets- processen zijn aldus niet bruikbaar voor continue responsen.

Bij toetsing van de concentratie-additie hypothese wordt een gelijke werking van toxicanten verondersteld waarbij alleen een verschil in de mate van doordringing tot de receptor verschillen in toxiciteit veroorzaakt. Dit komt tot uitdrukking in gelijkvormige concentratie-effect curves voor beide stoffen. De vorm (helling) van de concentratie-effect curves van afzonderlijke stoffen zou bij concentratie-additieve werking niet significant mogen verschillen (Anderson & Weber, 1975). Volgens andere auteurs is een verschil in vorm van concentratie-effect curves van afzonderlijke stoffen wel toegestaan (Unkelbach & Wolf, 1985) omdat het concentratie-additie model een te strikte benadering volgt voor de evaluatie van de hypothese dat concentratie-additie daadwerkelijk optreedt. Plackett en Hewlett (1952) hebben als verklaring voor ongelijkvormigheid in concentratie-effect relaties de verschillen in transport- en metabolische processen van stoffen vanaf blootstellingsniveau naar een gezamenlijke receptor opgevoerd. Hun aanname bij deze verklaring was dat op receptorniveau de concentratie-effect relaties wel gelijkvormig zijn. In dit onderzoek wordt aangesloten bij de benadering van Plackett en Hewlett, waarbij ongelijkvormigheid in concentratie-effect relaties wordt toegestaan bij het gebruik van de concentratie-additie hypothese. De concentratie-effect curves worden in dit onderzoek dan ook niet getoetst op gelijkvormigheid. Een uitspraak over het mengsel met betrekking tot het effectniveau waarop geschaald is, is echter onafhankelijk van de vorm, omdat op dat niveau de concentratie-effect curves van de afzonderlijke stoffen elkaar kruisen. Een uitspraak over combinatie-effecten van de experimenteel toegepaste mengsels wordt in dit onderzoek gedaan op één effectniveau: de EC_{50} (zie 1.3 voor motivatie van de keuze voor dit toxicologische eindpunt). Generaliseren van deze uitspraak voor andere -lagere en hogere- concentratieniveaus is met de in dit rapport gevolgde benadering toegestaan.

In plaats van de termen synergisme en antagonisme, gebruiken sommige onderzoekers de termen supra- en sub-(concentratie-)additie (van Wijk *et al.*, 1994) of meer of minder dan concentratie-additief (Kraak *et al.*, 1993; Kraak *et al.*, 1994) om combinatie-effecten te karakteriseren. Dit is een manier om een uitspraak te doen over een experimentele uitkomst in relatie tot de nulhypothese van concentratie-additie en niet verstrikt te raken in de terminologie en/of om aan te geven dat er niet specifiek gekeken is naar het werkingsmechanisme van stoffen. De uitspraak is echter niet geheel neutraal, omdat er met het hanteren van concentratie-additie als hypothese impliciet een bewering wordt gedaan over het werkingsmechanisme van de bestudeerde stoffen. In dit onderzoek worden de termen concentratie-additie, respons-additie (partiële additie), synergisme en antagonisme gebruikt zoals in paragraaf 2.1 gedefiniëerd naar effectniveau (na evaluatie met behulp van de getalsmatige criteria uit 3.4). De term potentiëring wordt in dit rapport niet gehanteerd, omdat combinaties van niet of nauwelijks toxische stoffen met wel duidelijk toxische stoffen niet zijn onderzocht.

2.4 Modellen voor de analyse van combinatie-effecten

Vanaf het eind van de jaren dertig is er nagedacht over de beschrijving en kwantificering van combinatiewerkingen en -effecten van stoffen (Bliss, 1939). Vooral de farmacologie en aquatische toxicologie hebben belangrijke bijdragen geleverd aan de concept- en modelvorming rond combinatietoxicologie. In deze paragraaf worden twee modellen nader toegelicht, die als belangrijkste resultante van de afgelopen decennia theorievorming rond combinatietoxicologie te

beschouwen zijn.

Ten eerste wordt ingegaan op het *toxic unit concept* (beschreven in onder andere Sprague, 1970 en De March, 1987) en vervolgens wordt de *isobologram-methode* (beschreven in onder andere Ashford, 1981 en Gessner, 1988) besproken. Tevens zal de experimentele proefopzet bij ieder van de methoden worden toegelicht.

Het **toxic unit concept** heeft als doel stoffen optelbaar te maken, zodat de concentratie-additie hypothese getest kan worden. Daartoe worden stoffen geschaald in toxiciteit, door middel van een van te voren gekozen toxicologisch eindpunt (een EC_x die gelijkgesteld wordt aan één toxic unit (TU)). Alle concentraties van een stof i zijn nu uit te drukken in fracties van de $EC_{x,i}$ (in dimensieloze toxic units) met behulp van formule (1), waarin C_i staat voor de concentratie van stof i .

$$TU_i = \frac{C_i}{EC_{x,i}} \quad (1)$$

De concentraties van alle aanwezige componenten in een mengsel kunnen op deze manier omgerekend worden naar toxic units, mits hun individuele toxicologische eindpunten bekend zijn uit eerdere of (bij voorkeur) synchroon lopende enkelvoudige blootstellingsexperimenten. Een vergelijkbare benadering wordt ook toegepast bij groepen organochloorverbindingen (PCDD en PCB) onder de naam Toxiciteits Equivalentie Factor (TEF), waarmee aangegeven wordt hoeveel minder toxisch een bepaalde congener is dan 2,3,7,8-TCDD (van Zorge *et al.*, 1989). Onder aanname van concentratie-additie geldt voor een mengsel van n stoffen formule (2).

$$TU_{\text{mix}} = \sum_{i=1}^n TU_i \quad (2)$$

Als de concentratie-additie aanname opgaat heeft een mengsel met een totaalconcentratie van één TU een effect behorende bij het gekozen toxicologisch eindpunt (bijv. EC_{50}). In de praktijk wordt dit model vaak toegepast op *equitoxische* mengsels; dat zijn mengsels waarin elk van de aanwezige stoffen vertegenwoordigd is met een zelfde fractie van zijn EC_x . De verwachting is dat interacties tussen stoffen het best aantoonbaar zijn met equitoxische mengsels, omdat dan beide stoffen in gelijke effect-doses aanwezig zijn, volgens de concentratie-additie-hypothese. Voor een equitoxisch mengsel van n stoffen geldt formule (3). Deze formule geldt uiteraard voor alle experimentele concentraties van het equitoxische mengsel.

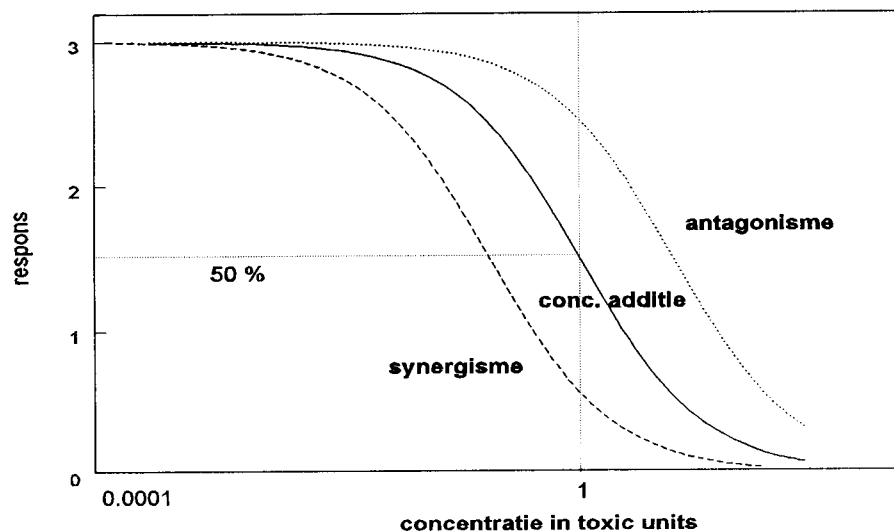
$$\frac{C_i}{EC_{x,i}} = \frac{C_j}{EC_{x,j}} = \dots = \frac{C_n}{EC_{x,n}} \quad (3)$$

Op die manier is er een concentratiereeks te maken voor het mengsel (bijv. blanco, 0.01 + 0.01, 0.1 + 0.1, 1 + 1, 10 + 10 etc. (in toxic units)) met steeds dezelfde stofverhoudingen. Door een equitoxische concentratiereeks van een mengsel experimenteel toe te passen, wordt een concentratie-effect curve gegenereerd waarmee bepaald kan worden of het mengsel inderdaad

concentratie-additief werkt. Is dat het geval, dan vindt men bij 1 TU van het mengsel het gekozen toxicologisch eindpunt terug. Zijn er voor het bereiken van de EC_x niet één maar meer toxic units nodig, dan werken de stoffen in het mengsel antagonistisch of respons-additief. Analoog aan deze redenering volgt uit het bereiken van de EC_x bij minder dan één toxic unit, dat de stoffen synergistisch werken.

Afbeelding 2 geeft een grafische representatie van de drie genoemde combinatie-effecten voor een mengsel van contaminanten. Een (significante) afwijking van het één toxic unit punt geeft dus informatie over het combinatie-effect van de stoffen in het mengsel.

De uit de farmacologie afkomstige **isobogram-methode** is een grafisch georiënteerde methode

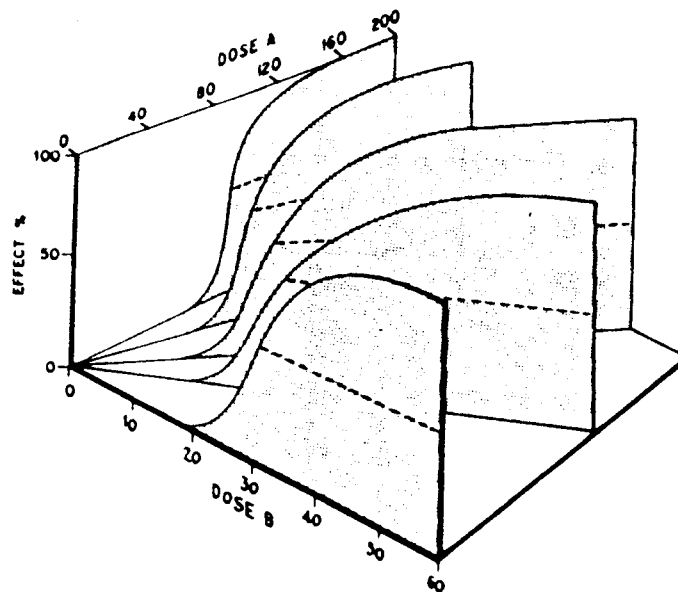


Afbeelding 2. Concentratie-effect curves voor drie mogelijke combinatie-effecten in het toxic unit concept (in dit voorbeeld is de EC_{50} als toxic unit gekozen).

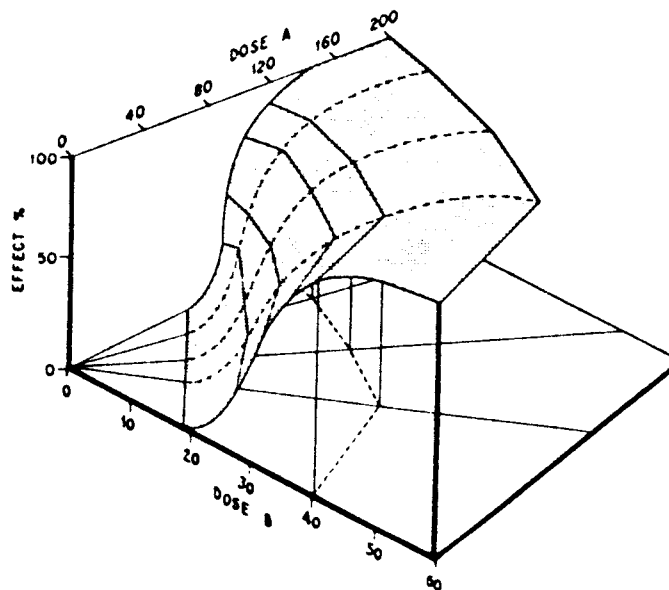
die echter ook uitstekende mogelijkheden biedt tot kwantitatieve uitwerkingen. Het grafische gedeelte van deze methode gaat verloren bij bestudering van mengsels van méér dan twee stoffen, omdat er dan in meer dan drie dimensies gewerkt moet worden, namelijk één voor het effect en één voor elke stof in het mengsel.

Voor de uitleg van het model wordt hier daarom van twee toxische stoffen uitgegaan. Een *isobool* is een iso-effectlijn, dat wil zeggen een lijn die punten verbindt met gelijke effecten. Deze contourlijnen worden afgeleid uit een concentratie-effect oppervlak, dat de respons bij alle mogelijke mengsels van twee stoffen beschrijft. Voor een redelijk betrouwbare beschrijving van dit oppervlak, waarbij vergelijking van de toxiciteit van de afzonderlijke stoffen mogelijk is, zijn minimaal drie concentratiereksen nodig: één van elke afzonderlijke stof en één van een mengsel (zie afbeelding 3).

In plaats van de concentratiereeks van één mengsel kan ook een verzameling losse punten van verschillende mengsels gebruikt worden. Met behulp van niet-lineaire regressie worden de parameters van een driedimensionaal mathematisch model geschat die het concentratie-effectoppervlak beschrijven dat het best past bij de waarnemingen (afbeelding 4).



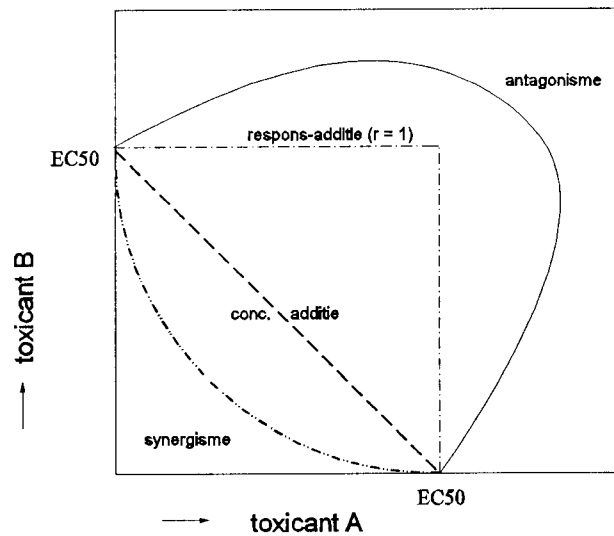
Afbeelding 3. Vijf concentratie-effect curves voor het isobolenmodel; twee voor de zuivere stoffen en drie voor verschillende mengselverhoudingen (naar Gessner, 1988).



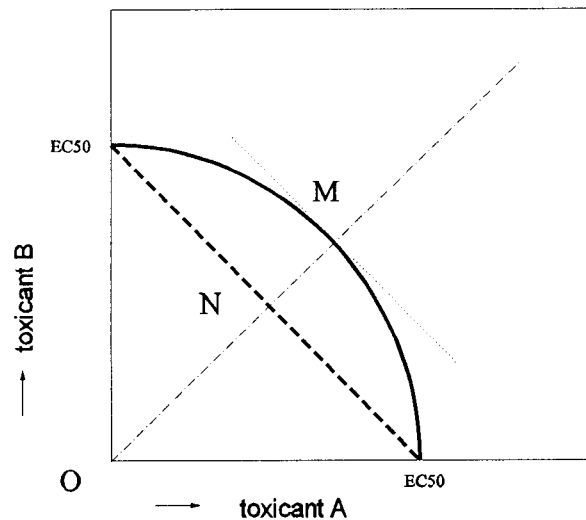
Afbeelding 4. Concentratie-effect oppervlak voor twee stoffen, gebaseerd op vijf afzonderlijke concentratie-effect relaties (zie vorige afbeelding). De isobolen zijn de op het grondvlak geprojecteerde contour- of iso-effectlijnen (naar Gessner, 1988).

De isobolen zijn de doorsneden oftewel contourlijnen van dit vlak bij gekozen effect-niveaus (bijvoorbeeld 5 %, 10 %, 50 % effect etc.). Deze contourlijnen worden geprojecteerd op het grondvlak, dat begrensd wordt door de concentratie-assen en worden isobolen genoemd. De vorm van de isobolen (concaaf, recht of convex) geeft informatie over het combinatie-effect, respectievelijk synergisme, concentratie-additie en antagonisme of respons-additie.

In afbeelding 5 zijn de vier eerder genoemde combinatie-effecten als isobolen weergegeven. In het



Afbeelding 6. Isobolen voor verschillende combinatie-effecten van twee stoffen.
Lijnen verbinden punten met 50 % effect.



Afbeelding 5. Kwantitatieve bepaling van interactiesterkte in het isobolenmodel door middel van de ratio ON/OM . De ononderbroken convexe lijn (vet) geeft een respons-additieve isobool (met $r < 1$) met een raaklijn (gestippeld) in punt M. De onderbroken rechte lijn (vet) geeft de hypothetische concentratie-additieve isobool.

gebied tussen concentratie-additie en respons-additie (met $r = 1$) is sprake van partiële additie. Kwantitatieve bepaling van de interactie kan in dit model volgens Hewlett (1969). Daartoe wordt een raaklijn aan de niet-rechte (synergistische, potentiërende, respons-additieve of antagonistische) isobool getrokken, evenwijdig aan de hypothetische, rechte, concentratie-additie isobool. Stel dat de raaklijn deze niet-rechte isobool in punt M raakt, dan is de interactiesterkte gedefinieerd als de ratio ON/OM , waarbij O de oorsprong voorstelt (concentraties van beide stoffen gelijk aan 0) en N het punt op de concentratie-additieve isobool dat op één lijn ligt met de punten M en O (zie afbeelding 6). Is de ratio ON/OM gelijk aan 1, dan is het effect van het mengsel concentratie-additief; is de ratio kleiner of groter dan 1, dan is het effect van het mengsel respectievelijk antagonistisch/respons-additief of synergistisch. Is de ratio $\frac{1}{2}$ dan is er sprake van respons-additie (met $r = 1$).

Het isobolenmodel kent een aantal voordelen ten opzichte van het toxic unit-model.

- Stoffen met ongelijkvormige concentratie-effect curves kunnen met het isobolenmodel beschreven worden in één concentratie-effect-oppervlak, door aan de individuele stoffen een eigen hellingparameter toe te kennen.
- De schatting van de EC_{50} (of een ander effectniveau) voor het mengsel is in het isobolenmodel niet meer direct afhankelijk van de EC_{50} -schatting van de individuele stoffen, zoals in het toxic unit-model.
- Afwijkingen in de equitoxiciteit van een mengsel, die bij de aanmaak van concentraties kunnen ontstaan, worden in het isobolenmodel niet verwaarloosd doordat elke mengselconcentratie zijn eigen (stof)coördinaten in het concentratie-effect-oppervlak heeft.
- De isobolenmethode geeft direct inzicht in een eventueel concentratie-ratio afhankelijk combinatie-effect van stoffen, daar een isobool het effect voor alle mengselverhoudingen van twee stoffen beschrijft. Dit is van belang omdat de waargenomen respons in veel gevallen een functie is van de proporties waarin de stoffen worden toegepast (Gessner, 1988).

Aan een operationele vorm van het isobolenmodel voor continue responsen wordt gewerkt; voor binaire -sterfte- processen was het model reeds beschikbaar, maar niet toepasbaar op continue responsen (argumentatie reeds vermeld in 2.3).

2.5 Opzet voor combinatietoxiciteitsexperimenten

Om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de (aard van de) interactie tussen stoffen, moet een combinatie-experiment aan een aantal voorwaarden voldoen. Een binaire combinatieproef (een experiment met twee stoffen) zou de volgende elementen moeten bevatten:

- een concentratiereeks voor zowel stof A als B.
- mengselconcentraties van A en B: een (equitoxische) concentratiereeks en een aantal niet-equitoxische concentraties (om te controleren of het combinatie-effect concentratie-ratio-afhankelijk is).
- alle bovenbeschreven concentraties moeten liefst synchroon ingezet worden, om ongewenste variatie t.g.v. wisselende experimentele condities (samenstelling van het blootstellingsmedium, temperatuur, vochtigheid, lichtcondities etc.) te onderdrukken.
- de concentraties dienen te worden bepaald op een manier die afgestemd is op de blootstelling van het organisme (bijv. als totaal-, poriewater-, extraheerbare of uitwisselbare concentratie). Met andere woorden: tracht zo goed mogelijk de biologisch beschikbare fractie te benaderen, zodat de interactie van stoffen op een voor het organisme relevant milieu-chemisch niveau bestudeerd wordt. Daarnaast is de bepaling van interne concentraties van belang voor de analyse van toxico-kinetische interacties.

Bovenbeschreven opzet is in principe modelvrij -kan met zowel het toxic unit-model als het isobolenmodel beschreven worden- en slechts bedoeld als richtlijn voor de opzet van een combinatieproef. Om logistieke redenen zou de experimentele opzet beperkt kunnen worden door bijvoorbeeld de niet-equitoxische concentraties weg te laten, het aantal replica's te verminderen of het aantal concentraties van een reeks in te perken. Deze beperkingen hebben echter de consequentie dat er informatie verloren gaat of dat deze minder betrouwbaar wordt.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1 Materialen

Chemicaliën.

De volgende test- en hulpstoffen werden in de experimenten toegepast:

Cadmium-nitrat ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, BDH Chemicals Ltd, Poole, England, min. assay 99 %, $M_r = 308.47 \text{ g/mol}$)

Cadmium-chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, E. Merck, Darmstadt, Deutschland, reinst > 98 %, $M_r = 201.32 \text{ g/mol}$)

Zink-nitrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pot afkomstig van de V.U. Amsterdam, $M_r = 297.47 \text{ g/mol}$)

Zink-chloride (ZnCl_2 , E. Merck, Darmstadt, Deutschland, pro analysi > 98 %, $M_r = 136.28 \text{ g/mol}$)

Koper-chloride ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, E. Merck, Darmstadt, Deutschland, pro analysi > 99 %, $M_r = 170.48 \text{ g/mol}$)

Natrium-nitrat (NaNO_3 , E. Merck, Darmstadt, Deutschland, puriss, $M_r = 84.99 \text{ g/mol}$)

Natrium-chloride (NaCl , E. Merck, Darmstadt, Deutschland, pro analysi > 99.5 %, $M_r = 58.44 \text{ g/mol}$)

Calcium-carbonaat (CaCO_3 , E. Merck, Darmstadt, Deutschland, > 98.5 %, $M_r = 100.09 \text{ g/mol}$)

Medium.

Als blootstellingsmedium werd een kunstgrond gebruikt, vervaardigd volgens richtlijnen van de Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 1984). Het bestaat uit (percentages slaan op drooggewicht):

10 % turf (Deens sphagnum)

20 % kaolien klei

± 69.5 % zilverzand

± 0.5 % CaCO_3

Voor experimenten met compostwormen werd de turf 1 mm gemalen en voor enchytraeën 0.5 mm. De afzonderlijke componenten werden afgewogen en homogeen gemengd in een betonmolen. Vóór het aanmaken van een grote hoeveelheid kunstgrond, werd er met behulp van een kleine hoeveelheid een titratiecurve gemaakt (volgens SOP ECO/033/01). Aan de hand van deze curve kon de hoeveelheid toe te voegen CaCO_3 worden bepaald om de pH te stellen. De te bereiken pH was voor compostwormen gesteld op 5.5 ± 0.5 en voor enchytraeën op 6.5 ± 0.5 . Het OECD-medium werd op een vochtgehalte gebracht van 55 % (w/w) voor compostwormen en 35 % (w/w) voor enchytraeën, door het toevoegen van demi-water, waarin al dan niet een hoeveelheid chemicaliën was opgelost. Met behulp van een mixer werden de grond en de vloeistof zo homogeen mogelijk gemengd. Vervolgens worden pH- en vochtgehaltebepalingsmonsters genomen (respectievelijk volgens SOP ECO/009/03 en SOP ECO/010/02).

Organismen.

De in dit onderzoek gebruikte compostwormen (van de soort *Eisenia andrei*) en potwormen (van de soort *Enchytraeus crypticus*) zijn afkomstig uit eigen massakweken (zie ook 1.3 en 3.3).

3.2 Metaal-analyses

De bepaling van metaalconcentraties in de bodem hadden tot doel 1) het analyseren van de concentratie-effect-relaties met behulp van verschillende metaalfracties, om te trachten het effect van de bodemmatrix op de respons van bodemorganismen te kwantificeren en 2) de bestudering van milieu-chemische interacties en beschikbaarheid van metalen in de bodem. Nevendoel van de totaalconcentratie-bepaling is controle of de gewenste, nominale, concentraties zijn bereikt. Welke metaalanalyses bij een experiment werden toegepast staat onder de tabellen 3 en 4 in 4.1.

Bepaling totale (of actuele) concentratie metalen in OECD-kunstgrond (door ECO-FCT volgens SOP ECO/237/00).

Uit een gehomogeniseerd en gedroogd monster van circa 100 gram werd 1 gram grond ingewogen en gemengd met Koningswater (dat bestaat uit de sterke zuren HCl en HNO₃ in een 1:3 verhouding). Onder hoge druk (150 psi) en temperatuur werd het monster gedgestrueerd, zodat de aanwezige metalen in oplossing gaan. Deze oplossing werd met behulp van atomaire absorptie spectrometrie (AAS) met vlamtechniek doorgemeten (volgens de SOP's ECO/119/00 voor zink, ECO/120/00 voor koper en ECO/122/00 voor cadmium) waarna de metaalconcentratie uitgerekend kon worden.

Extractie met 0.43 M HNO₃ of 0.01 M CaCl₂ (door ECO-FCT).

Een hoeveelheid vochtige grond die overeenkomt met 5 g droge grond werd ingewogen en gemengd met 50 ml extractant. Overnacht werd de oplossing geschud in een kolf op een schudtafel (150 rotaties per minuut) waardoor het deel van de metalen dat het minst sterk gebonden is aan de grond in oplossing gaat. De suspensie werd gefiltreerd en aangezuurd tot pH 2 met geconcentreerd HNO₃, waardoor de metalen in oplossing bleven. Bepaling van de metaalconcentraties in deze oplossingen vond op dezelfde wijze plaats als bij de Koningswater-destructie. Daarnaast werden standaarden doorgemeten die gemaakt werden in 0.43 M HNO₃ of 0.01 M CaCl₂ aangezuurd tot pH 2 met geconcentreerd HNO₃.

Dataverwerking van bodemchemische analyses.

De verschillende typen analysemethoden in dit onderzoek, Koningswater-destructie en 0.43 M HNO₃ of 0.01 M CaCl₂ extractie, bieden de mogelijkheid om enig licht te werpen op de interactie en beschikbaarheid van metalen in de bodemmatrix. Daartoe wordt de gemeten metaalconcentratie uit de extractie-procedure uitgezet tegen de totale concentratie, bepaald met een Koningswater-destructie. De relatie die op deze manier in beeld wordt gebracht, lijkt enigszins op een Freundlich-isotherm (zoals bijvoorbeeld beschreven in Römken *et al.*, 1993). Strikt genomen geeft een Freundlich-isotherm de empirische relatie weer van de metaalconcentratie in het bodemvocht versus de metaalconcentratie in de vaste bodemfase (formule 4).

$$q = k * c^{\frac{1}{n}} \quad (4)$$

Waarin q de hoeveelheid metaal per gram grond is en c de metaalconcentratie in de evenwichtsooplossing. De constante k is een grondsoortafhankelijke indicator voor bindingssterkte en constante n kan opgevat worden als een maat voor de verzadiging, welke kan optreden bij toenemende bezetting van het adsorptiecomplex van de grond (Chardon, 1984). De kromming

van de isotherm wordt bepaald door de verzadigingssnelheid n . Wanneer zowel van het linker als rechter lid van vergelijking (4) de log wordt genomen, ontstaat er een lineaire relatie (formule 5).

$$\log q = \log k + \frac{1}{n} \log c \quad (5)$$

Op numerieke gronden, om inhomogeniteit van varianties te voorkomen, zijn de curves gefit met behulp van formule 5. Voor de uitwerking van de bodemchemische resultaten is voor q de totaalconcentratie genomen (C_s) en voor c de extraheerbare concentratie (C_e) teruggerekend naar drooggewicht van de kunstgrond. Vervolgens werd de logaritme van de extraheerbare concentratie -meestal in duplo bepaald- tegen de logaritme van de totale concentratie -eenmalig bepaald- uitgezet (formule 5 is dus toegepast in de vorm: $\log C_e = n \log C_s - n \log k$).

Van de bodem-chemische data zijn de blanco's niet meegefit, omdat de metalen in deze concentratie 'van nature' reeds aanwezig waren en niet toegevoegd werden als metaalzout, zoals in de overige concentraties. In de laatstgenoemde groep is de extraheerbaarheid bestudeerd als functie van de hoeveelheid toegevoegd metaal. De aanname hierbij is dat de bijdrage van de achtergrondconcentratie aan het verloop van de curve verwaarloosbaar is in het licht van de bereikte concentraties.

De volgende hypothesen zullen met de bovenbeschreven methode getoetst worden:

1. De extraheerbare concentratie is niet recht evenredig met de totale concentratie, maar neemt toe met de concentratie volgens een power-functie (voorwaarde: $n \neq 1$) die door een metaalspecifieke n en k gegeven wordt (*beschikbaarheids-hypothese*).
2. De extraheerbare fractie van een metaal neemt toe door de aanwezigheid van een ander metaal in de grond (*interactie-hypothese*).

ad 1. Volgens de beschikbaarheids-hypothese neemt de extraheerbare fractie van een metaal toe met toenemende totaalconcentratie. De verwachting is dat, met toenemende concentratie, een *-op grond van totaalconcentraties ingezet-* equitoxisch mengsel van twee metalen (die verschillen in bindingskarakteristieken bepaald door n en k) in de extraheerbare fractie steeds minder equitoxisch wordt door het systematische verschil in extraheerbaarheden van de twee metalen. Dit heeft tot gevolg dat de samenstelling van het mengsel in de extraheerbare fractie verandert.

ad 2. De interactie-hypothese werd bestudeerd door extraheerbare concentraties (volgens formule 5) van enkelvoudige en meervoudige blootstellingsexperimenten te vergelijken. Deze lineaire relaties zijn getoetst op een significant verschil (voor $P = 0.05$) tussen y -asafsnode (gelijk aan $n \log k$), als maat voor k , en de helling, n . Op deze manier is bestudeerd of er een verschil in extraheerbaarheid optrad op het moment dat een metaal in combinatie met een ander metaal werd toegediend in vergelijking tot enkelvoudige toediening. De verwachting voor een metaal in een mengsel is dat de k -waarde lager (minder sterke absorptie) en de n -waarde hoger (snellere verzadiging) is als gevolg van competitie-effecten door het tweede metaal.

De dubbel-log-lineaire benadering wordt gevolgd ondanks het feit dat bij de equitoxische mengsels zowel de concentratie van het bestudeerde metaal wijzigt alsook de concentratie van het andere metaal in het mengsel (de verhouding tussen de metalen op basis van totaalconcentraties is equitoxisch, dus constant). Normaal gesproken zijn, behoudens de bestudeerde stof, alle omstandigheden constant bij toepassing van de Freundlich-vergelijking. De niet-equitoxische mengsels zijn niet met Freundlich-vergelijkingen beschreven, omdat daarin de concentratie van het ene metaal oploopt terwijl die van het andere metaal afloopt. Deze omstandigheden wijken

ons inziens te veel af van de standaardomstandigheden, waaronder de Freundlich-isotherm toegepast mag worden.

3.3 Experimentele opzet

Toegesplitst op de twee verschillende organismen, verliepen de experimenten als volgt:

Eisenia andrei (reproductie-experiment volgens SOP ECO/086/00).

De wormen werden met de hand verzameld uit de massakweek (in een mengsel van paardemest, turf en potgrond volgens SOP ECO/007/02) en per 10 individuen in een glazen 1 literpot gedaan met ± 775 g schone OECD-kunstgrond (acclimatiefase) à 55 % H₂O (w/w) en met een pH van 5.5 ± 0.5 . Gedurende 1 week verbleven de dieren in deze potten en kregen ± 7.75 g gemalen koemest à 55 % H₂O in een kuiltje toegediend als voedsel. Aan het eind van deze week werden de wormen uit de grond verzameld en schoon gewassen; de grond werd door een zeef gespoeld om de coconproductie in de acclimatieperiode te bepalen (volgens SOP ECO/090/00). In deze waarnemingen, die dienen ter controle van een normaal reproductieniveau, was geen aanleiding te vinden om bepaalde potten uit te sluiten van de blootstellingsfase. Deze acclimatiefasegegevens zijn niet vermeld, omdat ze geen verdere toepassing in het onderzoek hebben. Vervolgens werden de wormen 3 weken in OECD-kunstgrond blootgesteld. De grond was kunstmatig verontreinigd door er een oplossing van een nitraat- of chloridemetaalzout in demiwater aan toe te voegen. In de blootstellingsfase werd iedere week gevoerd met gemalen koemest en de vochtigheid op peil gehouden. Aan het eind van deze 3 weekse periode werden de wormen uit de grond gezocht en gewassen. Na het overnachten uitkeutelen op vochtig filtreerpapier konden zij ter analyse van de interne metaalconcentratie door het Laboratorium voor Anorganische Chemie worden voorbereid. De wormen werden daartoe achtereenvolgens ingevroren (gedood) gevriesdroogd (volgens SOP ECO/261/00) en gedismembreerd (tot poeder vermalen, volgens SOP ECO/277/00). Uit dit poeder werd met behulp van een destructie (volgens de SOP's LAC-M113 en LAC-A116) het metaal ontsloten. Metaalconcentraties werden met AAS-techniek bepaald. De grond werd door een zeef gespoeld om de coconproductie te bepalen (volgens SOP ECO/090/00). Voor bepaling van het aantal juvenielen werden de cocons vervolgens uitgelegd in petrischalen met OECD-kunstgrond, waar mest homogeen doorheen was gemengd (volgens SOP ECO/036/01). Deze grond werd na 5 weken gespoeld over een zeef van 1 mm maaswijdte waarna de juvenielen geteld konden worden.

Met deze proefopzet werden de experimenten uitgevoerd zoals vermeld in tabel 3 in het hoofdstuk Resultaten.

Enchytraeus crypticus (reproductie-experiment volgens SOP ECO/273/00).

De volwassen enchytraeën werden met een prepareernaald uit de massakweek (op veenextract-agar met haveremout als voedsel, volgens SOP ECO/281/00) verzameld en per 10 of 15 individuen in een plastic testcontainer gedaan waarin zich circa 7 gram OECD-kunstgrond bevond. Deze kunstgrond is identiek aan die voor *Eisenia*-experimenten, met een paar kleine uitzonderingen. Het OECD-medium voor een enchytraeënexperiment bevatte 35 % water i.p.v. 55 %; de turf was fijner gemalen (0.5 mm i.p.v. 1 mm) en er zat iets meer kalk in dan bij de regenwormen (namelijk zodat de pH tussen 6 en 7 was). De dieren werden 4 weken blootgesteld en wekelijks gevoerd met fijn gemalen haveremout. De toevoeging van metalen geschiedde op dezelfde wijze als bij de regenwormexperimenten. Aan het eind van de blootstellingsperiode werden de enchytraeën uit

de grond geëxtraheerd. Daartoe werden twee methoden ontwikkeld: opspoelen via de Oostenbrink-trechter of direct tellen. De Oostenbrink-methode is gebaseerd op massascheiding via opspoelen en oorspronkelijk ontwikkeld voor nematoden (Oostenbrink, 1960). Een deel van de grond zonder wormen wordt met deze methode gescheiden van de fractie die wormen bevat. Deze fractie werd in een bakje met een melkfilter geschonken, waar de vochtminnende enchytraeën in 48 uur doorheen kropen naar het schaalpje met water eronder, omdat het filter uitdroogde. Vervolgens werd het onderstaande water met enchytraeën in een potje gegoten en gefixeerd met formaline waaraan voor de kleuring Bengaalrood was toegevoegd.

De methode van direct tellen is ontwikkeld toen bleek dat er tijdens de Oostenbrink-methode een groot verlies van enchytraeën optrad die in de melkfilters bleven zitten. Bij de directe telmethode werd aan het einde van de blootstellingsperiode het gehele monster gefixeerd en gekleurd en kon vervolgens (in fracties) geteld worden. Bij grote aantallen juvenielen (circa > 800) kon het monster met behulp van een sample-splitter in 8 gelijke delen gesplitst worden waarvan er dan maar één werd geteld.

Met deze proefopzet werden voor *Enchytraeus crypticus* de experimenten uitgevoerd zoals vermeld in tabel 4 in het hoofdstuk Resultaten.

Algemeen.

In paragraaf 2.5 werden enkele aanbevelingen gedaan met betrekking tot de opzet van combinatietoxiciteitsexperimenten met twee stoffen. Een experiment, volgens deze opzet uitgevoerd, is in termen van combinatietoxiciteit redelijk ideaal en eenduidig te interpreteren. Vanwege logistieke beperkingen zijn drie concentratie-effect curves (één voor elke individuele stof en een equitoxisch mengsel) met enkele niet-equitoxische mengselconcentraties het maximaal haalbare voor het type experimenten en soort organismen in dit onderzoek. Een experiment met meer mengsels (in verschillende verhoudingen) levert uiteraard een betere beschrijving op van de interactie en het concentratie-effect-oppervlak bij gebruik van het isobolenmodel.

De experimenten in het kader van dit onderzoek zijn niet allemaal identiek uitgevoerd, omdat de ideeën over een "ideale" proefopzet gaandeweg tot ontwikkeling kwamen. Zo zijn in de eerste experimenten (1, 2, 5 t/m 8 Ea en 10, 11 Ec; zie de tabellen 3 en 4 voor experimentcodes) de zuivere stoffen en de mengsels niet synchroon ingezet (zoals in 9 Ea en 14 Ec) maar na elkaar. Een ander punt is de mengselverhouding. Alleen een equitoxisch mengsel testen kan informatie verhullen over een concentratie-ratio-afhankelijk combinatie-effect. In latere experimenten zijn daarom altijd enkele niet-equitoxische concentraties meegenomen (7, 8, 9 Ea en 14 Ec).

Als laatste punt is er de balancerings voor het anion. Bij een oplopende concentratiereeks voor een metaalzout (want zo werden de metalen toegediend) neemt behalve het metaal ook het anion in concentratie toe. Eventuele neveneffecten van het anion nemen dus ook toe met de metaalconcentratie. Er is gekozen voor het handhaven van één achtergrondconcentratie voor het anion, gebaseerd op de hoogste testconcentratie. Alle lagere concentraties worden dan met behulp van het natriumzout van het betreffende anion in balans gebracht. In de meeste experimenten zijn 'echte' blanco's meegenomen waarin alleen demiwater aanwezig was zodat de respons van deze 'echte' blanco met de anionblanco vergeleken kon worden. De aanname bij deze balancerings is dat natrium geen nadelige effecten heeft op de bestudeerde parameter (d.i. reproductie). Deze aanname kan voor *Eisenia andrei* aannemelijk worden gemaakt door de zeer hoge concentraties aan natrium in de koemest die de wormen als voedsel toegediend krijgen (circa 326 mmol per kilo droge koemest, bepaald met een 0.43 M HNO₃-extractie).

Tot slot werden er een tweetal kwaliteitscriteria toegepast bij de interpretatie van experimentele gegevens. Indien er meer dan 50 % oudersterfte optrad in een testcontainer, dan werd deze niet

meegenomen in de berekening van de concentratie-effect curve voor reproductie. Voor de blanco testcontainers gold de eis dat er niet meer dan 10 % oudersterfte op mocht treden.

3.4 Concentratie-effect modellen

In dit onderzoek zijn de toxicologische gegevens geïnterpreteerd met behulp van het *toxic unit model*. Voor dit model, dat met individuele concentratie-effect curves werkt, is programmatuur beschikbaar in de vorm van een concentratie-effect module in zowel het software pakket GENSTAT als in het programma Graphpad Prism, een Windowsapplicatie.

Het model gaat uit van de standaard logistische concentratie-effect curve (volgens formule 6), waarin Y de respons voorstelt, X de ln getransformeerde concentratie van een toxicant, C de

$$Y = \frac{C}{1 + e^{-b(X-M)}} \quad (6)$$

respons van de blanco; bij $X \approx \ln(0.00001)$, M de schatting van de $\ln(EC_{50})$ en b de helling in het EC_{50} -punt. Het model voert een niet-lineaire regressie uit op de ingevoerde dataset en geeft als resultaat schattingen voor de vrije parameters C, M en b met hun standaardfout en de EC_{50} met een 95 % betrouwbaarheidsinterval.

Indien er aandacht besteed wordt aan de gelijkvormigheid van concentratie-effect curves (volgens sommige auteurs niet los te zien van het gebruik van de concentratie-additie hypothese, zie 2.3) ligt het voor de hand een statistische toets toe te passen op de hellingparameter b om (on)gelijkheid aan te tonen. In dit onderzoek zijn concentratie-effect curves van individuele stoffen niet getoetst op gelijkvormigheid (voor motivatie zie 2.3).

$$Y = \frac{C(1 + fX)}{1 + (2fM + 1)\left(\frac{X}{M}\right)^b} \quad (7)$$

Daarnaast is er in dezelfde software pakketten een module beschikbaar die een concentratie-effect curve beschrijft met stimulatie van de respons bij lage doses (volgens van Ewijk & Hoekstra, 1993). Dit verschijnsel, dat bekend staat onder de naam *hormesis* (Stebbing, 1982), is in enkele experimenten waargenomen. Dit zogenaamde lineair logistische model kent een extra vrije parameter, f, voor hormesis (zie formule 7). Hormesisparameter f moet groter zijn dan 0 ($f > 0$) anders is de parameter niet interpreteerbaar. C is de blanco prestatie, X de ln getransformeerde concentratie en M is de schatting voor de $\ln(EC_{50})$. De parameter b staat niet meer voor de (negatieve) helling, maar is een vormparameter. Deze module kent een ingebouwde F-toets die bepaalt of hormesis significant is (bij $P = 0.05$). Daartoe worden de fits van de modellen (6) en (7) met elkaar vergeleken (voor een gedetailleerde beschrijving van de statistische procedure wordt verwezen naar: van Ewijk & Hoekstra, 1993).

Een significantietoets voor het aantonen c.q. onderscheiden van combinatie-effecten is in dit onderzoek niet ontwikkeld. Een uitspraak over het combinatie-effect, volgens de definities van 2.1, vindt plaats op basis van de hieronder weergegeven getalscriteria voor de EC_{50} van het mengsel (in toxic units).

$EC_{50} < 1$ TU	synergisme
$EC_{50} = 1$ TU	concentratie-additie
$1 < EC_{50} < 2$ TU	respons-additie ($r < 1$) ook wel: partiële additie
$EC_{50} = 2$ TU	respons-additie ($r = 1$)
$EC_{50} > 2$ TU	antagonisme

Er zijn in wezen twee waarden waarmee de EC_{50} van een binair mengsel vergeleken moet worden, die voor concentratie-additie (1 TU) en die voor respons-additie (met $r = 1$) (2 TU). Bij een EC_{50} van 1 TU is er sprake van overeenstemming met de nul-hypothese (concentratie-additie) en bij een EC_{50} van 2 TU, geldt voor een *binair equitoxisch mengsel* dat het een respons-additief (met $r = 1$) effect heeft, omdat beide stoffen op EC_{50} -niveau met 1 TU in het mengsel vertegenwoordigd zijn. Analoot aan deze redenering volgt hieruit voor een tertiair equitoxisch mengsel bij respons-additie (met $r = 1$) een EC_{50} van circa 3 TU.

Het isobolenmodel is eveneens toegepast om enkele experimentele data-sets te analyseren. Dit model kan een dataset voor twee stoffen, enkelvoudig en in mengsels, integraal analyseren. Op deze manier ontstaat een oppervlakte-fit, een concentratie-effect-oppervlak, waaruit de isobolen voor verschillende effectniveaus eenvoudig gedestilleerd kunnen worden. In één oogopslag zijn dan alle mengsels en de aard van hun interactie zichtbaar. Niet-lineaire regressie voor deze driedimensionale modellen vindt plaats met het statistische software pakket SPSS. Afbeeldingen zijn vervolgens gemaakt met behulp van het programma Mathematica onder Windows. In het hoofdstuk 4 zijn ter illustratie slechts enkele resultaten met het isobolenmodel uitgewerkt, omdat de wiskunde en statistiek achter het isobolenmodel voor *continue* responsen nog niet gereed zijn.

4. RESULTATEN

4.1 Uitgevoerde experimenten

Met *Eisenia andrei* zijn 9 experimenten uitgevoerd zoals in tabel 3 weergegeven.

Experiment 5 Ea is uitgevoerd door van Gestel *et al.* (1989). De ruwe data zijn gebruikt voor een schatting van de EC₅₀ van koper. De experimenten 1 Ea, 2 Ea en 6 Ea zijn reeds gedeeltelijk beschreven in Mogo (1993) en 3 Ea, 4 Ea, 7 Ea en 8 Ea in Weltje (1993).

Voor de precieze concentraties, zoals die in de experimenten werden toegepast, wordt naar de bijlagen 3 tot en met 11 verwezen.

Tabel 3. Uitgevoerde experimenten met *Eisenia andrei*.

De experimenten 9a Ea, 9b Ea en 9c Ea zijn synchroon uitgevoerd. Experiment 5 Ea had vier controlereplica's. In de experimenten 7 Ea, 8 Ea en 9c Ea zijn niet-equitoxische mengsels toegepast.

Exp. code	toegepaste metaal(en)	soort anion	anion balansconc. (mmol/kg)	gemeten parameter(s)	testconc. x replica's
1 Ea	Cd	NO ₃	5.69	coc+juv	6x4
2 Ea	Zn	NO ₃	30.59	coc+juv	6x4
3 Ea	Na	Cl	n.v.t.	coc	6x2
4 Ea	Na	NO ₃	n.v.t.	coc	6x2
5 Ea	Cu	Cl	n.v.t.	coc	5x2
6 Ea	Cd + Zn	NO ₃	23.97	coc+juv	6x4
7 Ea	Cd + Cu	Cl	9.32	coc	16x2
8 Ea	Cu + Zn	Cl	22.3	coc	16x2
9a Ea	Cd	Cl	18.84	coc+juv	10x2
9b Ea	Zn	Cl	"	coc+juv	10x2
9c Ea	Cd + Zn	Cl	"	coc+juv	15x2

Bepaling van de totaalconcentratie metaal in grond vond *niet* plaats bij de experimenten 3 Ea, 4 Ea, 5 Ea, 9a Ea en 9b Ea en voor slechts vijf concentraties van experiment 9c Ea. Bij de laatste drie (synchrone) experimenten werden de stockoplossingen van de metaalzouten doorgemeten, waardoor later voor fouten in de stockaanmaak gecorrigeerd kon worden. Bepaling van de 0.01 M CaCl₂-extraheerbare metaalconcentratie vond plaats bij de experimenten 1 Ea, 2 Ea, 4 Ea, 6 Ea, 9a Ea, 9b Ea en 9c Ea. Bepaling van de 0.43 M HNO₃-extraheerbare metaalconcentratie vond plaats bij de experimenten 1 Ea, 2 Ea, 3 Ea, 6 Ea, 7 Ea en 8 Ea. Van de wormen uit de experimenten 9a Ea, 9b Ea en 9c Ea zijn de interne metaalconcentraties bepaald.

Met *Enchytraeus crypticus* zijn 7 experimenten uitgevoerd zoals in tabel 4 weergegeven.

Voor de precieze concentraties, zoals die in de experimenten werden toegepast, wordt naar de bijlagen 12 tot en met 16 verwezen.

Tabel 4. Uitgevoerde experimenten met *Enchytraeus crypticus*.
De experimenten 14a Ec, 14b Ec en 14c Ec zijn synchroon uitgevoerd.
In experiment 14c Ec is een niet-equitoxisch mengsel toegepast.

Exp. code	toegepaste meta(a)l(en)	soort anion	anion balansconc. (mmol/kg)	testconc. x replica's	tel-methode
10 Ec	Cd	Cl	3.56	10x4	direct
11 Ec	Zn	Cl	23.25	10x4	Oostenbr.
12 Ec	Na	Cl	n.v.t.	6x2	Oostenbr.
13 Ec	Na	NO ₃	n.v.t.	6x2	Oostenbr.
14a Ec	Cd	Cl	22.85	10x4	direct
14b Ec	Zn	Cl	"	10x4	direct
14c Ec	Cd + Zn	Cl	"	15x4	direct

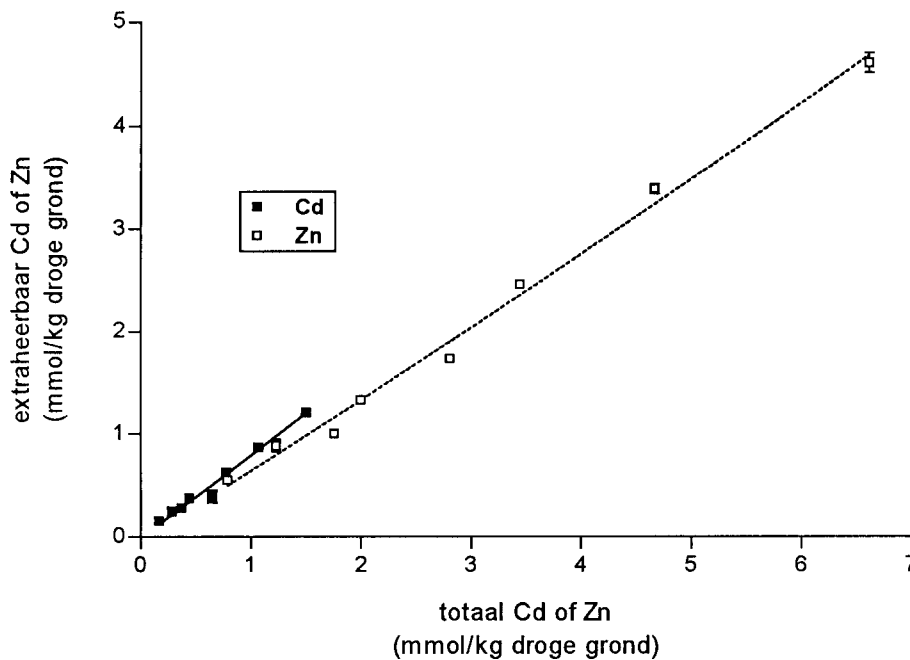
De totaalconcentratie metaal in grond werd *niet* bepaald voor de experimenten 12 Ec en 13 Ec (de grond voor deze experimenten is dezelfde als in 3 en 4 Ea). Voor alle experimenten met uitzondering van 12 Ec werd de 0.01 M CaCl₂ extraheerbare metaalconcentratie in grond bepaald. Een 0.43 M HNO₃-extractie werd alleen toegepast in experiment 12 Ec.

4.2 Bodemchemie en opname van zware metalen

Algemeen

De uitgevoerde bodemchemische analyses hadden tot doel de beschikbaarheids- en interactie-hypothese te toetsen (het milieu-chemisch gedrag van metalen in kunstgrond) en dienden tevens ter analyse van concentratie-effect relaties.

CaCl₂- en HNO₃-extraheerbare concentraties van cadmium, zink en koper zijn uitgezet tegen de met een Koningswaterdestructie bepaalde totaalconcentratie van deze metalen (de theorie is beschreven in 3.2). Alle extraheerbare concentraties zijn teruggerekend naar drooggewicht concentraties voor de OECD-kunstgrond. Een voorbeeld van zo'n uitwerking is te zien in afbeelding 7, waarin de extraheerbare concentraties van zink en cadmium, bepaald door middel van 0.01 M CaCl₂-extractie, zijn uitgezet tegen het totaalgehalte van deze metalen. Het betreft metaalanalyses van een equitoxisch mengsel (enchytraeën-experiment 14c Ec). De Freundlich-isotherm van de vorm $C_e = (C_s/k)^n$ (volgens vergelijking 4), waarin C_e de extraheerbare concentratie en C_s de totale concentratie voorstelt, geeft een beschrijving van de bindingskarakteristiek van metalen aan grond door middel van de parameters n en k (beschreven in 3.2). De waarden voor n en k zijn in dit voorbeeld respectievelijk 0.93 en 1.34 voor cadmium en 1.02 en 1.50 voor zink. De Freundlich-isotherm is voor beide metalen bijna lineair in dit concentratietraject ($n \approx 1$) zoals ook te zien is in de afbeelding. Zink is minder extraheerbaar, sterker gebonden, in OECD-grond dan cadmium. Tevens is te zien dat bij toenemende concentratie het absolute verschil tussen de lijnen groter wordt.



Afbeelding 7. Extraheerbaarheid van cadmium en zink, bepaald met 0.01 M CaCl_2 in experiment 14c Ec (equitoxisch mengsel). De lijnen zijn Freundlich-isothermen volgens formule (4).

In de berekeningen is de Freundlich-isotherm overigens toegepast als formule (5) dat wil zeggen log-getransformeerd waardoor er een rechte ontstaat (voor motivatie wordt verwezen naar 3.2).

Experimentele condities

Voor een betrouwbare vergelijking van het milieu-chemisch gedrag van verschillende metalen bij enkelvoudige en gecombineerde toepassing, is het van belang dat experimenten in exact dezelfde grond worden uitgevoerd, omdat de sorptie van metalen sterk afhankelijk is van bodemvariabelen zoals bijvoorbeeld pH, calcium-concentratie, zoutsterkte en organisch stofgehalte. Om bovenstaande reden is het van belang de experimenten te scheiden in twee groepen alvorens over te gaan tot interpretatie van de gegevens in het licht van de te toetsen hypothesen:

- de eerste groep bestaat uit de *synchron* uitgevoerde experimenten (enkelvoudige stoffen en mengsels tegelijkertijd): 9a/b/c Ea en 14a/b/c Ec.
- de tweede groep wordt gevormd door de *asynchron* uitgevoerde experimenten (enkelvoudige stoffen en mengsels achtereenvolgens dat wil zeggen "los" van elkaar): 1 Ea, 2 Ea, 6 Ea, 7 Ea en 8 Ea.

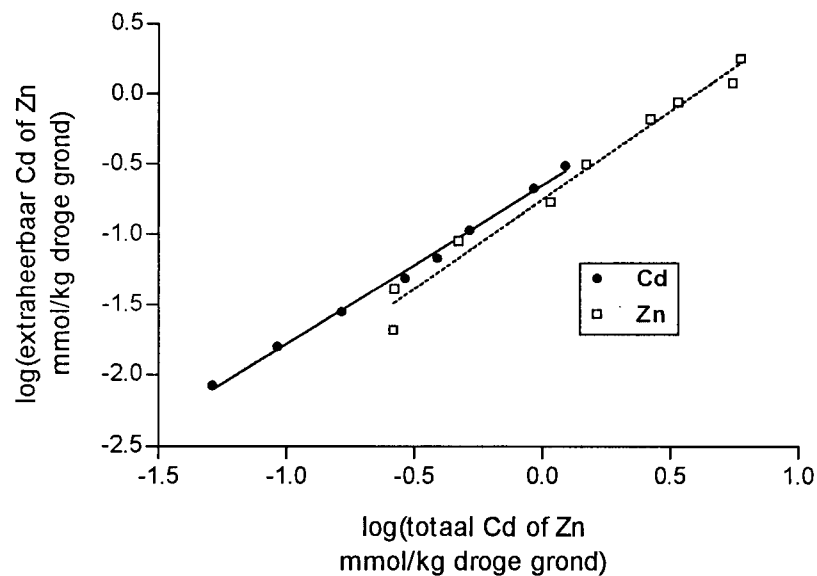
De synchron uitgevoerde proeven kenden gelijke omstandigheden (dezelfde kunstgrond-batch met één CaCO_3 -concentratie, gelijke condities tijdens de extractieprocedure, dezelfde chloride-balans etc.) waardoor goede vergelijkbaarheid gewaarborgd wordt. De asynchrone proeven verschilden (in potentie) in al deze facetten, wat onderlinge vergelijkbaarheid bemoeilijkt.

Om het effect van asynchroniteit te onderzoeken zijn de lineaire Freundlich-isothermen van de ongelijktijdig uitgevoerde enkelvoudige cadmium-experimenten tegen elkaar getoetst (respectievelijk de experimenten 1 Ea, 9a Ea en 14a Ec). Voor zink is deze exercitie ook uitgevoerd (respectievelijk de experimenten 2 Ea, 9b Ea en 14b Ec). Alle lijnen waren onderling significant verschillend van elkaar voor wat betreft helling en/of asafsnede. Hetzelfde gold voor cadmium toegepast in equitoxische cadmium/zink-mengsels (experimenten 6 Ea, 9c Ea en 14c Ec). Idem voor zink met uitzondering van de combinatie 6 Ea - 9c Ea; deze lijnen waren niet significant verschillend. Voor koper kan er geen toetsing plaatsvinden daar er geen onderling

vergelijkbare experimenten voor dit metaal beschikbaar zijn. De verschillen tussen asynchrone proeven, ten gevolge van wisselende experimentele condities, maakt dat deze dus onderling niet of nauwelijks vergelijkbaar zijn.

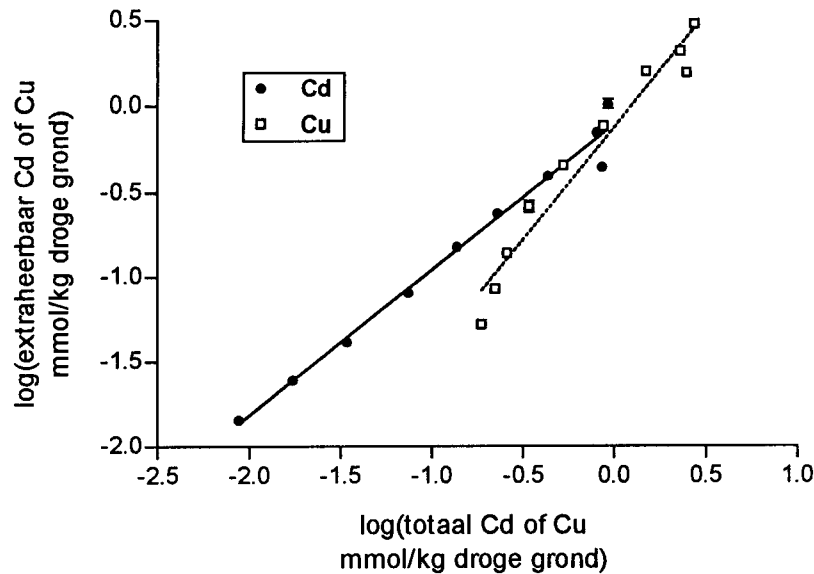
Beschikbaarheidshypothese

Voor het bestuderen van de (verschillen in) bindingskarakteristieken van cadmium, zink en koper in kunstgrond is om bovenstaande argumentatie gekozen voor evaluatie van de synchrone experimenten (9a/b/c Ea en 14a/b/c Ec) en alle equitoxische mengsels, waarin immers twee metalen *gelijktijdig* worden toegediend (6 Ea, 7 Ea en 8 Ea). Opgemerkt moet worden dat bij de analyse van Freundlich-isothermen van equitoxische mengsels de eventueel optredende verschillen toegeschreven moeten worden aan enerzijds verschillen in bindingskarakteristieken van individuele metalen en anderzijds aan interactie-effecten. In afbeelding 7 is reeds het equitoxische cadmium/zink-mengsel van experiment 14 Ec weergegeven. Afbeelding 8 laat de Freundlich-isothermen zien van de cadmium- en zink-singles uit experiment 9 Ea en afbeelding 9 die van koper en cadmium uit het mengsel-experiment 7 Ea (dubbel-log lineair gefit).



Afbeelding 8. Extraheerbaarheid van cadmium en zink, bepaald met 0.01 M CaCl₂ in experiment 9a Ea (Cd-single) en 9b Ea (Zn-single). De lijnen zijn Freundlich-isothermen volgens formule (5).

In alle bestudeerde experimenten blijkt cadmium steeds een hogere beschikbaarheid te hebben dan zink in OECD-kunstgrond. Dit verschijnsel wordt sterker met toenemende totaalconcentraties. In de extraheerbare concentraties van het op basis van totaalconcentraties equitoxische cadmium/zink-mengsel is cadmium, in termen van toxic units, dus steeds sterker vertegenwoordigd. Het mengsel -uitgedrukt in extraheerbare concentraties- wijkt bij toenemende totaalconcentraties daarom steeds verder af van equitoxiciteit (zie ook tabel 5).



Afbeelding 10. Extraheerbaarheid van cadmium en koper, bepaald met 0,43 M HNO₃ in experiment 7 Ea (equitoxisch Cd/Cu-mengsel). De lijnen zijn Freundlich-isothermen volgens formule (5).

Tabel 5. Verhouding van toxic units cadmium en zink (in exp. 6 Ea). Uitgedrukt in HNO₃-extraheerbare concentraties is cadmium met gemiddeld meer dan 2,5 keer zoveel toxic units in het mengsel vertegenwoordigd als zink (versus 1,4 voor totaalconcentraties)

toxic units coconproductie			
totaalconc.		HNO ₃ -ext. conc.	
Cd	Zn	Cd	Zn
0.20	0.15	0.21	0.11
0.38	0.26	0.39	0.16
0.64	0.44	0.71	0.30
1.10	0.76	1.40	0.55
2.40	1.80	2.78	0.97
gemiddeld 1.39 : 1		gemiddeld 2.63 : 1	

Ook in het cadmium/koper-mengsel (7 Ea, afb. 9) is cadmium het best extraheerbare metaal. Tussen zink en koper (8 Ea, niet afgebeeld) werd geen verschil gevonden.

Interactiehypothese

Voor het bestuderen van metaalinteracties in de bodem zijn vergelijkbare extracties van cadmium- en zink-singles versus extracties van cadmium en zink uit equitoxische mengsels getoetst op verschillen voor wat betreft hun Freundlich-parameters. Zowel synchrone als asynchrone experimenten zijn bestudeerd. Voor koper was deze analyse niet mogelijk, omdat er geen informatie voorhanden was van een enkelvoudig koper-experiment.

De resultaten voor cadmium worden in tabel 6 gepresenteerd, waarin voor de twee gehanteerde extractiemethoden de invloed van de aanwezigheid van zink en koper wordt weergegeven in termen van Freundlich-parameters (volgens formule 5). In de tabel is aangegeven of n, de hellingparameter, en/of k, de asafsnedeparameter, voor cadmium in een equitoxisch mengsel significant afwijkt van de parameterwaarden van de cadmium-single. Een dubbelomlijnd vak

correspondeert met één set gegevens (enkelvoudige stof en equitoxisch mengsel) wat ook af te leiden is uit de experimentcode. Een significantiester "*" geldt dan ook alleen binnen een dubbelomlijnd vak. Een hogere k-waarde betekent dat het metaal sterker gebonden en dus minder extraheerbaar is. Een hogere n-waarde betekent dat het adsorptiecomplex van de grond sneller verzadigd raakt en er meer metaal extraheerbaar is. Voor een metaal in combinatie met een ander metaal *dat aan dezelfde sorptieplaatsen in de bodem bindt*, wordt een grotere extraheerbaarheid verwacht (voor k een lagere en voor n een hogere waarde) vergeleken met de extraheerbaarheid in afwezigheid van andere metalen. Voor enchytraeën-experiment 14 Ec geldt dat het in een OECD-kunstgrond is uitgevoerd die afwijkt van de OECD-kunstgrond gebruikt in de *Eisenia*-experimenten (zie 3.3). Dit zou consequenties kunnen hebben voor de (mate van) sorptie van metalen aan deze grond.

Tabel 6. Extraheerbaarheid van cadmium in af- en aanwezigheid van equitoxische hoeveelheden zink of koper. * geeft significantie aan bij $p = 0.05$, ? betekent dat er geen uitspraak te doen is over verschillen in k (asafsnedemaat), wegens significante verschillen in hellingparameter n.

extractans	experimentcode	k	n
0.01 M CaCl ₂	1 Ea (Cd)	2.54	1.21
	6 Ea (Cd+Zn)	2.70 *	1.26
	9a Ea (Cd)	3.86	1.12
	9c Ea (Cd+Zn)	0.79 ?	1.74 *
	14a Ec (Cd)	1.40	0.87
	14c Ec (Cd+Zn)	1.34	0.93
0.43 M HNO ₃	1 Ea (Cd)	0.98	1.05
	6 Ea (Cd+Zn)	0.82 *	1.06
	1 Ea (Cd)	0.98	1.05
	7 Ea (Cd+Cu)	1.32 ?	0.86 *

Opvallend is de variatie in waarden voor n (tussen 0.86 en 1.74) en vooral k (tussen 0.79 en 3.86). Deze spreiding wordt deels veroorzaakt door de grote variatie in experimentele condities (asynchroniteit), mengsel-effecten (de interactie-hypothese) en onzekerheden in de analytische bepaling van metaalconcentraties.

De interactiehypothese wordt ondersteund door de uitkomst van het synchrone experiment 9a/c Ea, waarin de beschikbaarheid voor cadmium in het mengsel groter is dan in de single (k lager, n significant hoger) en door de HNO₃-extractie van de asynchrone experimentencombinatie 1 Ea/6 Ea, waarin het mengsel een significant lagere k-waarde heeft. De asynchrone experimentencombinaties 1 Ea/6 Ea (CaCl₂-extractie) en 1 Ea/7 Ea geven voor respectievelijk de k en de n-waarde significanties aan die duiden op een hogere beschikbaarheid van cadmium in de single. Dit is in tegenspraak met de hypothese en in termen van bodemchemie eigenlijk onverklaarbaar, tenzij cadmium zou neerslaan. Opvallend is dat de experimentencombinatie 1Ea/6 Ea met de HNO₃-extractie de hypothese ondersteunt en verwerpt met de CaCl₂-extractie.

Analoog aan de bespreking van cadmium volgen de gegevens voor zink in tabel 7. Ook hiervoor

geldt dat enchytraeën-experiment 14 Ec in anders samengestelde kunstgrond is uitgevoerd dan de overige, *Eisenia*-experimenten (zie 3.3).

Tabel 7. Extraheerbaarheid van zink in af- en aanwezigheid van equitoxische hoeveelheden cadmium of koper.
* geeft significantie aan bij $p = 0.05$.

extractans	experimentcode	k	n
0.01 M CaCl ₂	2 Ea (Zn)	3.35	1.22
	6 Ea (Zn+Cd)	4.14*	1.23
	9b Ea (Zn)	3.74	1.06
	9c Ea (Zn+Cd)	4.01	1.26
	14b Ec (Zn)	1.49	1.00
	14c Ec (Zn+Cd)	1.50	1.02
0.43 M HNO ₃	2 Ea (Zn)	1.39	1.30
	6 Ea (Zn+Cd)	0.87	0.93
	2 Ea (Zn)	1.39	1.30
	8 Ea (Zn+Cu)	1.20	1.09

De variatie in n-waarden (tussen 0.93 en 1.30) is voor zink kleiner dan voor cadmium. De spreiding in k-waarden (tussen 0.87 en 4.14) is ongeveer gelijk aan die voor cadmium. Gemiddeld liggen de k-waarden voor zink hoger dan die van cadmium, wat duidt op een grotere affiniteit van zink voor OECD-medium. De gemiddelde waarden van n voor zink en cadmium zijn ongeveer gelijk, wat duidt op een gelijke verzadigingssnelheid.

De interactie-hypothese wordt niet ondersteund door de zink-resultaten. Slechts één asynchrone experimentencombinatie (2 Ea/6 Ea) leverde een significante parameterwaarde op voor k. Deze uitkomst is in tegenspraak met de hypothese, daar er een lagere beschikbaarheid van zink wordt verondersteld in een mengsel met cadmium.

Mogelijke verklaringen voor het vinden van slechts één significant verschil in de zink-resultaten zijn: 1) zink is ongevoelig voor toevoeging van een tweede metaal en 2) de bodem-chemische analyses van zink vertoonden grote spreiding.

ad 1) Deze verklaring wordt ondersteund door uitkomsten van de beschikbaarheidshypothese waarin voor zink een sterkere absorptie aan OECD-grond werd gevonden. Dit zou betekenen dat zink de sterkere competitor is en cadmium verdringt naar de waterfase. Verschillen tussen singles en mengsels zouden dan alleen gevonden kunnen worden in de cadmium- en niet in de zink-analyse-resultaten.

ad 2) De analyse-resultaten van zink vertonen meer variatie dan die voor cadmium, waardoor het moeilijk is om een significant verschil tussen twee meetseries aan te tonen. De variatie wordt deels veroorzaakt door de relatief hoge "achtergrond-ruis" van zink vergeleken met die van cadmium.

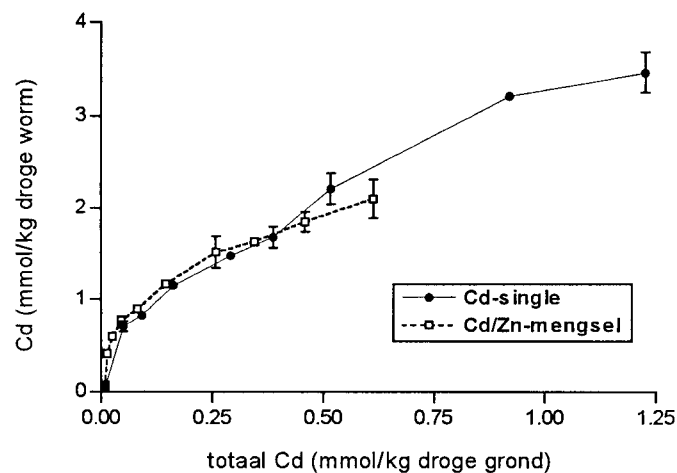
Toetsing van de interactie-hypothese heeft voor cadmium een viertal significante verschillen opgeleverd, waarvan 2 ondersteunend (één daarvan afkomstig uit een synchrone experimentencombinatie). Voor zink was er slechts één significant verschil (ontkrachtend;

asynchrone experimentencombinatie). De beschikbaarheidshypothese toont aan dat zink sterker gebonden is aan OECD-grond en daarmee waarschijnlijk een krachtigere competitor dan cadmium. Dit resulteert in een relatieve ongevoeligheid van zink voor de toevoeging van cadmium en verklaart dat er maar 1 verschil wordt gevonden. Cadmium is waarschijnlijk wel gevoelig voor de toevoeging van zink, maar dit is niet overtuigend aangetoond.

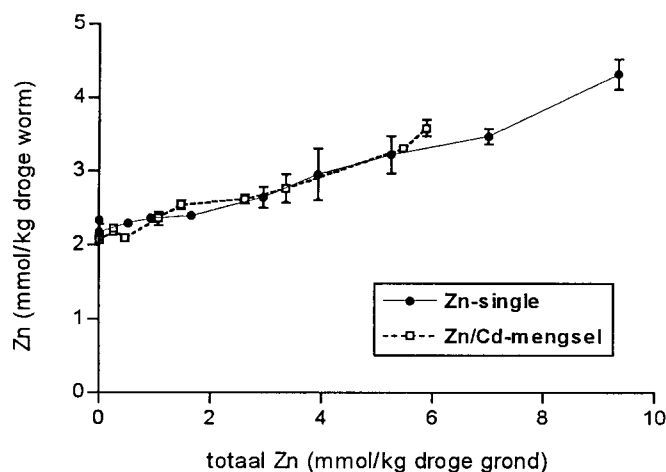
Lichaamsconcentraties.

De interne concentraties van cadmium en zink in *Eisenia andrei* zijn gemeten in experiment 9 Ea (3.3). Het doel van deze metingen was 1) interacties op toxico-kinetisch niveau te bestuderen om wederzijdse beïnvloeding van interne concentraties cadmium en zink te kwantificeren en 2) de waargenomen effecten op de reproductie tegen de interne concentraties uit te zetten.

ad 1) Afbeeldingen 10 en 11 geven het verloop van de interne concentraties cadmium en zink weer tegen de externe totaalconcentraties van deze metalen.



Afbeelding 10. Interne cadmiumconcentratie tegen cadmium totaalconcentratie in grond voor blootstelling aan cadmium alleen (experiment 9a Ea; gesloten symbolen-doorgetrokken lijn) en in combinatie met zink (experiment 9c Ea; open symbolen-onderbroken lijn).

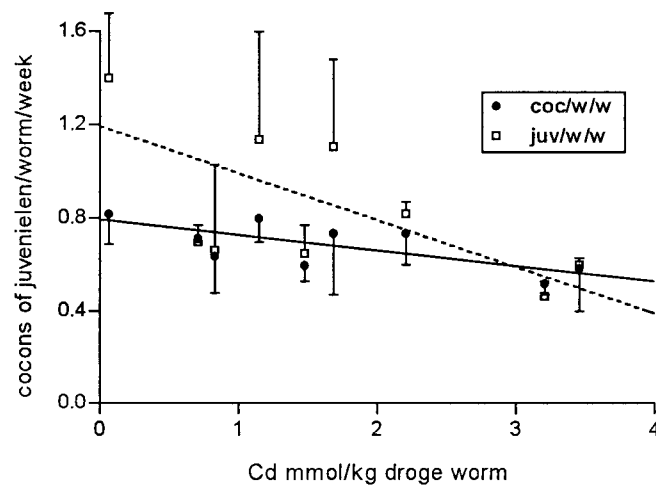


Afbeelding 11. Interne zinkconcentratie tegen zink totaalconcentratie in grond voor blootstelling aan zink alleen (experiment 9b Ea; gesloten symbolen-doorgetrokken lijn) en in combinatie met cadmium (experiment 9c Ea; open symbolen-onderbroken lijn).

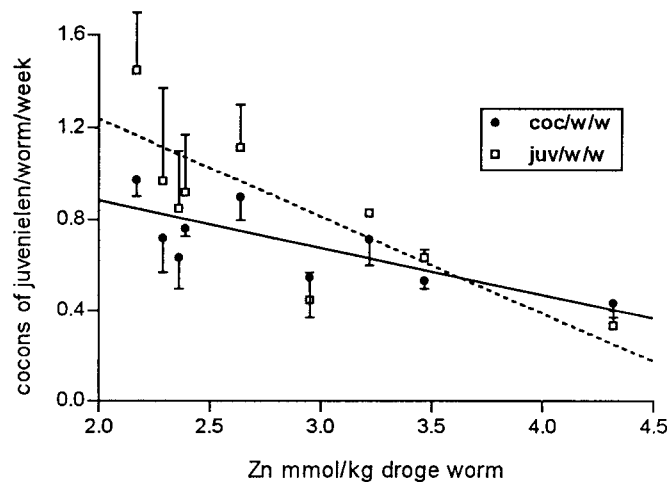
Als in plaats van totaalconcentraties de CaCl_2 -extraheerbare metaalconcentraties werden uitgezet leverde dit met uitzondering van twee afwijkende cadmiumconcentraties (zie opmerking in bijlage 11c) hetzelfde beeld op, te weten: het verloop van de interne concentraties van cadmium en zink wordt niet beïnvloed door gelijktijdige blootstelling met respectievelijk zink en cadmium.

In afbeelding 11 is te zien dat de interne zinkconcentratie langzaam oploopt met toenemende zink totaalconcentratie in de grond en tevens dat de interne concentratie gereguleerd wordt op circa 2.3 mmol/kg droge worm ($\approx 150 \text{ mg/kg}$ droge worm). Voor cadmium (afb. 10) geldt dat er een duidelijke accumulatie plaats vindt. Dit metaal wordt niet gereguleerd, maar met toenemende concentratie in de grond steeds minder snel opgenomen (in de afbeelding te zien als het afbuigen van de curve naar een maximale interne concentratie).

ad 2) De afbeeldingen 12 en 13 geven het verloop weer van coconproductie en juvenielenaantallen tegen respectievelijk de interne cadmium- en zinkconcentratie (experimenten 9a Ea en 9b Ea).



Afbeelding 12. Coconproductie (doorgetrokken lijn-gesloten symbolen) en juvenielenaantal (onderbroken lijn-open symbolen) tegen interne cadmiumconcentratie (experiment 9a Ea).



Afbeelding 13. Coconproductie (doorgetrokken lijn-gesloten symbolen) en juvenielenaantal (onderbroken lijn-open symbolen) tegen interne zinkconcentratie (experiment 9b Ea).

Met stijgende interne concentratie is voor beide metalen een afname te zien in de reproductie-responsen, waarbij juvenielenaantallen, over het algemeen de gevoeligste parameter (zie 4.3), de

snelste daling vertoont. In afbeelding 13 is tevens zichtbaar dat er bij een interne zinkconcentratie van circa 2.9 mmol/kg droge worm voor het eerst nadelige effecten op de reproductie zijn. Door de grote variatie in de dataset (de r^2 van de met behulp van lineaire regressie bepaalde lijnen uit de afbeeldingen 12 en 13 ligt tussen 0.16 en 0.42) is er slechts sprake van een trend en kunnen er geen conclusies aan verbonden worden.

4.3 Effecten van enkelvoudige blootstelling

Inleiding

Om combinatie-experimenten in te zetten met toepassing van equitoxische mengsels is kennis nodig over de toxiciteit van enkelvoudige stoffen. Om deze reden zijn een aantal (voor)-experimenten uitgevoerd om de effecten van enkelvoudige metalen cadmium, koper en zink te bepalen op reproductieparameters van *Eisenia andrei* en *Enchytraeus crypticus* (experimenten 1 Ea, 2 Ea, 5 Ea, 10 Ec en 11 Ec). De voornaamste reden voor deze experimenten is bepaling van de EC_{50} op basis van totaalconcentraties en daarnaast voor de vaststelling van het concentratietraject, waarbinnen de concentratie-effect curve ligt. EC_{50} -waarden op basis van totaalconcentraties werden gebruikt als richtlijn voor het opzetten van een equitoxische concentratiereeks.

De experimenten met NaCl en NaNO₃ (3 Ea, 4 Ea, 12 Ec en 13 Ec) zijn uitgevoerd naar aanleiding van twee eerdere metaalexperimenten met *Eisenia* (die hier niet verder besproken worden) waarin een te hoge anionbalansconcentratie (circa 53 mmol NO₃/kg droge grond) de oorzaak was voor een bijna volledige onderdrukking van de coconproductie. De concentratie-effect curves van nitraat en chloride geven inzicht in de maximale concentraties die gebruikt kunnen worden als anionbalans zonder dat de reproductie ernstig verstoord wordt. In de experimenten is het natriumzout van deze anionen gebruikt, omdat dit zout ook in de experimenten wordt toegepast voor de balancerings (zie 3.3 voor verdere motivatie).

De enkelvoudige experimenten 9a Ea (Cd) en 9b Ea (Zn) en 14a Ec (Cd) en 14b Ec (Zn) maken deel uit van twee omvangrijke experimenten waarin voor cadmium en zink beide singles en hun equitoxische mengsel tegelijkertijd zijn ingezet.

In tabel 8 zijn de EC_{50} -waarden met hun 95 % betrouwbaarheidsintervallen weergegeven zoals bepaald in bovenvermelde experimenten voor verschillende typen concentraties en gemeten parameters, zodat vergelijking binnen en tussen experimenten mogelijk is.

De concentratie-effect curves waarmee de EC_{50} -waarden zijn bepaald, worden beschreven door formule (6) uit 3.4. De waarden van de parameters b , M en C uit formule 6 en de r^2 (indicatie voor de mate van fit) van de afzonderlijke concentratie-effect curves zijn als bijlagen 1 (*Eisenia*) en 2 (*Enchytraeus*) aan dit rapport toegevoegd.

Tevens zijn voor een aantal experimenten de concentratie-effect relaties in afbeeldingen opgenomen. In de afbeeldingen is voor iedere concentratie met meerdere waarnemingen het gemiddelde en de standard error (d.i. standaard-deviatie/wortel uit de steekproef-grootte) weergegeven. Per organisme worden de resultaten per toegepaste stof besproken

Tabel 8. EC₅₀-waarden en 95 % betrouwbaarheidsintervallen in mmol/kg van enkelvoudige metaalexperimenten met *Eisenia andrei* en *Enchytraeus crypticus*. (*-*) betekent: 95 % betrouwbaarheidsinterval kon niet gegenereerd worden, # betekent nominale in plaats van totale concentraties, n.t.b. = niet te bepalen (data niet interpreteerbaar).

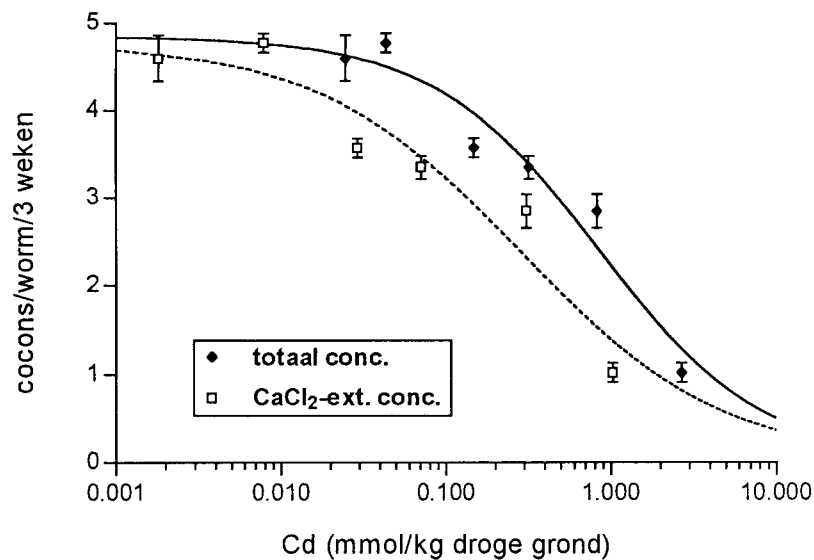
Exp. code ↓ concentratie →	coconproductie			juveniëlenaantal		
	totaal	HNO ₃	CaCl ₂	totaal	HNO ₃	CaCl ₂
1 Ea (Cd)	0.83 (0.54-1.29)	0.88 (0.57-1.37)	0.28 (0.16-0.51)	0.45 (0.27-0.75)	0.48 (0.29-0.78)	0.13 (0.07-0.26)
2 Ea (Zn)	5.95 (3.37-10.51)	9.71 (*-*)	2.06 (1.04-4.09)	5.39 (4.06-7.14)	9.63 (0.13-701)	1.83 (1.31-2.56)
3 Ea (Cl)	45.94 (34.19-61.73)#	42.67 (32.37-56.27)	-	-	-	-
4 Ea (NO ₃)	25.23 (11.36-56.03)#	-	4.59 (2.02-10.45)	-	-	-
5 Ea (Cu)	2.78 (2.06-3.75)#	-	-	-	-	-
9a Ea (Cd)	n.t.b.	-	n.t.b.	n.t.b.	-	n.t.b.
9b Ea (Zn)	14.09 (1.85-107.2)	-	4.09 (0.56-29.75)	2.78 (0.22-35.22)	-	0.76 (0.07-8.10)
10 Ec (Cd)	-	-	-	0.89 (0.72-1.10)	-	0.71 (0.60-0.85)
11 Ec (Zn)	-	-	-	4.18 (3.26-5.37)	-	0.32 (0.21-0.48)
12 Ec (Cl)	-	-	-	95.0 (*-*)#	92.8 (*-*)	-
13 Ec (NO ₃)	-	-	-	52.0 (*-*)#	-	13.4 (0.1-2394)
14a Ec (Cd)	-	-	-	0.68 (0.50-0.91)	-	0.54 (0.43-0.69)
14b Ec (Zn)	-	-	-	2.87 (2.28-3.62)	-	2.07 (1.61-2.68)

Eisenia andrei

Cadmium (1 Ea, 9a Ea).

Experiment 9a Ea heeft geen interpreteerbare resultaten opgeleverd. De responsen bij verschillende concentraties konden wegens grote spreiding in de waarnemingen niet van elkaar onderscheiden worden (zie bijlage 11a). Om deze reden wordt alleen experiment 1 Ea besproken. Afbeelding 14 geeft de concentratie-effect relatie van coconproductie tegen twee typen cadmium-concentraties: totale en CaCl₂-extraheerbare. De EC₅₀ voor de CaCl₂-extraheerbare concentraties ligt circa een factor 3 lager dan die voor totaalconcentraties. De HNO₃-extractie geeft een hogere EC₅₀ dan de totaalconcentraties. De oorzaak hiervoor is waarschijnlijk de bepaling van deze extracties in iets drogere grondmonsters en vervolgens het terugrekenen naar drooggewicht. Uit tabel 8 blijkt dat juveniëlenaantal op basis van totaalconcentraties een circa 2 keer zo gevoelige

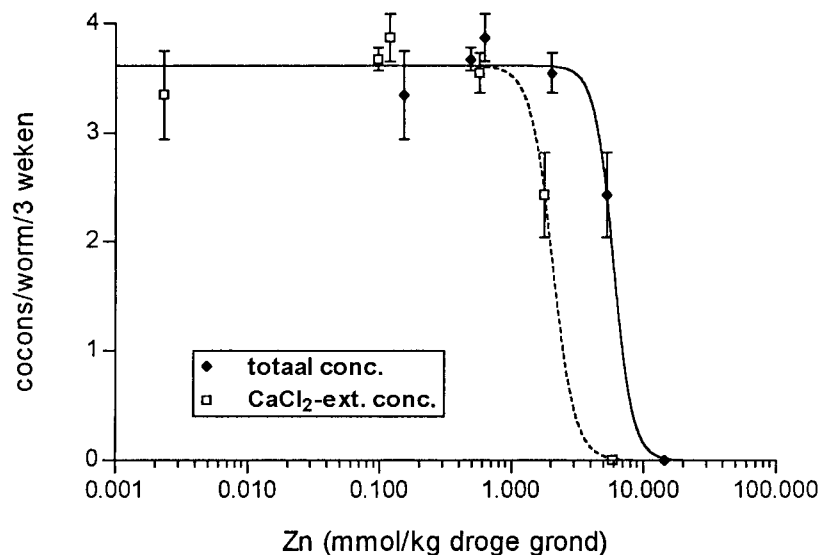
parameter is als coconproductie.



Afbeelding 14. Concentratie-effect relatie van coconproductie van *Eisenia* tegen totaal en CaCl₂-extraheerbaar Cd (experiment 1 Ea; EC₅₀-waarden zijn vermeld in tabel 8).

Zink (2 Ea, 9b Ea).

Experiment 9b Ea heeft slechts ten dele interpreteerbare resultaten opgeleverd (verklaarde variantie met het standaard logistische model ongeveer 48 % ten opzichte van 85 % voor experiment 2 Ea). Dit blijkt onder meer uit de grote betrouwbaarheidsintervallen van de EC₅₀-schattingen in tabel 8. Afbeelding 15 geeft de concentratie-effect relatie van coconproductie tegen twee typen zink-concentraties; totale en CaCl₂-extraheerbare (experiment 2 Ea). Voor coconproductie liggen de EC₅₀-schattingen hoger en voor juvenielenaantal lager in 9b Ea vergeleken met 2 Ea; de orde-grootte is ongeveer dezelfde.



Afbeelding 15. Concentratie-effect relatie van coconproductie van *Eisenia* tegen totaal en CaCl₂-extraheerbaar Zn (experiment 2 Ea; EC₅₀-waarden zijn vermeld in tabel 8).

Voor de HNO_3 -extracties van 2 Ea geldt hetzelfde als reeds opgemerkt bij 1 Ea (zie boven) voor zink resulterend in een geringe mate van fit. Zink blijkt voor coconproductie circa 7 en voor juvenielenaantal ongeveer 13 keer minder toxisch dan cadmium (HNO_3 -extracties wegens onbetrouwbaarheid niet meegerekend). In tegenstelling tot bij cadmium is voor zink juvenielenaantal een even gevoelige parameter als coconproductie. De vorm van beide concentratie-effect curves van zink, met een gebied waarin geen effect optreedt, kan duiden op een regulatie- of beschermingsmechanisme voor dit metaal bij *Eisenia* (van Straalen & Verkleij, 1991).

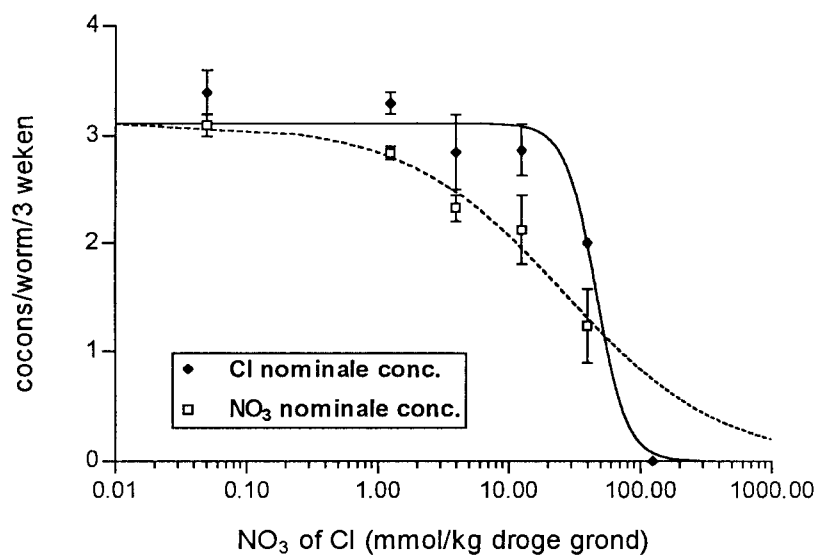
Koper (5 Ea).

Koper is qua toxiciteit intermediair vergeleken met cadmium en zink (circa 3 keer minder toxisch dan cadmium en ongeveer 2 keer zo toxisch als zink). Van dit experiment door van Gestel *et al.* (1989) zijn geen andere dan nominale metaalconcentraties bekend. In dit CuCl_2 -experiment is niet gebalanceerd voor chloride. De hoogste koper-concentratie bevat 10.1 mmol chloride/kg droge grond, waarvan op basis van experiment 3 Ea geen nadelige effecten op de coconproductie van *Eisenia* te verwachten zijn.

Chloride en nitraat (3 Ea, 4 Ea).

De toxiciteit van chloride is duidelijk van een lagere orde-grootte dan die van cadmium, koper en zink (cadmium is circa 55 keer zo toxisch). De vorm van de concentratie-effect curve lijkt sterk op die van zink, wat op regulatie van chloride zou kunnen duiden, waarschijnlijk voor de osmotische balans van de worm. Totale concentraties chloride zijn niet meetbaar na een Koningswaterdestructie, omdat laatstgenoemde voor een groot deel uit zoutzuur bestaat en dus een overmaat chloride bevat.

Nitraat is ongeveer 2 keer zo toxisch als chloride. Uitgedrukt in CaCl_2 -extraheerbare concentraties is nitraat slechts 2 keer minder toxisch dan zink. Totale nitraatconcentraties zijn niet meetbaar met een Koningswaterdestructie, omdat dit een overmaat nitraat bevat vanwege het salpeterzuur.



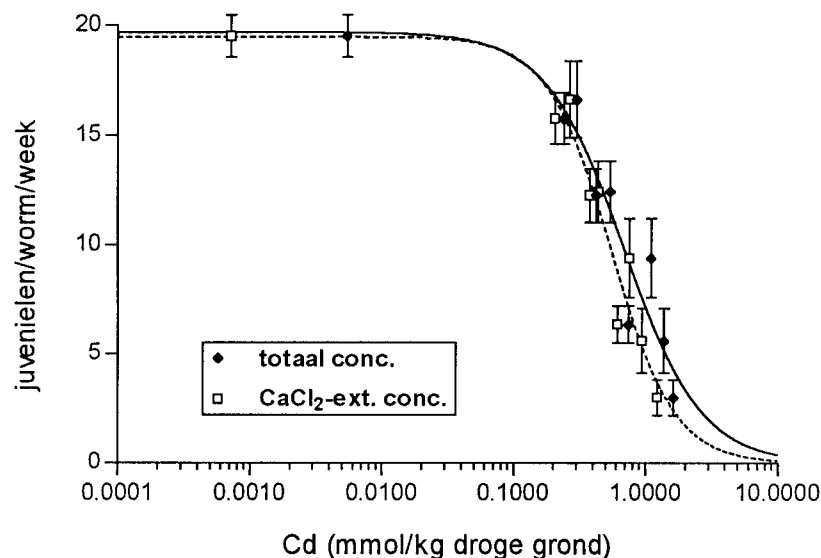
Afbeelding 16. Concentratie-effect relatie van coconproductie van *Eisenia* tegen nominale concentraties Cl en NO_3 (experiment 3 Ea en 4 Ea; EC_{50} -waarden zijn vermeld in tabel 8).

Chloride is met zijn lagere toxiciteit beter geschikt voor het handhaven van een anionbalans dan nitraat. In afbeelding 16, waarin de concentratie-effect relaties voor beide stoffen zijn uitgezet tegen coconproductie, blijkt chloride voor het eerst effect op de coconproductie te hebben bij een concentratie van circa 20 mmol/kg droge grond. Dit zou dan de maximale balansconcentratie zijn voor dit anion, wanneer alleen coconproductie bestudeerd wordt. Het is denkbaar dat de maximale chloride-balansconcentratie lager ligt in experimenten waar juvenielaantal bestudeerd wordt.

Enchytraeus crypticus

Cadmium (10 Ec, 14a Ec).

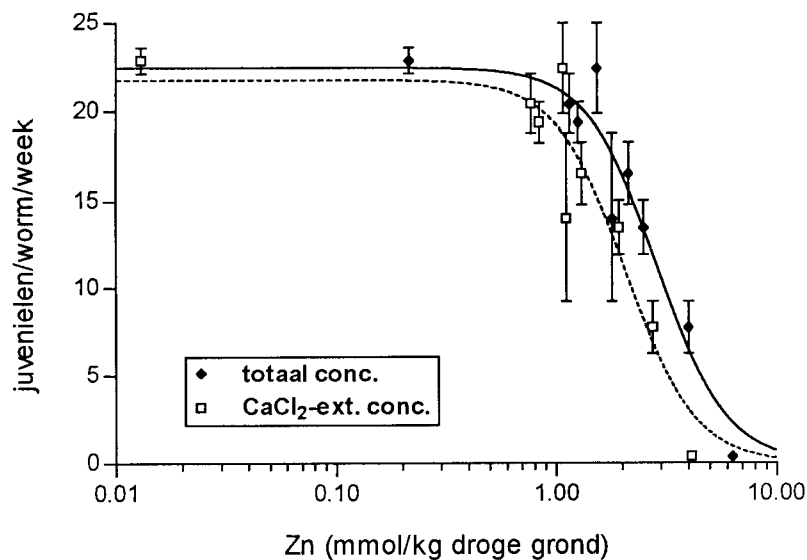
De beide cadmium-experimenten 10 Ec en 14a Ec zijn onderling goed vergelijkbaar; laatstgenoemde experiment levert een iets lager EC₅₀-waarde op. De toxiciteit van cadmium voor *Enchytraeus* is lager dan die voor juvenielaantal van *Eisenia* (minimaal 1.5 keer lager voor totale concentraties en maximaal 5.5 keer zo laag voor CaCl₂-extraheerbare concentraties).



Afbeelding 17. Concentratie-effect relatie van juvenielaantal van *Enchytraeus* tegen totaal en CaCl₂-extraheerbaar Cd (experiment 14a Ec; EC₅₀-waarden zijn vermeld in tabel 8).

Zink (11 Ec, 14b Ec).

De beide zink-experimenten 11 Ec en 14b Ec zijn voor totaalconcentraties redelijk vergelijkbaar (het verschil is een factor 1.5). Voor CaCl₂-extraheerbare concentraties is het verschil in EC₅₀-waarden echter 6.5. De oorzaak voor dit grote verschil is de lage extraheerbaarheid van zink in experiment 11 Ec (op EC₅₀-niveau 7.7 %) en de juist hoge extraheerbaarheid in experiment 14b Ec (op EC₅₀-niveau 72 %). Het laatstgenoemde percentage is overigens consistent met dat van het synchroon ingezette equitoxische mengsel 14c Ec. De factor 10 die tussen de twee extraheerbaarheden ligt doet een fout in de analytische concentratiebepalingen vermoeden, maar deze kon niet getraceerd worden. In de *Eisenia*-experimenten 2 Ea en 9b Ea met iets ander OECD-medium, is de gemiddelde extraheerbaarheid van zink op EC₅₀-niveau overigens 30 %. Vergeleken met juvenielaantal van *Eisenia* (2 Ea) is *Enchytraeus* gevoeliger voor zink. Ook voor *Enchytraeus* geldt dat cadmium toxischer is dan zink voor juvenielaantal. De vorm van de concentratie-effect curves (vergelijk afb. 17 en 18) van beide metalen komt meer overeen dan bij *Eisenia* (afb. 14 en 15).



Afbeelding 18. Concentratie-effect relatie van juvenielenaantal van *Enchytraeus* tegen totaal en CaCl₂-extraheerbaar Zn (experiment 14b Ec; EC₅₀-waarden zijn vermeld in tabel 8).

Chloride en nitraat (12 Ec, 13 Ec).

De toxiciteit van nitraat is hoger dan die van chloride voor juvenielenaantal van *Enchytraeus*. De helling van beide concentratie-effect curves is erg steil, maar door de geringe mate van fit (geen of erg grote 95 % betrouwbaarheidsintervallen) zijn aan dit gegeven geen uitspraken te verbinden. De twee wormen *Eisenia* en *Enchytraeus* reageren wat relatieve gevoeligheid betreft hetzelfde op nitraat en chloride, maar de EC₅₀-waarden liggen voor juvenielenaantal van *Enchytraeus* circa twee maal zo hoog als die voor coconproductie van *Eisenia*. Daar juvenielenaantal voor *Eisenia* over het algemeen een gevoeliger parameter is dan coconproductie, kan het verschil in gevoeligheid tussen de twee wormsoorten voor nitraat en chloride verder uit elkaar komen te liggen.

4.4 Effecten van meervoudige blootstelling

Inleiding

Na de enkelvoudige proeven zijn combinatie-experimenten ingezet. De EC₅₀-waarden op basis van totaalconcentraties worden bij het maken van equitoxische mengsels als één toxic unit gehanteerd. In voorkomende gevallen zijn EC₅₀'s op basis van nominale concentraties gebruikt als richtlijn voor het opzetten van equitoxische mengsels, omdat de chemische analyses van de totale concentraties (nog) niet beschikbaar waren. Achteraf vond dan herberekening van de toxic units van het mengsel plaats op basis van de chemische analyseresultaten. Berekening van toxic units op basis van extraheerbare concentraties vindt altijd achteraf plaats. Voor de experimenten 9c Ea en 14c Ec geldt dat de toxic units voor het mengsel werden berekend met de tegelijkertijd ingezette singles (respectievelijk 9a Ea, 9b Ea en 14a Ec, 14b Ec). De experimenten 7 Ea, 8 Ea, 9c Ea en 14c Ec bevatten behalve een equitoxische mengsel concentratiereeks ook een viertal niet-equitoxische mengsels. Met behulp van het toxic unit-model zijn deze resultaten echter niet uit te werken.

Karakterisering van effecten van de toegepaste mengsels vindt plaats met de criteria van 3.4.

In tabel 9 zijn de EC₅₀-waarden met hun 95 % betrouwbaarheidsintervallen weergegeven zoals

bepaald in de mengselexperimenten voor verschillende typen concentraties en gemeten parameters, zodat vergelijking binnen en tussen experimenten mogelijk is.

De concentratie-effect curves waarmee de EC_{50} -waarden zijn bepaald, worden beschreven door formule (6) uit 3.4. De parameterwaarden (b, M, C) van formule 6 en de r^2 (indicatie voor de mate van fit) van de afzonderlijke concentratie-effect curves zijn als bijlagen 1 (*Eisenia*) en 2 (*Enchytraeus*) toegevoegd.

Tabel 9. EC_{50} -waarden en 95 % betrouwbaarheidsintervallen in toxic units van metaalcombinatie-experimenten met *Eisenia andrei* en *Enchytraeus crypticus*.

n.t.b. = niet te bepalen (data niet interpreteerbaar).

¹⁾ De EC_{50} voor dit mengsel volgens het lineair logistisch model is 3.17 (1.36 - 7.43) TU.

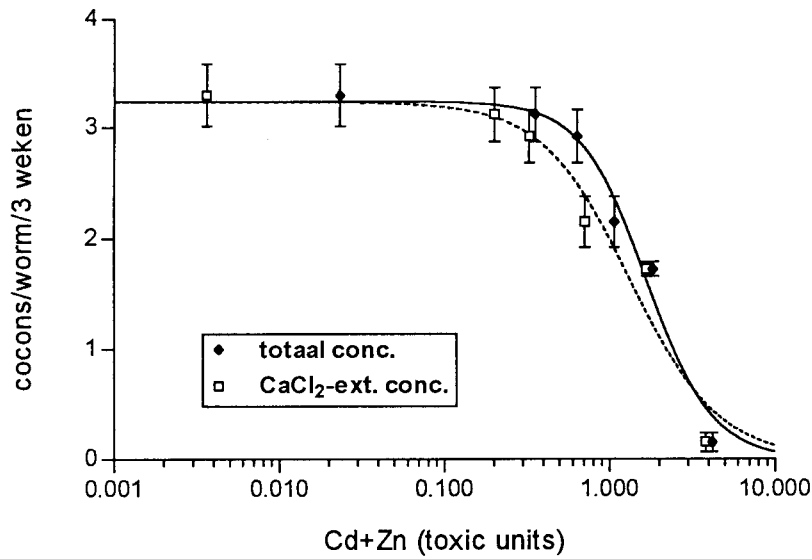
Exp. code ↓ concentratie →	coconproductie			juveniëlenaantal		
	totaal	HNO ₃	CaCl ₂	totaal	HNO ₃	CaCl ₂
6 Ea (Cd+Zn)	1.69 (1.35-2.12)	1.66 (1.28-2.16)	1.35 (0.96-1.90)	2.22 (1.45-3.38)	2.21 (1.36-3.59)	1.81 (0.96-3.39)
7 Ea (Cd+Cu)	1.81 (1.29-2.54)	-	-	-	-	-
8 Ea (Zn+Cu)	2.07 (1.75-2.45) ¹⁾	-	-	-	-	-
9c Ea (Cd+Zn)	n.t.b.	-	n.t.b.	n.t.b.	-	n.t.b.
14c Ec (Cd+Zn)	-	-	-	1.41 (1.09-1.82)	-	1.31 (1.06-1.62)

Eisenia andrei

Cadmium-zink (6 Ea, 9c Ea).

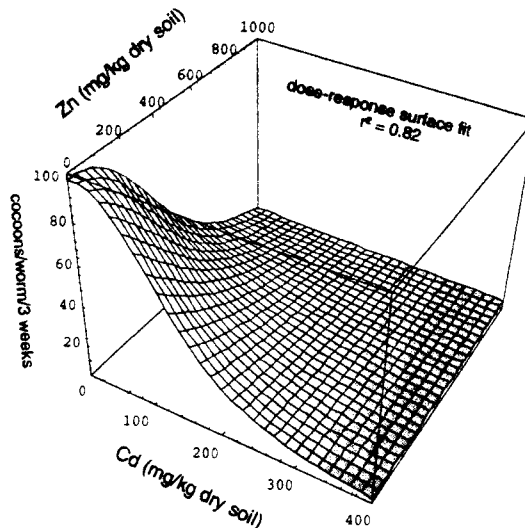
Experiment 9c Ea leverde nagenoeg geheel oninterpreteerbare gegevens op. De responsen bij verschillende concentraties konden wegens grote spreiding in de waarnemingen niet van elkaar onderscheiden worden (zie bijlage 11c). Om deze reden wordt alleen experiment 6 Ea besproken (zie afb. 19).

Voor beide reproductieparameters van *Eisenia andrei* heeft de combinatie cadmium/zink, ongeacht het concentratietype waarin het mengsel wordt uitgedrukt, een minder dan concentratie-additief effect (alle EC_{50} -waarden > 1 TU). Op coconproductie hebben de metalen voor alle drie concentratie-typen een respons-additief (met $r < 1$) effect ($1 \text{ TU} < EC_{50} < 2 \text{ TU}$) en op juveniëlenaantal een antagonistisch effect ($EC_{50} > 2 \text{ TU}$), behalve wanneer het mengsel wordt uitgedrukt op basis van CaCl₂-extraheerbare concentraties; dan is het effect van het cadmium/zink-mengsel op juveniëlenaantal respons-additief ($r < 1$). Het combinatie-effect van het mengsel is voor totaal- en HNO₃-extraheerbare concentraties nagenoeg gelijk; iets lager voor HNO₃-extraheerbare concentraties. Als het cadmium/zink-mengsel wordt uitgedrukt op basis van CaCl₂-extraheerbare concentraties "verschuift" het combinatie-effect in de richting van concentratie-additie. Concentratie-additie valt, voor de CaCl₂-extraheerbare concentraties, binnen de in tabel 9 vermelde 95 % betrouwbaarheidsintervallen van de EC_{50} voor beide reproductieparameters. Het mengsel is op basis van extraheerbare concentraties blijkbaar toxischer dan op basis van totaalconcentraties.

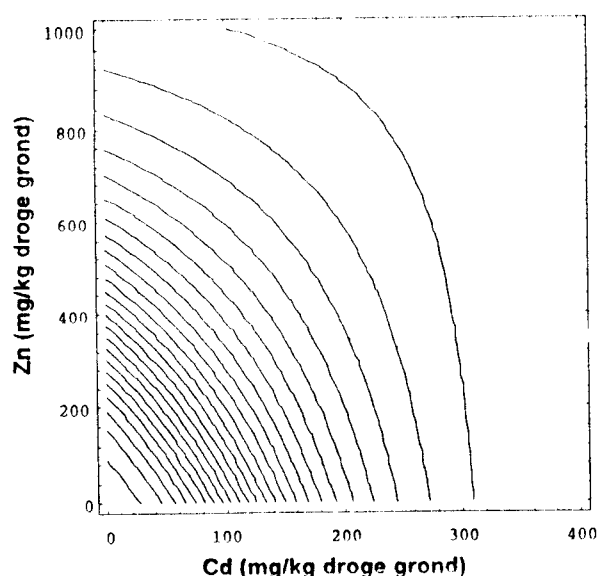


Afbeelding 19. Concentratie-effect relatie van coconproductie van *Eisenia* tegen toxic units Cd+Zn op basis van totaal- en CaCl₂-extraheerbare concentraties (experiment 6 Ea; EC₅₀-waarden zijn vermeld in tabel 9).

De coconproductie-gegevens van de experimenten 1 Ea, 2 Ea en 6 Ea op basis van totaalconcentraties zijn tevens met behulp van het isobolenmodel geanalyseerd om het combinatie-effect van cadmium en zink op een andere manier in beeld te brengen (afb. 20 en 21). Hiertoe zijn de coconproducties per experiment in procenten uitgedrukt, om voor verschillen in de controle te compenseren, die onder andere veroorzaakt werden door verschillende nitraatbalansconcentraties in deze asynchrone experimenten. Voorafgaand aan de fitprocedure zijn de concentraties niet getransformeerd met behulp van de natuurlijke logaritme; de oorspronkelijke concentraties worden rechtstreeks in het model toegepast.



Afbeelding 20. Concentratie-effect oppervlak voor percentage coconproductie van *Eisenia* tegen totaalconcentraties Cd en Zn (experimenten 1 Ea, 2 Ea en 6 Ea samen).



Afbeelding 21. Isobolen van diverse effectniveaus voor coconproductie van *Eisenia* in het Cd/Zn-vlak, afgeleid uit het concentratie-effect oppervlak van afbeelding 20.

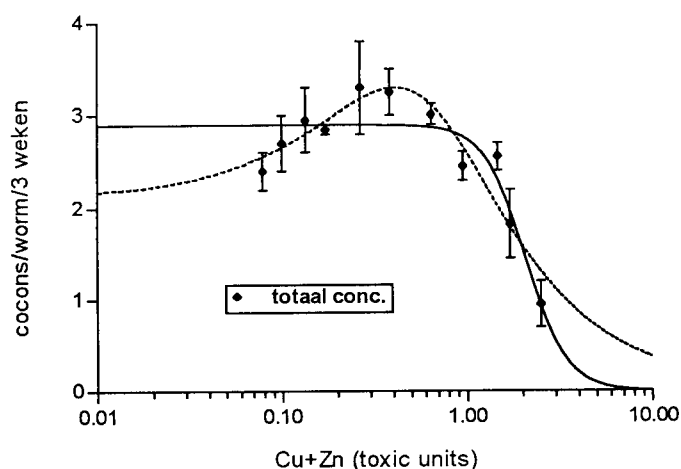
De convexe vorm van de isobolen geeft aan dat het effect van het mengsel minder dan concentratie-additief is, anders zouden de lijnen recht zijn (zie 2.4 en afb. 5). De isobolen liggen in het gebied van de partiële additie, dat wil zeggen tussen concentratie-additie en respons-additie (met $r = 1$) in. Dit is in overeenstemming met de resultaten van het toxic unit model (afb. 19) waarin een respons-additief (met $r < 1$) effect gevonden werd.

Cadmium-koper (7 Ea).

Het combinatie-effect op coconproductie van het op totaal-concentraties gebaseerde cadmium/koper-mengsel is van hetzelfde type en van dezelfde orde-grootte als dat van het cadmium/zink-mengsel: respons-additief (met $r < 1$). De EC_{50} -waarde is 1.81 (1.29 - 2.54) TU, iets hoger dan die van het cadmium/zink-mengsel.

Koper-zink (8 Ea).

Het koper/zink-mengsel op basis van totaal-concentraties heeft een antagonistisch effect op coconproductie: $EC_{50} = 2.07$ (1.75 - 2.45) TU. Bij de lage concentraties van deze twee essentiële metalen is er sprake van een stimulatie (hormesis) van de coconproductie ten opzichte van de blanco, reden om naast het standaard logistische model ook het lineair logistische model (formule 7 uit 3.4) op deze dataset toe te passen (zie afb. 22). Het lineair logistische model geeft bij $p = 0.1$ een significant betere beschrijving van de dataset. De EC_{50} -schatting van het lineair logistisch model is hoger ($EC_{50} = 3.17$ (1.36 - 7.43) TU) dan die van het standaard logistisch model, doordat de schatting van de blancoprestatie (parameter C) in het lineair logistische model lager is (2.1 versus 2.9). De EC_{50} -schatting van het lineair logistische model heeft een 8.7 maal zo groot betrouwbaarheidsinterval dan die van het standaard logistische model.

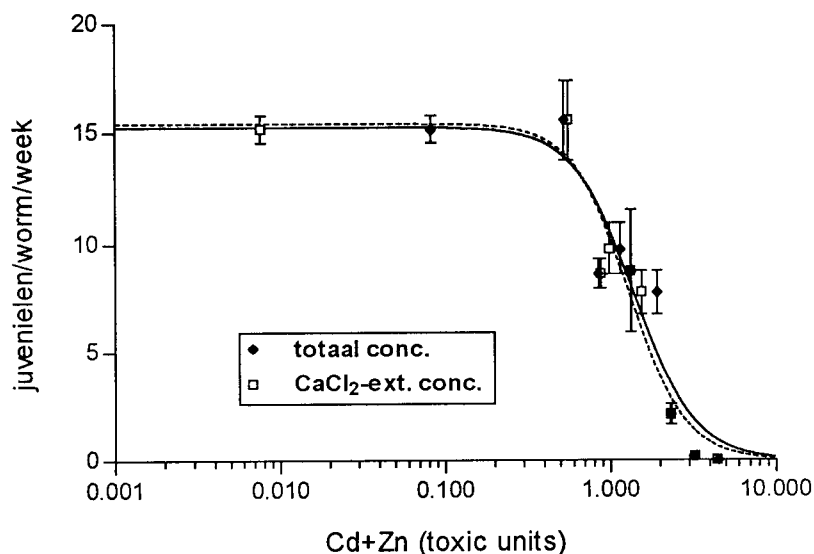


Afbeelding 22. Concentratie-effect relatie van coconproductie van *Eisenia* tegen toxic units Cu+Zn op basis van totaalconcentraties (experiment 8 Ea; EC_{50} -waarde is vermeld in tabel 9). De onderbroken lijn geeft het lineaire en de doorgetrokken lijn het standaard logistische model.

Enchytraeus crypticus

Cadmium-zink (14c Ec).

De cadmium/zink-combinatie heeft op de reproductie van *Enchytraeus* een respons-additief (met $r < 1$) effect. Ook hier geldt dat als de metaalconcentraties van het mengsel in $CaCl_2$ -extraheerbare concentraties worden uitgedrukt, er een lichte verschuiving van de EC_{50} optreedt richting concentratie-additie (afb. 23). Deze metaalcombinatie is voor *Enchytraeus* toxischer dan voor *Eisenia* (1.41 vs. 2.22 TU voor totaalconcentraties en 1.31 vs. 1.81 TU voor $CaCl_2$ -extraheerbare concentraties). Het geringe verschil tussen de lijnen van afbeelding 23 ($CaCl_2$ -extraheerbare versus totale concentraties) wordt mede veroorzaakt door de grote extraheerbaarheid van zink in dit gehele experiment (zie 4.3).



Afbeelding 23. Concentratie-effect relatie van juvenielenaantal van *Enchytraeus* tegen toxic units Cd+Zn op basis van totaal- en $CaCl_2$ -extraheerbare concentraties (experiment 14c Ec; EC_{50} -waarden zijn vermeld in tabel 9).

Algemeen

Alle toegepaste metaalmengsels hebben een respons-additief (met $r < 1$) of antagonistisch effect op de reproductie van beide wormsoorten.

Voor cadmium/zink-mengsels (toegepast in 6 Ea en 14c Ec), waarbij verschillende concentratiebepalingen zijn gedaan, is er een trend zichtbaar in EC_{50} -waarden, die aangeeft dat deze metaalcombinatie op basis van extraheerbare concentraties, toxischer is dan op basis van totale concentraties.

Dit doet het vermoeden rijzen dat er op bodem-chemisch niveau processen plaatsvinden, die de samenstelling van het mengsel wijzigen. Dit is in de vorige paragraaf (4.2) aan de hand van een tweetal hypothesen onderzocht. De beschikbaarheidshypothese gaat onverminderd op wat tot gevolg heeft dat indien twee metalen verschillen in extraheerbaarheid, de metaalverhoudingen in de extraheerbare fractie van het mengsel wijzigen en het mengsel bij oplopende totaalconcentraties steeds meer van equitoxiciteit afwijkt. Daar de respons van een organisme op een mengsel van stoffen vaak een functie is van de stofverhoudingen in het mengsel (Gessner, 1988) is dit een mogelijke verklaring voor de discrepantie tussen de toxiciteit van cadmium/zink-mengsels op basis van totale concentraties enerzijds en extraheerbare concentraties anderzijds. De interactiehypothese, kan op basis van de resultaten niet bevestigd noch ontkracht worden. Er zijn alleen enkele aanwijzingen dat de extraheerbaarheid van cadmium in een mengsel groter is dan in een enkelvoudig experiment, terwijl die van zink gelijk blijft. Op het toxicokinetische ofwel het opname-niveau, werd geen beïnvloeding van de interne concentraties zink door cadmium en vice versa gevonden.

5. DISCUSSIE EN CONCLUSIES

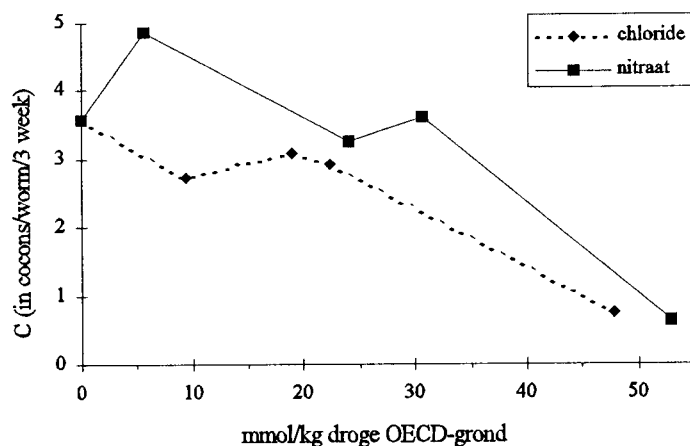
5.1 Proefopzet

Een goede proefopzet is de eerste stap tot een (statistisch) eenduidig te interpreteren mengselexperiment. Verschillende aspecten van een proefopzet voor mengselexperimenten zijn in de voorgaande hoofdstukken reeds besproken (paragrafen 2.5 en 3.3). De rol van de synchroniteit van enkelvoudige en mengsel-experimenten, de balanceringsproblemen voor het anion, de toe passen mengsels en de wijze waarop de concentraties uitgedrukt worden zijn enkele van deze aspecten, die in dit hoofdstuk besproken zullen worden. Het probleem van de gelijkvormigheid van individuele concentratie-effect curves (volgens sommige auteurs een voorwaarde voor het toepassen van de concentratie-additie hypothese met behulp van het toxic unit model) wordt hier niet verder bediscussieerd (zie 2.3).

Het *synchroon uitvoeren van experimenten* voor enkelvoudige stoffen en hun mengsels stuit in de praktijk (vaak) op capaciteitsproblemen. Naarmate er meer stoffen in een mengsel aanwezig zijn, wordt dit een steeds groter probleem. Vanuit methodologisch oogpunt bekeken is het wel de juiste manier om de effecten van het mengsel te evalueren. De vraag of stoffen concentratie-additief werken of niet wordt immers afgeleid uit de concentratie-effect curves van de individuele stoffen. Om het synchroniteitsprobleem uit te leggen kan het mengsel-experiment met *Enchytraeus* als voorbeeld dienen, waarbij alleen de totale concentraties beschouwd worden. Vooraf zijn twee experimenten (10 Ec en 11 Ec) uitgevoerd met cadmium en zink die elk een EC_{50} opleverden (0.89 en 4.18 mmol/kg). Vervolgens is er een groot experiment gedaan (14 Ec) met beide stoffen synchroon in enkelvoudige toepassing en in mengselvorm. De EC_{50} -waarden in experiment 14 Ec waren voor beide metalen lager dan in de eerste experimenten (namelijk voor cadmium 0.68 en voor zink 2.87 mmol/kg) en het mengsel op grond van deze EC_{50} 's respons-additief ($EC_{50} = 1.41$ TU). Als alleen de concentratiereeks voor het mengsel was ingezet en het resultaat daarvan was geëvalueerd met de EC_{50} -waarden uit de experimenten 10 en 11 Ec, dan was de uitkomst geweest dat cadmium en zink nagenoeg een concentratie-additief effect hebben (de EC_{50} van het mengsel zou dan 1.02 TU zijn). Deze uitkomst zou ook hebben kunnen ontstaan door (biologische) variatie in de respons van organismen op een toxicant. Een EC_{50} wordt nooit exact gerepliceerd en de EC_{50} 's voor cadmium en zink in enchytraeën-experiment 14 Ec zijn weliswaar lager maar erg dicht bij de "oude" waarden. De reproduceerbaarheid van toxiciteitsexperimenten in het algemeen speelt aldus een grote rol. Deze rol wordt groter naarmate het combinatie-effect concentratie-additie benadert, omdat het mengsel-effect hiertegen getoetst moet worden. Het is voorstelbaar dat deze variatie in EC_{50} -waarden een mengsel van iets meer naar iets minder dan concentratie-additief kan verschuiven. Kortom, synchroon uitvoeren van enkelvoudige stof-experimenten en mengsel-experimenten is een ideale voorstelling van zaken, die weliswaar nagestreefd moet worden, maar in de praktijk vaak op capaciteitsproblemen stuit. Om de proeven toch zo goed mogelijk uit te voeren zijn kunstgrepen nodig, zoals het splitsen van experimenten inclusief de handhaving van randomisatie, waarbij de prestatiegraad bij het integreren van de resultaten procentueel uitgedrukt kan worden (met de blanco-prestatie op 100 % gesteld).

De *balanceringsproblemen voor het anion* (chloride en nitraat in dit onderzoek) is vanuit toxicologisch oogpunt gezien een logische stap. Zowel nitraat als chloride zijn bij hoge concentraties toxisch voor compost- en potwormen (toxiciteit van chloride en nitraat werd bepaald in de experimenten 3 Ea, 4 Ea, 12 Ec en 13 Ec) en is aanleiding geweest in eerdere -niet vermelde- experimenten voor een bijna volledige onderdrukking van de coconproductie bij

Eisenia. Door de blancoprestaties van *Eisenia* (de C-parameters uit bijlage 1) van gebalanceerde zwaar-metaal experimenten onderling te vergelijken is er een effect zichtbaar van de anionbalans (zie afb. 24). Voor *Enchytraeus* is er geen trend waarneembaar, mede omdat er verschillende



Afbeelding 24. Effect van balansconcentraties van natrium-chloride en -nitraat op de blancoprestatie C. De hoogste nitraat en chloride concentraties, resp. 53 en 48 mmol/kg droge grond komen uit eerdere experimenten die niet in dit rapport besproken zijn.

opspoelmethoden zijn gebruikt (zie 3.3).

In een ongebalanceerde situatie zouden de hoge anionconcentraties een niet (meer) te verwaarlozen bijdrage -naast die van het zware metaal- kunnen leveren aan de totstandkoming van het bestudeerde toxische effect. Voor het werken met metaalzouten is het van belang om het voor het proefdier minst toxische anion te gebruiken. Zowel voor *Enchytraeus crypticus* als *Eisenia andrei* is nitraat ongeveer twee keer zo toxisch als chloride. Dit betekent dat chloride de beste kandidaat is voor balancering. Het is te overwegen om in plaats van een 1-waardig anion, zoals nitraat en chloride, een 2- of 3-waardig anion te gebruiken, zoals bijvoorbeeld sulfaat en fosfaat, waarmee bij dezelfde hoeveelheid toegevoegd metaal de anionbalans slecht de helft of een derde (van het aantal molen) bedraagt. Dit kan eventuele neveneffecten van een anion in belangrijke mate reduceren.

Balancering geeft als het ware een verhoogde achtergrondconcentratie van het anion dat weliswaar een effect heeft, maar dat over de hele concentratiereeks van het te bestuderen metaalkation constant is. In wezen is er sprake van een mengselexperiment van bijvoorbeeld chloride (een vaste concentratie) en cadmium (een oplopende concentratiereeks). Voor balancering met chloride of nitraat is de aanname noodzakelijk dat deze anionen de toxiciteit van een lage concentratie teststof niet anders beïnvloeden dan die van een hoge concentratie teststof. De aanname is met enige twijfel omkleed, daar bijvoorbeeld van cadmium bekend is dat het in bodemvocht complexen aangaat met chloride-ionen (Boekhold, 1992; de Wit, 1992 en Chardon, 1984). In chloride-gebalanceerde experimenten is in de lage metaalconcentraties veel chloride aanwezig op weinig metaal, in tegenstelling tot de hoge concentraties. De complexvorming van cadmium en chloride zou invloed kunnen hebben op de opname van cadmium door wormen uit het bodemvocht en vervolgens op het waar te nemen effect.

Meer soorten mengsels -behalve equitoxische- zouden gebruikt moeten worden om de

interactie van stoffen te bepalen. De respons van een organisme op een mengsel is vaak een functie van de mengselverhouding (Gessner, 1988). Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de gevonden verschuiving in het combinatie-effect van cadmium/zink-mengsels wanneer deze worden uitgedrukt in extraheerbare concentraties in plaats van in totale concentraties (4.4). In het veld, op verontreinigde lokaties, zullen over het algemeen geen equitoxische mengsels voorkomen, maar alle mogelijke andere mengsels, soms in een constante verhouding gerelateerd aan de bron van de verontreiniging. In een aantal experimenten van dit onderzoek zijn, om deze redenen, enkele niet-equitoxische mengselconcentraties toegepast. De resultaten van deze niet-equitoxische mengsels zijn echter niet uitgewerkt, omdat het toxic unit model hier niet geschikt voor is. Het isobolenmodel kan hierin voldoen daar het ineens alle soorten mengsels tussen twee stoffen kan beschrijven. Dit model is in voorbereiding voor toepassing op continue responsen.

Concentraties van toxicanten kunnen op verschillende manieren uitgedrukt worden. Metalen kunnen als totaal-, uitwisselbare, uitschudbare, extraheerbare of interne concentratie weergegeven worden. De wetenschappelijke vraag en de organismen waarmee het onderzoek uitgevoerd wordt bepalen in hoge mate de te onderzoeken metaalfractie die gebruikt wordt voor bestudering van milieuchemische interacties en toxische effecten. Voor wormen die een permeabele huid hebben ligt het voor de hand een relatie met de extraheerbare concentratie te bepalen. Andere voorbeelden zijn carnivore loopkevers en strooiselbewonende springstaarten, waarvoor de biobeschikbaarheid benaderd zou kunnen worden met metaalconcentraties in respectievelijk prooidieren en schimmels en algen. Het is interessant om te onderzoeken of een ander dan de totale concentratie beter correleert met de optredende respons, omdat dit een indicatie kan geven van het voor dat organisme beschikbare deel van de metalen. Opname-effect studies zijn in dit kader een belangrijke informatiebron waaraan nog te weinig aandacht is besteed in mengselexperimenten. Voor experiment 9 Ea zijn de interne cadmium- en zinkconcentraties van *Eisenia andrei* bepaald. Helaas leverde het toxicologische deel van het experiment, dat wil zeggen de reproductiewaarnemingen, grotendeels oninterpreteerbare gegevens op, zodat een duidelijke relatie tussen interne concentratie en effect op de reproductie niet gelegd kon worden (zie verder 5.2).

Bij onderzoek wat (mede) tot doel heeft bodemnormen te evalueren, moeten metaalconcentraties echter altijd op één of andere manier teruggerekend worden naar totale concentraties, omdat de Nederlandse bodemnormen daarin uitgedrukt zijn (zie ook 6.4). Voor een aantal experimenten in dit onderzoek kunnen extraheerbare met totale concentraties vergeleken worden. Indien het mengselexperimenten betreft, waarbij de concentraties uitgedrukt zijn in toxic units, dan geeft dit de mogelijkheid tot het vergelijken van EC_{50} -waarden voor verschillende metaalfracties binnen één experiment. Als het combinatie-effect wijzigt bij de overgang van het totaal- naar een andere concentratie, dan geeft dat een aanwijzing voor een mogelijke interactie op een tussenliggend niveau. De milieu-chemische resultaten in dit onderzoek geven middels de beschikbaarheidshypothese sterke aanwijzingen voor optredende verschuivingen in de mengselverhoudingen van cadmium en zink, wanneer deze als extraheerbare concentraties worden uitgedrukt. De interactiehypothese heeft met de resultaten geen eenduidig beeld opgeleverd, maar gaf wel aanwijzingen voor een veranderende beschikbaarheid van cadmium onder invloed van zink.

5.2 Effecten van metalen op pot- en compostwormen

Voor *Eisenia andrei*, waar twee reproductieparameters als prestatie maat gebruikt kunnen worden om toxische effecten te meten, kan geconcludeerd worden dat juvenielenaantallen voor eenvoudige metalen een gevoeliger parameter is dan de coconproductie. Voor het cadmium-zink-mengsel geldt het omgekeerde, daar is juvenielenaantallen minder gevoelig. Zowel voor coconproductie en juvenielenaantal van *Eisenia* als juvenielenaantal van *Enchytraeus* geldt dat cadmium toxischer is dan zink. Koper is qua toxiciteit intermediair ten opzichte van cadmium en zink voor de coconproductie van *Eisenia*.

De belangrijkste conclusie die uit dit onderzoek getrokken kan worden is dat cadmium en zink ten aanzien van reproductieparameters voor beide wormsoorten een minder dan concentratie-additief effect hebben. Voor *Eisenia andrei* geldt bovendien dat combinaties van koper met zink of cadmium eveneens een minder dan concentratie-additief effect hebben. In bijna alle gevallen is er sprake van respons-additie met positief gecorreleerde gevoeligheden van reproductie voor respectievelijk cadmium en zink (EC_{50} -waarden van de mengsels tussen 1 en 2 TU). Een antagonistisch effect - EC_{50} -waarden van de mengsels boven de 2 TU- werd waargenomen voor juvenielenaantal bij *Eisenia* als het cadmium-zink-mengsel werd uitgedrukt op basis van totaal- of HNO_3 -extraheerbare concentraties en voor coconproductie in het zink-koper experiment.

Alle EC_{50} -waarden van de in dit onderzoek beschreven equitoxische metaalcombinaties hebben een grootte van circa 2. Deze orde grootte doet het vermoeden rijzen dat wellicht slechts één metaal verantwoordelijk is voor de toxiciteit, zoals bij de plant *Trifolium pratense* gevonden is voor de combinatie cadmium en zink (van der Hoeven & Henzen, 1994). Dit zou betekenen dat de metaalcombinaties respons-additief werken (met volledig positieve correlatie tussen de gevoeligheden van reproductieparameters voor beide metalen: $r = 1$). Vooralsnog is dit slechts een vermoeden dat door verder onderzoek al dan niet bevestigd zou kunnen worden. De verdere ontwikkeling en toepassing van het isobolenmodel kan op dit punt wellicht opheldering verschaffen. De vorm van de isobolen, convex krom of hoekig, bij respectievelijk partiële additie en respons-additie met $r = 1$ geeft op deze manier inzicht in dit aspect (zie afbeelding 5).

Een opvallend verschijnsel is dat het combinatie-effect in alle gevallen op dezelfde wijze afhankelijk is van de manier waarop de metaalconcentratie uitgedrukt wordt. Er is een trend waarneembaar van het verschuiven van het combinatie-effect van antagonisme in de richting van concentratie-additie gaand van totaal- via HNO_3 -extraheerbare naar $CaCl_2$ -extraheerbare concentraties. Met andere woorden: hoe "zachter" de extractie, hoe toxischer het mengsel. Bij *Eisenia* ligt concentratie-additie binnen het 95 % betrouwbaarheidsinterval van de EC_{50} van het cadmium/zink-mengsel uitgedrukt in $CaCl_2$ -extraheerbare concentraties. Voor *Enchytraeus* geldt dat de ondergrens van het betrouwbaarheidsinterval van de EC_{50} voor het cadmium/zink-mengsel bijna gelijk is aan 1, dat wil zeggen een concentratie-additief effect. Dit zou kunnen betekenen dat het licht antagonistische deel van de interactie zich afspeelt op het niveau van bodemdeeltjes en dat cadmium en zink concentratie-additief werken in de waterfase van de bodem. Dit wordt bevestigd door analyse van de interne concentraties cadmium en zink in *Eisenia* van experiment 9 Ea. De resultaten wezen uit dat er geen wederzijdse beïnvloeding van de twee metalen is op opnameniveau. Concentratie-additie sluit hier goed bij aan als combinatie-werking, omdat het geen interactie tussen beide stoffen veronderstelt.

Het verschil in EC_{50} -waarden voor extraheerbare en totale concentraties kan duiden op een intermedierende rol van de bodem als blootstellingsmatrix. Blijkbaar vindt er interactie plaats op het niveau van bodemdeeltjes, die tot gevolg heeft dat het mengsel "toxischer" wordt. Te denken valt aan competitie tussen cadmium en zink om dezelfde sorptieplaatsen van bijvoorbeeld

humuszuren, waarbij het meest toxische metaal, cadmium, meer beschikbaar wordt. De uitwerking van de bodemchemische analyses in dit onderzoek bevestigt de grotere extraheerbaarheid van cadmium (beschikbaarheidshypothese) maar niet eenduidig de competitie tussen de metalen (interactie-hypothese) (zie 4.2).

Chardon (1984) vond voor de wateruitschudbare concentratie van cadmium een duidelijke invloed van een 100-voudige overmaat aan zink (of koper) en een geringe invloed van een 10-voudige overmaat. Bij de in dit onderzoek toegepaste mengsels was zink in een circa 6-voudige overmaat aanwezig, waardoor de gevoeligheid van de methode om bodem-chemische interacties op dat niveau te bepalen groot moet zijn. Wellicht dat de 0.01 M CaCl₂-extractie een te grove methode is voor de analyse van bodemchemische interacties of dat de Freundlich-vergelijking op deze experimenten niet van toepassing is, door het gebruik van equitoxische metaalmengsels waarin twee metaalconcentraties tegelijk oplopen in combinatie met een anion-balans. Het gebruik van wateruitschudbare concentraties of poriewaterconcentraties in een mengselexperiment met metalen zou bodemchemische interacties met behulp van een Freundlich-vergelijking beter zichtbaar kunnen maken.

5.3 Vergelijking met andere mengselexperimenten

Vergelijking met andere data uit de terrestrische ecotoxicologie is nauwelijks mogelijk door het gebrek aan deze gegevens. De schaarse gegevens betreffen twee EC₅₀'s voor een equitoxisch cadmium/zink-mengsel voor wortel- en spruitgroei van de rode klaver, *Trifolium pratense*, van respectievelijk 1.76 en 1.61 TU (van der Hoeven & Henzen, 1994). Deze getallen zijn gebaseerd op totaalconcentraties van de bodem. De auteurs merken op dat de waargenomen effecten geheel verklaard kunnen worden met behulp van interne cadmiumconcentraties. Daarnaast zijn er nog gegevens over de bodembewonende springstaart *Folsomia candida*, die waarschijnlijk door middel van vochtopname via de ventrale buis de metalen uit de grond opneemt. Verschillende soorten mengsels van cadmium en zink in OECD-kunstgrond resulteerden bij dit organisme in EC₅₀'s voor groei gemeten op t = 2, 4 en 6 weken van respectievelijk 1.00, 1.28 en 1.47 TU. De EC₅₀-waarden voor reproductie op t = 4 en 6 weken bedroegen 0.76 en 1.10 TU (van Gestel & Hensbergen, 1994). Ook deze getallen zijn gebaseerd op totale metaalconcentraties. Daarnaast hebben Hensbergen en van Gestel (1995) uit gegevens over een cadmium- en zinkmengsel van van Capelleveen (1987) een grove EC₅₀-schatting gemaakt voor voedselconsumptie door de pissebed *Porcellio scaber*. Deze *via het voer* blootgestelde organismen hadden voor consumptie EC₅₀-waarden van 1.18 en 1.12 toxic units. Afgezien van de EC₅₀-waarde voor groei van *Folsomia candida* op t = 2 en die van reproductie op t = 4 weken, geven alle data (de gegevens uit dit onderzoek gecombineerd met de bovenstaande gegevens uit het terrestrische milieu) een minder dan concentratie-additief effect aan voor mengsels van cadmium en zink.

Een minder dan concentratie-additief effect van metaalcombinaties werd als één van de mogelijke verklaringen geopperd voor de uitkomst van experimenten met *Eisenia andrei* in "natuurlijk verontreinigde" grond uit de omgeving van een zinksmelter (Budel). In deze grond, verontreinigd met diverse metalen (onder andere zink, koper, cadmium en lood) trad een geringer effect op dan werd verwacht op grond van de effecten van de individuele metalen in kunstmatig verontreinigde OECD-kunstgrond (Posthuma *et al.*, 1994). Door het uitvoeren van accumulatie-experimenten met *Eisenia andrei* in zowel smeltergrond als kunstgrond met dezelfde totaalconcentratie aan cadmium, bleek dat biobeschikbaarheid ook een rol speelde, daar er in de smeltergrond nauwelijks, maar in de kunstgrond wel een duidelijke cadmiumaccumulatie plaatsvond.

Meer gegevens over metaalinteracties kunnen gevonden worden in de aquatisch-toxicologische literatuur. Een belangrijk verschil bij het vergelijken van terrestrische en aquatische gegevens met betrekking tot mengseltoxiciteit is voor terrestrische studies de aanwezigheid van de bodemmatrix als extra interactieniveau. In tabel 10 zijn ter vergelijking een aantal toxiciteitsgegevens verzameld over metaal-interacties bij een zoetwaterevertebraat, de driehoeksmossel *Dreissena polymorpha* (uit Kraak *et al.*, 1993 en Kraak *et al.*, 1994).

Tabel 10. Gegevens over het effect van metaalmengsels bij *Dreissena polymorpha*.

metalencombinatie (parameter)	EC ₅₀ (karakterisering)
Cd + Zn (filtratiesnelheid 48 uur)	0.94 TU (conc.-additief)
Cu + Zn (filtratiesnelheid 48 uur)	1.63 TU (< conc.-additief)
Cd + Cu (filtratiesnelheid 48 uur)	0.64 TU (> conc.-additief)
Cd + Cu + Zn (filtratiesnelheid 48 uur)	0.84 TU (conc.-additief)
Cd + Cu (filtratiesnelheid 8 weken)	EC ₅₀ kon niet bepaald worden (< conc.-additief)

In tabel 11 zijn gegevens geturfd over de aard van de werking of het effect van vier metaalcombinaties op verschillende parameters van diverse organismen uit zowel humane als aquatische toxicologie (gegevens verzameld door Hensbergen & van Gestel (1995)). De gegevens van tabel 10 zijn in tabel 11 verwerkt.

Tabel 11. Cumulatie van verzamelde gegevens omtrent metaalinteracties tussen cadmium, koper en zink.

metaalmengsel	aantal gevallen < conc.-additie	aantal gevallen conc.-additie	aantal gevallen > conc.-additie
Cd + Zn	4	3	1
Cd + Cu	1	2	6
Cu + Zn	1	1	3
Cd + Cu + Zn	1	2	0

Voor een cadmium- en zinkmengsel wordt over het algemeen een minder dan concentratie-additieve werking of effect waargenomen. Combinaties van koper met cadmium of zink geven vaker een meer dan concentratie-additieve werking of effect te zien en het tertiaire mengsel met alle drie de metalen werkt in twee van de drie gevallen concentratie-additief. Vergeleken met de gegevens van *Eisenia* en *Enchytraeus* zijn de (voornamelijk) aquatische data van tabel 11 alleen voor het cadmium/zink-mengsel in overeenstemming. De overige combinaties (cadmium/koper en koper/zink) zijn voor de oligochaeten in ons onderzoek minder toxisch dan in het aquatische milieu.

5.4 Eindconclusies

Om voor het bodembeschermingsbeleid een conclusie te generaliseren over het antagonistische of partieel additieve effect van cadmium en zink zijn meer gegevens nodig van "random" gekozen uiteenlopende organismen. Mengselexperimenten zijn in voorbereiding met de springstaartsoorten *Orchesella cincta* en *Tomocerus minor*. Hiervoor zijn massakweken van deze dieren opgezet en zijn met *Orchesella cincta* reeds enkele voorexperimenten gedaan waarbij het voer, groene algen, kunstmatig verontreinigd werd met Cd- of ZnCl₂. Voor een uitspraak over het combinatie-effect van koper met cadmium of zink zijn voor het terrestrische milieu nog minder gegevens. Daar voor deze experimenten geen extracties met CaCl₂ zijn uitgevoerd is er over de milieu-chemie van deze metaal-mengsels nog maar weinig bekend.

Om chemische interacties van metalen in de bodem beter te kunnen bestuderen met behulp van de Freundlichvergelijking zijn metingen nodig van wateruitschudbare of poriewaterconcentraties van metaalmengsels.

6. BELEIDSMATIGE ASPECTEN

6.1 Inleiding

De centrale vraag voor het bodembeleid is of een combinatie van stoffen, aanwezig in concentraties onder de individuele stofnormen, kan leiden tot overschrijding van de risicogrens. Indien een risicogrens op deze wijze overschreden kan worden, dan zou er in het beleid rekening gehouden moeten worden met gelijktijdige blootstelling aan verontreinigende stoffen, omdat individuele stofnormen in voorkomende gevallen blijkbaar niet voldoende bescherming bieden. De geschetste situatie wordt van een theoretisch beschouwing tot een reëel probleem als gegeven is dat a) een verontreiniging in de regel uit een combinatie van stoffen bestaat en slechts zeer zelden uit één stof en b) er wetenschappelijke onderzoeksgegevens voorhanden zijn, die aantonen dat combinaties van stoffen over het algemeen een gedeeltelijk of volledig concentratie-additief effect vertonen. Deze wetenschappelijke gegevens betreffen voornamelijk aquatisch-toxicologisch onderzoek want, zoals in het inleidende hoofdstuk reeds is opgemerkt, voor het terrestrisch ecosysteem ontbreken deze gegevens nagenoeg geheel.

Het huidige bodembeschermingsbeleid kent twee normen, de streefwaarde en de interventiewaarde. Bij de afleiding van de streefwaarde is rekening gehouden met mogelijk optredende combinatiewerkingen tussen stoffen door het maximaal toelaatbaar risico (MTR) te delen door 100 (zie 1.1). Bij afleiding van de interventiewaarde wordt geen rekening gehouden met mogelijk optredende combinatietoxiciteit. Op interventiewaarde-niveau zijn bodem-chemisch sterkere interacties te verwachten dan op streefwaarde-niveau, omdat sorptieplaatsen in de bodem dan verzadigd raken (Chardon, 1984). Deze competitie-effecten leiden over het algemeen tot een hogere metaalbeschikbaarheid. Combinatietoxiciteit kan op interventiewaarde-niveau een rol spelen met name bij de beoordeling van verontreinigde lokaties. Bij aanwezigheid van meerdere stoffen *onder* de interventiewaarde kan er sprake zijn van een ernstig geval van bodemverontreiniging (zie 1.1, van den Berg & Roels, 1991; Technische Commissie Bodembescherming, 1992).

6.2 Streefwaarden en normstelling voor mengsels

De factor 100, die gehanteerd wordt bij de afleiding van streefwaardes, moet compenseren voor een aantal onzekerheden, waaronder een mogelijk optredende combinatiewerking van stoffen. Overigens is bij de afleiding van streefwaardes voor metalen ook rekening gehouden met natuurlijke achtergrondgehalten. Uitsplitsen van de factor 100 naar de verschillende onzekerheden kan slechts plaatsvinden indien bekend is hoe de onzekerheden zich (kwantitatief) ten opzichte van elkaar verhouden. Voor een uitgebreide discussie rond de factor 100 wordt verwezen naar het advies over het project Integrale Normstelling Stoffen van de Technische Commissie Bodembescherming (1994). De onzekerheden rond het optreden van combinatiewerkingen van stoffen kunnen gereduceerd worden door 1) het vergroten van kennis omtrent de effecten van stofmengsels op bodemecosystemen en 2) door het beschikbaar maken van bestaande kennis uit de aquatische ecotoxicologie voor de bodem. Het voordeel van de laatste mogelijkheid is dat daardoor veel reeds bestaande kennis kan worden gebruikt en bovendien is methodiek daarvoor al gedeeltelijk beschikbaar in Denneman & van Gestel (1991). Onderzoek naar de effecten van allerlei mogelijke stofmengsels op bodemecosystemen is zeer omvangrijk en daardoor niet

haalbaar. Realistischer lijkt het dan ook dit steekproefsgewijs te doen, ter toetsing van de geformuleerde uitgangspunten.

Op grond van de experimentele resultaten uit dit onderzoek met verschillende metaalmengsels bij wormachtigen, kan geconcludeerd worden dat het VR voldoende bescherming lijkt te bieden voor *deze* stoffen onderling. Echter, het is niet bekend hoe andere stoffen dan metalen in het bodemsysteem interacteren (onderling en met metalen).

In het meest ideale geval, dat wil zeggen bij de beschikbaarheid van gegevens over combinatie-effecten bij 5 terrestrische organismen van een specifiek mengsel van stoffen, kunnen deze gegevens met een risicoschattingmethode volgens van Straalen & Denneman (1989) of Aldenberg & Slob (1993) worden geëvalueerd. Op deze wijze zouden er streefwaarden voor specifieke mengsels opgesteld kunnen worden consistent met de huidige streefwaarden voor individuele stoffen. Dit is slechts te overwegen als een zeer specifieke verhouding van stoffen veel voorkomt als verontreiniging (bijvoorbeeld op industriële lokaties).

6.3 Beoordeling van verontreinigde lokaties met interventiewaardes

Voor het beoordelen van gevallen van bodemverontreiniging op een manier waarbij rekening gehouden wordt met combinatie-effecten, moet gezocht worden naar een wijze waarop interventiewaarden geïntegreerd kunnen worden in een index, zodat een verontreinigde lokatie als geheel beoordeeld kan worden. Op deze manier kunnen de risico's t.g.v. de totale verontreiniging bepaald worden. De 'index-score' van een lokatie kan dan gebruikt worden om de urgentie van aanpak vast te stellen (ten opzichte van andere lokaties). Hierbij kunnen twee gevallen onderscheiden worden:

- 1) de interventiewaarde voor één stof is overschreden, er is sprake van een "ernstig geval van bodemverontreiniging". Voor de urgentiebepaling worden combinatiewerkingen meegenomen in de beoordeling; of
- 2) de interventiewaarde is niet overschreden, maar rekening houdend met mogelijk optredende combinatiewerkingen kan er toch sprake zijn van een "ernstig geval van bodemverontreiniging". Een derde mogelijkheid is alle lokaties te beoordelen zonder vooraf een scheiding aan te brengen met het criterium "interventiewaarde overschreden".

Met betrekking tot metalen zijn reeds enige voorstellen gedaan voor lokatie-indices met een beperkte geldigheid. Webber (1972) heeft een voorstel voor een lokatie-index betreffende zink, koper en nikkel gedaan, gebaseerd op de relatieve toxiciteit van deze metalen voor planten op landbouwgronden, bemest met rioolslib. Deze index is genaamd "Zn equivalent" en is van toepassing bij pH-waarden boven 6.5. De formule is: $Zn\ equivalent\ (mg/kg\ droge\ stof) = Zn + 2 * Cu + 8 * Ni$. Bodems met een Zn equivalent hoger dan 250 mg/kg zijn in potentie toxisch. Daarnaast is er nog de "Zn/Cd ratio" gebaseerd op de antagonistische werking van zink op de assimilatie van cadmium door planten. Een veilige waarde voor deze ratio is op gewichtsbasis minimaal 100 (Diamant, 1979).

In het vervolg van deze paragraaf wordt de redenering uitgelegd voor de totstandkoming van een voorstel gedaan voor een lokatie-index die meer dan één stofgroep kan omvatten.

In de literatuur zijn een aantal voorstellen gedaan voor de beleidsmatige omgang met combinaties van verontreinigende stoffen die alle berusten op de aanname van concentratie-additieve werking tussen deze stoffen (zie Calamari & Alabaster, 1980; van Straalen, 1993). Zoals in het hoofdstuk combinatietoxicologie reeds opgemerkt, zijn alleen concentratie-additie en respons-additie (met $r = 1$, dat wil zeggen volledig positieve correlatie van gevoeligheden) geschikt voor kwantitatieve

uitwerking. Impliciet wordt reeds het respons-additieve begrip (met $r = 1$) wat inhoudt dat stoffen volledig onafhankelijk werken, gehanteerd bij de beoordeling van gevallen van bodemverontreiniging, omdat toetsing aan individuele interventiewaarden plaatsvindt. Het betekent namelijk dat er van uitgegaan wordt dat slechts één stof verantwoordelijk is voor het toxisch effect; dat is de stof die vertegenwoordigd is met het grootste aantal toxic units, oftewel met de hoogste interventiewaarde-overschrijding. Hierbij moet bedacht worden dat de toxic units (EC_{50} 's of andere toxicologische eindpunten zoals NOEC's) via de risicoschattingsmethodiek verdisconteerd zijn in de interventiewaarde voor één bepaalde stof.

Omdat een volledig onafhankelijke werking van alle verontreinigende stoffen, waar respons-additie (met $r = 1$) van uit gaat, zeer onwaarschijnlijk is, blijft concentratie-additie over als mogelijke aanpak van combinaties van stoffen. Een concentratie-additief effect is vaak gevonden voor mengsels van veel toxicanten in het aquatisch milieu (onder andere door Deneer (1988) voor organische stoffen en door Enserink *et al.* (1991) voor metalen). De aanpak volgens het relatieve concentratie-additie-model behelst een eenvoudige optelsom van op een lokatie aanwezige concentraties, C_i , van n verontreinigende stoffen, gedeeld door hun individuele normen, N_i . In dit geval zijn de interventiewaarden de normen waardoor gedeeld wordt. In eerste instantie zou dit dan gedaan kunnen worden voor stoffen uit één fysisch-chemische klasse, omdat concentratie-additie -gelijke werking, geen interactie- binnen zo'n stofgroep aannemelijk is. Op deze manier ontstaat er een stofgroepindex, SI, in formule 8 uitgewerkt voor stofgroep j .

$$SI_j = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{N_i} \quad (8)$$

De stofgroep-index SI geeft aan dat bij een waarde groter dan 1 de risicogrens voor die stofgroep wordt overschreden. Voor de breuk C_i / N_i moet wel een minimale waarde worden vastgesteld, omdat anders de natuurlijke achtergrondconcentraties van alle stoffen uit die groep waar normen voor bestaan een bijdrage leveren aan de stofgroep-index, terwijl het bij achtergrondconcentraties gaat om van nature voorkomende concentraties waar geen nadelige effecten van te verwachten zijn. Als regel kan gesteld worden dat C_i groter moet zijn dan de streefwaarde. Van den Berg & Roels (1991) stelden voor om de (toenmalige) A-waarde van de (toenmalige) C-waarde af te trekken en dat als N_i te gebruiken. Dit komt ongeveer op hetzelfde neer.

Om tot beoordeling van een lokatie als geheel te komen moeten alle afzonderlijke stofgroepindices in één index geïntegreerd worden; de lokatie-index, LI. Voor de integratie van aparte stofgroepen moet weer een aanname voor de mogelijk optreden combinatiewerking tussen stoffen uit verschillende groepen worden gedaan. Als de aanname concentratie-additie is, dan kan er lineaire optelling plaatsvinden van de per stofgroep berekende indices. Van den Berg en Roels (1991) hebben partiële additie (een vorm van respons-additie, zie hoofdstuk 2) voorgesteld als beleidsmatig te hanteren combinatiewerking voor stoffen uit verschillende groepen fysisch-chemische klassen. Dit betekent dat de stofgroepindices niet lineair opgeteld worden, maar dat deze eerst vermenigvuldigd worden met een bepaalde factor (< 1). Deze factor wordt in de hier voorgestelde lokatie-index gedefiniëerd als interactie-factor. In formule 9 is de lokatie-index gegeven voor k stofgroepen (in formule 9 is k gelijk aan 4), waarin de aparte indices voor de stofgroepen k , $k-1$, $k-2$ en $k-3$ na vermenigvuldiging met een interactiefactor (a_k , b_k en c_k) opgeteld worden. Voorwaarde voor toepassing van de lokatie-index is $k > 1$. Bij $k = 1$ wordt alleen de stofgroep-index gebruikt.

$$\begin{aligned}
 LI = \frac{1}{k-1} & [(a_k SI_{k-3} + SI_k) + (a_{k-1} SI_{k-3} + SI_{k-1}) + (a_{k-2} SI_{k-3} + SI_{k-2}) \\
 & + (b_k SI_{k-2} + SI_k) + (b_{k-1} SI_{k-2} + SI_{k-1}) + (c_k SI_{k-1} + SI_k)]
 \end{aligned} \tag{9}$$

Interactiefactor a_k geeft de invloed aan van stofgroep SI_k op stofgroep SI_{k-3} ; b_k geeft de invloed aan van stofgroep SI_k op stofgroep SI_{k-2} ; c_k geeft de invloed aan van stofgroep SI_k op stofgroep SI_{k-1} , enzovoort. Een meer uitgewerkte vorm van de lokatie-index voor vier stofgroepen ($k = 4$) wordt in formule 10 gegeven.

$$\begin{aligned}
 LI = \frac{1}{k-1} & [(a_k + a_{k-1} + a_{k-2})SI_{k-3} + (k-3 + b_k + b_{k-1})SI_{k-2} \\
 & + (k-2 + c_k)SI_{k-1} + (k-1)SI_k]
 \end{aligned} \tag{10}$$

Indien de waarde van LI groter is dan 1, dan wordt de risicogrens voor k (geïntegreerde) stofgroepen overschreden. Als de aanname wordt gedaan dat de aparte stofgroepen concentratie-additief werken, dan zijn de interactiefactoren a_k , b_k etc. gelijk aan 1. Volgens de aanpak van van den Berg en Roels (1991) zijn de factoren kleiner dan 1, omdat van partiële additie wordt uitgegaan. Stoffen uit verschillende fysisch-chemische klassen worden geacht een verschillend werkingsmechanisme te hebben (van den Berg & Roels, 1991) en zullen op grond van deze aanname niet concentratie-additief werken. Deze aanname sluit echter nog steeds niet uit dat deze stoffen interactie kunnen vertonen en daarmee synergistisch (a_k , b_k zijn dan groter dan 1) respons-additief (a_k , b_k liggen tussen 0 en 1) of antagonistisch (a_k , b_k zijn dan negatief) kunnen werken. Onderzoek aan combinaties van stoffen uit verschillende chemische klassen kan een wetenschappelijke invulling geven aan de grootte van interactiefactoren.

6.4 Complexiteit van het bodemecosysteem

In het bodemecosysteem speelt de bodem als blootstellingsmatrix een belangrijke rol als intermediair tussen toxicant en organisme. Deze matrix-invloed op de biobeschikbare fractie is in geen compartiment zo belangrijk als in de bodem, omdat deze een zeer groot sorptievermogen bezit voor allerhande stoffen. Het uiteindelijke sorptievermogen wordt bepaald door een scala aan parameters (pH, zoutsterkte, CEC, vochtgehalte, redoxpotentiaal etc.). Dit maakt de bodem tot een zeer complex medium om het gedrag van stoffen in te voorspellen. Dit is een algemeen probleem dat ook voor de bestudering van mengsels consequenties heeft. In dit onderzoek is getracht een aanzet te geven tot de kwantificering van de rol van de bodem bij de bestudering van effecten van metaalmengsels (zie voorgaande hoofdstukken). De belangrijkste conclusie die in dit verband uit het onderzoek volgt is dat de toxiciteit van een mengsel afhankelijkheid is van de wijze waarop concentraties uitgedrukt worden. Dit hangt onder meer samen met het verschuiven van de mengselverhoudingen als gevolg van milieu-chemische interacties.

Om tot een betere benadering te komen van de werkelijke interactie van metalen voor wormachtigen en huid-blootgestelde bodemorganismen in het algemeen, is de totaalconcentratie

van metalen niet de meest optimale manier om bodemconcentraties uit te drukken. De wateruitschudbare concentratie of concentraties bepaald met een zachte extractant zoals CaCl_2 of NaNO_3 (Häni & Gupta, 1985; Boekhold, 1992) lijken beter geschikt voor de benadering van metaalconcentraties waaraan deze dieren werkelijk blootgesteld zijn. Voor organismen die via het voer aan toxicanten zijn blootgesteld, zoals bijvoorbeeld springstaarten via algen en schimmels, en duizendpoten via prooidieren, zullen de effecten waarschijnlijk beter correleren met metaalconcentraties in het voedsel.

Uiteindelijk moeten deze verschillende soorten concentraties teruggerekend worden naar een norm met één concentratie. De huidige normen voor zware metalen gaan uit van totale bodemconcentraties. Volgens Boekhold (1992) en Chardon (1984) geeft het totaalgehalte metaal weliswaar een indicatie over de vervuilingsgraad van een bodem, maar niet over de te verwachten (biologische) effecten, daar deze immers afhankelijk zijn van de (bio)beschikbare metaalfractie. De auteurs doen de aanbeveling om bij normstelling van metalen voor de bodem, rekening te houden met bodemvariabelen die de beschikbaarheid beïnvloeden. Door van Wensem *et al.* (1994) is een voorstel gedaan om bodemnormen uit te drukken in lichaamsconcentraties van bodemvertebraten. Het gaat hier om een recente ontwikkeling waarvan nog niet te overzien is of deze methode werkelijk goed toepasbaar is. Voor metalen zijn deze normen moeilijk te bepalen door de verschillen in regulatiemechanismen, toleranties etcetera die er tussen organismen bestaan.

Met behulp van gegevens over de toxiciteit van mengsels uit de aquatische (en eventueel humane) toxicologie kan getracht worden een inschatting te maken van de interactiefactoren tussen verschillende stofgroepen zoals die gedefinieerd zijn in de lokatie-index. Het geschikt maken van de aquatisch-toxicologische gegevens voor het bodemecosysteem zal dan hoofdzakelijk neerkomen op het verrekenen van de invloed van de bodem als blootstellingmatrix. De aanname hierbij is dat stoffen een vergelijkbare interactie vertonen in aquatische en terrestrische verwante organismen (het toxico-dynamisch en toxico-kinetische niveau).

6.5 Aandachtspunten

Vóórdat de lokatie-index operationeel zou kunnen worden, is onderzoek nodig naar de te hanteren stofgroepen en de grootte van de interactiefactoren. Daar het onderzoeken van alle mogelijke mengsels niet doenlijk is, wordt aanbevolen reeds bestaande toxiciteitsgegevens van individuele stoffen te gebruiken om de te hanteren stofgroepen goed te definiëren naar toxische werking (in plaats van naar fysisch-chemische eigenschappen) en bestaande gegevens over de toxiciteit van mengsels te gebruiken voor het inschatten van de grootte van de interactiefactoren.

Een aspect dat zelden aan de orde komt is potentiëring, de versterking van het toxisch effect van een stof door een niet of nauwelijks toxische stof. Voor deze niet of nauwelijks toxische stoffen zijn geen normen opgesteld om de eenvoudige reden dat ze geen gevaar opleveren voor het ecosysteem *als ze als pure verontreiniging voorkomen*. Al eerder is opgemerkt dat verontreinigingen over het algemeen bestaan uit mengsels van stoffen, waardoor niet toxische stoffen de mogelijkheid hebben een potentiërende werking uit te oefenen op wel duidelijk toxische stoffen. Zo heeft bijvoorbeeld de aanwezigheid van chloride-ionen een negatieve invloed op de vastlegging van cadmium in de bodem door complexvorming, waardoor cadmium in een meer mobiele vorm aanwezig is (Chardon, 1984). Dit heeft in ieder geval gevolgen voor de uitspoeling van cadmium in bodems en mogelijk ook voor de toxiciteit.

Uiteraard kunnen niet en wel duidelijk toxische stoffen ook antagonistisch interacteren. De combinatiewerking van niet en wel duidelijk toxische stoffen is (nog) minder onderzocht dan de combinatiewerking van toxische stoffen onderling en wordt hier slechts genoemd enerzijds voor de volledigheid en anderzijds als punt van aandacht bij het opstellen van normen voor stofmengsels.

REFERENTIES

- Aldenberg, T. & W. Slob, 1993. Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotox. Environ. Safety* 25: 48-63.
- Anderson, P.D. & L.J. Weber, 1975. The toxicity to aquatic populations of mixtures containing certain heavy metals. *Proc. Int. Conf. Heavy Metals*. 2: 933-953.
- Aoki, Y. & K.T. Suzuki, 1984. Excretion of cadmium and change in the relative ratio of iso-cadmium-binding proteins during metamorphosis of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*). *Comp. Biochem. Physiol.* 78C: 315-317.
- Ashford, J.R., 1981. General models for the joint action of mixtures of drugs. *Biometrics* 37: 457-474.
- Back, H., 1990. Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia* 85: 226-232.
- Berg, R. van den, & J.M. Roels, 1991. Beoordeling van risico's voor mens en milieu bij blootstelling aan bodemverontreiniging. Integratie van deelaspecten. *RIVM-rapport nr.* 725201007.
- Besten, P.J. den, 1991. Effects of cadmium and PCBs on reproduction of the sea star *Asterias rubens*. *Proefschrift*, Universiteit Utrecht.
- Beyer, W.N., Chaney, R.L. & B.M. Mulhern, 1982. Heavy metal concentrations in earthworms from soil amended with sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 11: 381-385.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26: 585-615.
- Bodar, C.W.M., 1989. Physiological responses of *Daphnia magna* to cadmium exposure. *Proefschrift*, Universiteit Utrecht.
- Boekhold, A.E., 1992. Field scale behaviour of cadmium in soil. *Proefschrift*, Landbouwniversiteit Wageningen.
- Bryan, G.W. & W.J. Langston, 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76: 89-131.
- Calamari, D. & J.S. Alabaster, 1980. An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. *Chemosphere* 9: 533-538.
- Capelleveen, H.E. van, 1987. Ecotoxicity of heavy metals for terrestrial isopods. *Proefschrift*, Vrije Universiteit Amsterdam.

- Chardon, W.J., 1984. Mobiliteit van cadmium in de bodem. *Bodembeschermingsreeks, deel 36*, Staatsuitgeverij, 's-Gravenhage.
- Crommentuijn, G.H., van de Plassche, E.J. & J.H. Canton, 1994. Guidance document on the derivation of ecotoxicological criteria for serious soil contamination in view of the intervention value for soil clean-up. *RIVM-rapport* nr. 950011003.
- De March, B.G.E., 1987. Simple similar action and independent joint action - two similar models for the joint effects of toxicants applied as mixtures. *Aquat. Toxicol.* 9: 291-304.
- Deneer, J.W., 1988. The toxicity of aquatic pollutants: QSARs and mixture toxicity studies. *Proefschrift*, Universiteit Utrecht.
- Denneman, C.A.J., & C.A.M. van Gestel, 1990. Bodemverontreiniging en bodemecosystemen: voorstel voor C-(toetsings)waarden op basis van ecotoxicologische risico's. *RIVM-rapport* nr. 725201001.
- Denneman, C.A.J., & C.A.M. van Gestel, 1991. Afleiding van C-waarden voor bodemecosystemen op basis van aquatisch ecotoxicologische gegevens. *RIVM-rapport* nr. 725201008.
- Diamant, B.Z., 1979. Environmental health impact of heavy metals in wastewater sludge applied to cropland. International conference "Heavy metals in the environment", London.
- Dirven-van Breemen, E.M., Baerselman, R. & J. Notenboom, 1994. Onderzoek naar de geschiktheid van de potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *E. crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in bodemecotoxicologisch onderzoek. *RIVM-rapport* nr. 719102025.
- Edwards, C.A., 1992. Testing the effects of chemicals on earthworms: the advantages and limitations of field tests. In: *Ecotoxicology of earthworms* (P.W. Greig-Smith *et al.* eds.) Intercept, Andover.
- Edwards, C.A. & J.R. Lofty, 1977. *Biology of earthworms*. 2nd ed. Chapman and Hall, London.
- Enserink, E.L., J.L. Maas-Diepenveen & C.J. van Leeuwen, 1991. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. *Wat. Res.* 25 (6): 679-687.
- Ewijk, P.H. van, & J.A. Hoekstra, 1993. Calculation of the EC50 and its confidence interval when subtoxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Saf.* 25: 25-32.
- Gessner, P.K., 1988. A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *J. Am. Coll. Toxicol.* 7 (7): 987-1012.
- Gestel, C.A.M. van, 1991. Earthworms in ecotoxicology. *Proefschrift*, Universiteit Utrecht.
- Gestel, C.A.M. van, Dirven-van Breemen, E.M. & R. Baerselman, 1993. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction

- in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Tot. Environ.* supplement 1993 part I: 585-597.
- Gestel, C.A.M. van, Dis, W.A. van, Breemen, E.M. van, & P.M. Sparenburg, 1989. Development of a standardized reproduction test with the earthworm species *Eisenia andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. *Ecotox. Environ. Safety* 18: 305-312.
- Gestel, C.A.M. van, & P. Hensbergen, 1994. Combined toxicity of cadmium and zinc for *Folsomia Candida* Willem (Collembola) in an artificial soil substrate. *Poster SPBO-symposium*, 6 & 7 december 1994, Lunteren.
- Handbook of chemistry and physics. 55th edition 1974-1975, CRC-press, Cleveland, Ohio.
- Häni, H. & S. Gupta, 1985. Chemical methods for the biological characterization of metal in sludge and soil. *Proc. 4th Int. Symp.* Processing and use of organic sludge and liquid agricultural wastes, Rome, Italië, 8-11 oktober 1985.
- Hemelraad, J., 1988. Accumulation and effects of cadmium in freshwater clams (*Unionidae*). *Proefschrift*, Universiteit Utrecht.
- Hensbergen, P.J. & C.A.M. van Gestel, 1995. Combinatie-toxiciteit in het terrestrische milieu. *TCB-rapport R04(1995)*.
- Hewlett, P.S., 1969. Measurement of the potencies of drug mixtures. *Biometrics* 9: 477-487.
- Hewlett, P.S. & R.L. Plackett, 1959. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics* 12: 591-610.
- Hewlett, P.S. & R.L. Plackett, 1979. An introduction to the interpretation of quantal responses in biology. Edward Arnold, Londen, 82 pp.
- Hoeven, N. van der, & L. Henzen, 1994. Combinatietoxicologie van de metalen zink en cadmium en de plantensoort *Trifolium pratense* op relatief schone grond uit Budel. *TNO-rapport nr. MW-R 94/130*.
- Hopkin, S.P., 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Pollution Monitoring Series*, Elsevier Applied Science, London.
- Ikeda, M., 1994. Complex exposures: potentials for assessing integrated exposures. *Clin. Chem.* 40 (7): 1444-1447.
- Könemann, H., 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19: 229-238.
- Kraak, M.H.S., Schoon, H., Peeters, W.H.M. & N.M. van Straalen, 1993. Chronic ecotoxicity of mixtures of Cu, Zn, and Cd to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotox.*

Environ. Saf. 25: 315-327.

- Kraak, M.H.S., Lavy, D., Schoon, H., Toussaint, M., Peeters, W.H.M. & N.M. van Straalen, 1994. Ecotoxicity of mixtures of metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 109-114.
- Medici, J.C. & M.W. Taylor, 1967. Interrelationships among copper, zinc and cadmium in the diet of the confused flour beetle. *J. Nutr.* 93: 307-309.
- Mogo, F.C., 1993. Combination toxicity of heavy metals for earthworms (*Eisenia andrei*). *M. Sc. Thesis*, E.E. 101, IHE Delft.
- Nieboer, E. & D.H.S. Richardson, 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and biochemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1B: 3-26.
- Noppert, F., van der Hoeven, N. & A. Leopold, 1994. How to measure no effect. Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. *Workshop report*, Den Haag, 9 september 1994, Nederlandse Werkgroep Statistiek en Ecotoxicologie.
- Notenboom, J. & L. Posthuma (red.), 1994. Validatie toxiciteitsgegevens en risicogrenzen bodem: voortgangsrapportage 1993. *RIVM-rapport nr. 719102029*, *TNO-rapport nr. MW-R94/101*.
- OECD, 1984. Earthworm acute toxicity test. *OECD-guideline for testing of chemicals*, No. 207, 4 april 1984.
- Oostenbrink, M., 1960. Estimating nematode populations by some elected methods. In: J.N. Sasser & W.R. Jenkins, *Nematology*. pp. 85-102.
- Plackett, R.L. & P.S. Hewlett, 1952. Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Royal Stat. Soc. Ser. B* 14 (2): 141-163.
- Posthuma, L., Boonman, H. & R. Baerselman, 1994. Effecten van zware metalen op de worm *Eisenia andrei* in OECD-kunstgrond en Budelgrond. In: Validatie toxiciteitsgegevens en risicogrenzen bodem: voortgangsrapportage 1993. (Notenboom, J. & L. Posthuma (red.)).
- Rietra, R. & W.-C. Ma, 1994. Cd accumulation by *L. rubellus* as a function of Ca in soil solution. *Poster SPBO-symposium*, 6 & 7 december 1994, Lunteren.
- Römkens, P., Knoop, J. & W. Salomons, 1993. Trace metals in the environment. Modelling of long-term processes affecting mobility and bio-availability. Report on a workshop. *RIVM-rapport nr. 711311001*.
- SOP ECO/007/02 Kweek van de regenwormsoorten *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei*.
- SOP ECO/009/03 pH (KCl) - bepaling in grond.

SOP ECO/010/02 Vochtgehalte bepaling in grond.

SOP ECO/033/01 Titratiecurve van OECD-medium met CaCO₃-oplossing.

SOP ECO/036/01 Methode voor het bepalen van de vruchtbaarheid van cocons welke geproduceerd zijn in toxiciteitsexperimenten met regenwormen.

SOP ECO/086/00 Methode voor het bepalen van het effect van chemische stoffen op de reproductie van regenwormen.

SOP ECO/090/00 Methode voor het bepalen van het aantal cocons geproduceerd tijdens reproductie experimenten met regenwormen.

SOP ECO/119/00 Analysevoorschrift voor de bepaling van het gehalte aan zink in water m.b.v. atomaire absorptiespectrometrie (vlamtechniek).

SOP ECO/120/00 Analysevoorschrift voor de bepaling van het gehalte aan koper in water m.b.v. atomaire absorptiespectrometrie (vlamtechniek).

SOP ECO/122/00 Analysevoorschrift voor de bepaling van het gehalte aan cadmium in water m.b.v. atomaire absorptiespectrometrie (vlamtechniek).

SOP ECO/237/00 Voorschrift voor de ontsluiting van vaste stof m.b.v. een microgolfoven voor de bepaling van elementen met atomaire absorptiespectrometrie.

SOP ECO/261/00 Gebruikershandleiding voor Virtis Consol 24 vriesdroogapparaat.

SOP ECO/273/00 Methode voor het bepalen van het effect van chemische verbindingen op de reproductie van *Enchytraeus crypticus*.

SOP ECO/277/00 Gebruikershandleiding voor B. Braun Mikrodismembrator U.

SOP ECO/281/00 Het kweken van *Enchytraeus crypticus*.

SOP LAC-A116. Gebruiksaanwijzing voor het destrueren met behulp van een Berghof drukvat DAB II.

SOP LAC-M113. Destructie van MVS-filters en calibratiefilters voor Röntgen-fluorescentiespectrometrie met behulp van salpeterzuur en een Berghof drukvat DAB II.

Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. 2. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* 4: 3-32.

Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis - the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Tot. Environ.* 22: 213-234.

Straalen, N.M. van, 1993. Open problems in the derivation of soil quality criteria from

- ecotoxicity experiments. In: F. Arendt, G.J. Annokkée, R. Bosman & W.J. van den Brink (eds.), *Contaminated Soil '93*, 315-326. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Straalen, N.M. van & C.A.J. Denneman, 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotox. Environ. Safety* 18: 241-251.
- Straalen, N.M. van & J.A.C. Verkleij (red.), 1991. *Leerboek Oecotoxicologie*. VU uitgeverij, Amsterdam.
- Technische Commissie Bodembescherming, 1992. Advies Herziening Leidraad bodembescherming I. C-toetsingswaarden en urgentiebeoordeling. *TCB-rapport A01* (1992).
- Technische Commissie Bodembescherming, 1994. Advies project Integrale Normstelling Stoffen deel b. *TCB-rapport A09* (1994).
- Tranvik, L., 1992. To sustain in a stressed environment: a study of soil Collembola. *Proefschrift*, Universiteit van Lund, Zweden.
- Unkelbach, H.D. & T. Wolf, 1985. Dose-response analysis of combination preparations. *Stat. Med.* 4: 77-85.
- VROM, 1989. Notitie "Omgaan met risico's; de risicobenadering in het milieubeleid". Tweede Kamer, vergaderjaar 1988-1989, 21 137, nr. 5.
- Webb, M. (ed.), 1979. *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Webber, J., 1972. Effects of toxic metals in sewage on crops. *Water Pollut. Control* 71: 404-413.
- Weltje, L., 1993. Combinatietoxiciteit van zware metalen bij de regenworm *Eisenia andrei*. *Doctoraal-stage verslag*, RIVM.
- Wensem, J. van, Vegter, J.J. & N.M. van Straalen, 1994. Soil quality criteria derived from critical body concentrations of metals in soil invertebrates. *Applied Soil Ecology* 1: 185-191.
- Wit, J.C.M. de, 1992. Proton and metal ion binding to humic substances. *Proefschrift*, Landbouw Universiteit, Wageningen.
- Wijk, R.J. van, Postma, J.F. & H. van Houwelingen, 1994. Joint toxicity of ethyleneamines to algae, daphnids and fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 167-171.
- Zorge, J.A. van, Wijnen, J.H. van, Theelen, R.M.C., Olie, K. & M. van den Berg, 1989. Assessment of the toxicity of mixtures of halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans by use of toxicity equivalency factors (TEF). *Chemosphere* 19: 1881-1895.

Exp/param	ghalte	C	b	M	r ²
1 Ea/coc	totaal	4.85	-0.87	-0.18	0.90
"	CaCl ₂	4.79	-0.70	-1.26	0.88
"	HNO ₃	4.79	-0.85	-0.12	0.89
1 Ea/juv	totaal	14.1	-0.91	-0.79	0.93
"	CaCl ₂	13.8	-0.74	-2.02	0.91
"	HNO ₃	13.8	-0.90	-0.74	0.92
2 Ea/coc	totaal	3.61	-5.91	1.78	0.89
"	CaCl ₂	3.61	-5.09	0.72	0.89
"	HNO ₃	3.61	-60.1	2.27	0.89
2 Ea/juv	totaal	9.82	-3.00	1.68	0.80
"	CaCl ₂	9.82	-2.53	0.61	0.80
"	HNO ₃	9.67	-43.8	2.27	0.80
3 Ea/coc	nominaal	3.11	-3.70	3.83	0.94
"	HNO ₃	3.12	-3.58	3.75	0.94
4 Ea/coc	nominaal	3.12	-0.73	3.23	0.87
"	CaCl ₂	3.14	-0.72	1.52	0.87
5 Ea/coc	nominaal	4.51	-2.50	1.02	0.93
6 Ea/coc	totaal	3.25	-2.19	0.53	0.88
"	CaCl ₂	3.24	-1.62	0.30	0.85
"	HNO ₃	3.23	-2.07	0.51	0.86
6 Ea/juv	totaal	7.87	-2.05	0.80	0.70
"	CaCl ₂	7.99	-1.43	0.59	0.69
"	HNO ₃	7.89	-1.85	0.79	0.69
7 Ea/coc	totaal	2.72	-1.29	0.59	0.78
8 Ea/coc	totaal	2.90	-3.90	0.73	0.71
9bEa/coc	totaal	3.52	-0.31	1.88	0.44
"	CaCl ₂	3.04	-0.37	1.41	0.45
9b Ea/juv	totaal	5.47	-0.40	0.21	0.48
"	CaCl ₂	4.56	-0.46	-0.27	0.49

De parameterwaarden voor C, f, M, b en r² uit formule 7 voor experiment 8 Ea zijn respectievelijk 2.12, 2.89, 1.15, 1.89 en 0.75.

Exp. code	gehalte	C	b	M	r ²
10 Ec	totaal	25.28	-2.86	-0.11	0.75
"	CaCl ₂	25.21	-3.29	-0.34	0.76
11 Ec	totaal	101.0	-8.52	1.43	0.81
"	CaCl ₂	100.8	-5.43	-1.15	0.81
12 Ec	nominaal	40.55	-13.08	4.55	0.77
"	HNO ₃	40.55	-17.29	4.53	0.77
13 Ec	nominaal	33.66	-19.37	3.95	0.80
"	CaCl ₂	33.66	-8.89	2.59	0.80
14a Ec	totaal	19.69	-1.46	-0.39	0.77
"	CaCl ₂	19.48	-1.79	-0.61	0.79
14b Ec	totaal	22.46	-2.77	1.05	0.72
"	CaCl ₂	21.79	-2.78	0.73	0.70
14c Ec	totaal	15.26	-2.38	0.34	0.76
"	CaCl ₂	15.43	-2.56	0.27	0.80

CdNO ₃ experiment met <i>Eisenia andrei</i>																													
Cd (mg/kg droge grond)		Cd (mg/kg vochtige grond)						vochtgehalte 55 %																					
nominaal	actueel	HNO ₃ extraheerbaar			CaCl ₂ extraheerbaar			replica A			replica B			replica C			replica D												
		1.11	1.34	2.35	2.97	9.58	10.79	20.33	22.23	22.06	5.14	5.75	21.59	21.50	24.79	74.07	69.71	77.15	adulte wormen t=3	aantal cocons t=3	aantal juvenielen t=8	adulte wormen t=3	aantal cocons t=3	aantal juvenielen t=8	adulte wormen t=3	aantal cocons t=3	aantal juvenielen t=8		
0	3.5	0.81	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	41	n.b.	10	10	43	n.b.	10	10	53	127	10	10	10	10	47	117	10	10	10	47	117
3	2.0	1.09	0.14	0.14	0.11	0.11	0.11	0.11	49	133	10	10	47	149	10	10	50	128	10	10	10	10	45	132	10	10	10	45	132
10	4.7	2.99	0.49	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	37	103	10	10	35	74	10	10	38	104	10	10	10	10	33	99	10	10	10	33	99
32	16.5	10.79	10.90	10.90	2.00	2.08	2.08	2.08	36	98	10	10	30	81	10	10	35	84	10	10	10	10	34	69	10	10	10	34	69
100	34.5	22.23	22.06	22.06	5.14	5.75	5.75	5.75	27	58	10	10	34	59	10	10	25	54	10	10	10	10	28	62	10	10	10	28	62
320	80.0	57.99	61.29	61.29	21.59	21.51	21.51	21.51	9	16	9	9	7	8	9	9	10	17	10	10	10	10	13	25	10	10	10	13	25
	105.0	72.57	69.28	69.28	21.50	24.79	24.79	24.79	9	16	9	9	7	8	9	9	10	17	10	10	10	10	13	25	10	10	10	13	25
	321.8	178.34	183.08	183.08	74.07	77.15	77.15	77.15	9	16	9	9	7	8	9	9	10	17	10	10	10	10	13	25	10	10	10	13	25
	282.4	217.31	213.10	213.10	69.71	77.15	77.15	77.15																					

De juvenielen van replica A en B van de controle zijn abusievelijk niet bepaald

Het experiment is gebalanceerd met nitraat

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

ZnNO ₃ experiment met <i>Eisenia andrei</i>		vochtgehalte 55 %														
Zn (mg/kg droge grond)		Zn (mg/kg vochtige grond)				replica A			replica B			replica C			replica D	
nominaal	actueel	HNO ₃ extraheerbaar	CaCl ₂ extraheerbaar	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	
0	13	0.88	0.06	10	37	89	10	43	142	10	29	70	10	25	70	
	7	0.38	0.13	10	39	85	10	35	110	10	38	118	10	35	88	
10	32	1.49	3.66	10	39	85	10	35	110	10	38	118	10	35	88	
	32	16.16	4.94	10	38	99	10	33	89	10	41	97	10	43	139	
32	44	20.83	5.18	10	38	99	10	33	89	10	41	97	10	43	139	
	38	20.00	6.08	10	31	77	10	36	92	10	40	99	10	35	83	
100	140	67.74	22.04	10	31	77	10	36	92	10	40	99	10	35	83	
	125	216.38	25.16	10	31	79	10	26	56	10	27	44	10	13	31	
320	340	199.74	77.02	10	31	79	10	26	56	10	27	44	10	13	31	
	350	597.55	75.12	8	0	0	9	0	0	9	0	0	8	0	0	
1000	950	572.85	228.94	8	0	0	9	0	0	9	0	0	8	0	0	
	950	464.52	270.90	8	0	0	9	0	0	9	0	0	8	0	0	
Het experiment is nitraat-gebalanceerd																

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

NaCl-exp. met <i>Eisenia andrei</i>				vochtgehalte 55 %			
Cl (mg/kg droge grond)	Cl (mg/kg vochtige grond)	replica A		replica B		opmerkingen	
		adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3		
nominaal	HNO ₃ extraherbaar						
0.00	25	25	10	36	10	32	voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt
44.31	48	47	10	32	10	34	
139.67	104	106	10	32	10	25	
442.06	288	277	9	28	8	21	
1398.15	844	829	7	14	10	20	
4421.32	2630	2597	7	0	3	0	

exp. code 4 Ea

NaNO ₃ -exp. met <i>Eisenia andrei</i>		vochtgehalte 55 %				
NO ₃ (mg/kg droge grond)	NO ₃ (mg/kg vochtige grond)	replica A		replica B		opmerkingen
		adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	
	CaCl ₂ extraheerbaar					
0.00	0.7	10	32	10	30	voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt
77.51	10.4	9	25	10	29	
244.32	28.9	9	22	10	22	
773.26	92.0	10	18	9	22	
2445.67	286.2	7	11	10	9	
	331.2					controlemeting
7733.89	913.1	0	0	0	0	concentratie uitgesloten bij berekening concentratie-effect curves wegens oudersterfte

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper
op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CuCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>										vochtgehalte 55 %			
Cu (mg/kg droge grond)	replica A		replica B		replica C		replica D		opmerkingen	controle in 4-voud			
	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3					
0	10	48	10	43	10	44	10	44					
10	10	41	10	47									
32	10	42	10	51									
100	10	39	10	33									
320	10	14	10	3									
1000	1	0	0	0									
Experiment is niet gebalanceerd voor chloride													
Experiment uitgevoerd door P.M. Sparenburg en beschreven in van Gestel <i>et al.</i> , 1989													
voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt													
concentratie uitgesloten van berekeningen wegens oudersterfte													

exp.code 6 Ea

CdNO ₃ + ZnNO ₃ experiment met <i>Eisenia andrei</i>										vochtgehalte 55 %																													
Cd (mg/kg droge grond)					Cd (mg/kg vochtige grond)					Zn (mg/kg droge grond)					Zn (mg/kg vochtige grond)																								
nominaal		actueel		HNO ₃ extraheerbaar		CaCl ₂ extraheerbaar		normaal		actueel		HNO ₃ extraheerbaar		CaCl ₂ extraheerbaar																									
0.00	<0.5	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	0.00	7	0.51	0.56	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06																								
21.00	19.0	13.44	14.11	14.11	2.54	2.52	66.14	60	60	42.37	45.35	6.85	6.85	6.78	6.78																								
37.34	36.0	25.25	25.09	25.09	3.74	4.53	117.61	100	100	66.68	66.68	9.95	9.95	11.99	11.99																								
66.40	60.0	45.97	44.92	44.92	8.99	8.80	209.15	170	170	121.14	121.61	24.39	24.39	24.54	24.54																								
118.08	102.9	88.30	91.14	91.14	21.03	22.23	371.93	294	294	225.03	226.57	53.03	53.03	54.97	54.97																								
209.98	225.0	178.86	177.96	177.96	48.94	48.24	661.39	700	700	403.59	393.80	126.18	126.18	124.48	124.48																								
replica A										replica B										replica C										replica D									
adulte wormen t = 3	10	aantal cocoons t = 3	36	aantal juvenielen t = 8	111	adulte wormen t = 3	10	aantal cocoons t = 3	31	aantal juvenielen t = 8	59	adulte wormen t = 3	10	aantal cocoons t = 3	39	aantal juvenielen t = 8	98	adulte wormen t = 3	10	aantal cocoons t = 3	26	aantal juvenielen t = 8	59																
	10		35		95		10		33		31		10		24		58		10		33		96																
	10		33		76		10		33		68		10		23		62		10		28		69																
	10		28		79		10		17		27		10		21		42		10		20		40																
	10		17		34		10		17		39		10		19		32		10		16		34																
	10		0		0		10		3		3		10		0		0		10		3		5																
Het experiment is nitraat-gebalanceerd																																							

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CdCl ₂ + CuCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>												
Cd (mg/kg droge grond)		Cd (mg/kg vochtige grond)		Cu (mg/kg droge grond)		Cu (mg/kg vochtige grond)		vochtgehalte 55 %				
nominaal	actueel	HNO ₃ extraheerbaar	HNO ₃ extraheerbaar	nominaal	actueel	HNO ₃ extraheerbaar	HNO ₃ extraheerbaar	replica A	replica B			
								adulte wormen t=3	aantal cocons t=3	adulte wormen t=3	aantal cocons t=3	opmerkingen
0.00	<0.05	<0.05	<0.05	0.00	8.70	0.61	0.54	10	34	10	31	"echte" blanco niet meegenomen in berekening concentratie-effect curve
	<0.05	0.13	<0.05		8.87	0.65	0.51					controlemeting
0.00	<0.05	<0.05	<0.05	0.00	9.42	0.54	0.58	10	24	10	34	chloride-blanco
1.64	0.99	1.05	1.02	3.02	11.92	2.16	2.10	10	23	10	24	
2.92	1.95	1.77	1.78	5.37	14.16	3.45	3.47	10	23	10	28	
5.20	3.87	2.98	2.94	9.55	16.46	5.47	5.68	10	26	10	31	
9.24	8.37	5.83	5.75	16.98	21.65	9.82	11.50	10	27	10	28	
16.44	15.45	11.33	10.30	30.20	33.40	18.88	18.02	10	26	10	19	
29.23	26.68	17.20	17.06	53.70	51.88	32.48	30.26	10	20	10	23	
	24.70				59.30							controlemeting
51.98	47.81	27.85	29.06	95.50	90.64	64.36	65.70	10	21	10	17	
	49.80				99.60							controlemeting
69.32	103.75	31.93	32.01	127.35	138.34	63.86	64.02	10	12	10	12	
	88.90				177.90							controlemeting
92.44	82.68	50.96	50.57	169.83	136.19	85.99	85.34	10	17	10	14	
	97.30				155.60							controlemeting
123.26	103.75	78.76	69.80	226.47	172.92	122.87	123.70	10	8	10	15	
	103.80				177.90							controlemeting
Met name in de 2-na-laatste concentratie zijn vrij grote verschillen in actuele Cd en Cu concentraties												
Experiment is chloride-gebalanceerd												

exp.code 8 Ea

CuCl ₂ + ZnCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>											
Cu (mg/kg droge grond)		Cu (mg/kg vochtige grond)		Zn (mg/kg droge grond)		Zn (mg/kg vochtige grond)		vochtigheids 55 %			
nominaal	actueel	HNO ₃ extraheerbaar	nominaal	actueel	actueel	HNO ₃ extraheerbaar	actuele wormen t=3	aantal cocoons t=3	actuele wormen t=3	aantal cocoons t=3	opmerkingen
0.00	13.92	0.59	0.59	7.95	0.72	0.89	10	32	9	37	'echte' blanco niet meegegenomen in berekening concentratie-effect curve chloride-blanco
0.00	10.81	0.65	0.65	6.68	0.68	0.62	10	26	10	22	
3.02	12.40	2.20	2.18	11.31	4.27	4.56	10	24	10	30	
5.37	15.84	3.46	3.58	16.83	7.25	7.16	10	33	10	26	
9.55	20.51	5.79	5.94	21.48	12.48	12.47	10	29	10	28	
16.98	27.83	11.49	10.48	44.92	22.35	22.94	10	28	10	38	
	24.90	11.56	11.42	43.82	22.48	22.21					controlemeting
30.20	37.62	20.51	18.82	65.35	38.46	39.63	10	30	10	35	
53.70	59.29	32.82	36.32	117.59	63.00	62.17	9	28	10	29	
95.50	88.89	58.88	60.17	173.91	111.84	113.03	10	23	10	26	
127.35	144.93	71.61	72.37	251.21	149.74	148.03	10	24	10	27	
169.83	151.37	92.59	90.91	332.03	188.49	188.31	9	13	10	22	
226.47	235.53	121.71	121.23	451.42	263.16	262.12	10	7	10	12	

Het experiment is chloride-gebalanceerd

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CdCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>																
Cd		replica A				replica B				vochtgehalte 55 %				interne concentraties		
nominaal (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	adulte wormen t = 3	aantal cocoons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocoons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocoons t = 3	aantal juvenielen t = 8	Cd (mg/kg droge worm)	Zn (mg/kg droge worm)	opmerkingen			
0.00	0.06	10	32	59	10	29	47	5.54	6.88	125	140	"echte" blanco niet meegenomen in berekening concentratie-effect curve chloridablanca				
0.00	0.07	10	22	43	10	15	19	8.14	6.69	136	122					
5.43	0.61	10	21	19	10	22	23	73.18	85.69	134	160					
9.65	1.15	10	24	31	9	13	8	92.43	93.56	153	133					
17.16	2.04	10	27	48	10	21	20	128.11	129.89	147	141					
30.52	3.53	10	20	23	10	16	16	165.29	166.55	133	135					
40.70	4.90	10	14	22	9	27	40	202.19	176.02	139	165					
54.27	7.71	10	18	26	10	26	23	229.08	267.43	132	141					
96.51	15.07	10	17	12	10	14	16	360.67	360.54	138	130					
128.70	21.98	10	23	19	10	12	17	412.99	364.56	134	130					
Het experiment is gebalanceerd met chloride																
De cadmium-stock was 0.107 M (en had 0.1 M moeten zijn)																
Als actuele concentraties worden nominale concentraties gebruikt, gecorrigeerd voor stockaanmaakfouten																
voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt																

ZnCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>										vochtgehalte 55 %							
Zn		replica A				replica B				interne concentraties							
nominaal (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocons t = 3	aantal juvenielen t = 8	Cd (mg/kg droge worm)	Zn (mg/kg droge worm)					opmerkingen			
0.00	0.06	10	32	48	10	34	61	6.430	7.313	155	150			"echte" blanco niet meegenomen in berekening			
0.00	0.07	10	25	40	10	26	25	9.097	8.448	135	149			chlorideblanco			
34.62	6.10	10	17	17	10	26	41	7.402	7.566	149	151						
61.57	8.91	10	23	33	10	15	18	7.563	8.379	156	152						
109.49	16.14	10	24	35	10	22	20	6.619	7.246	157	156						
194.71	30.66	9	27	35	10	24	28	5.346	4.839	163	182						
259.65	45.27	9	10	9	10	22	17	4.212	4.590	170	216						
346.25	62.06	10	25	25	10	18	25	4.980	4.710	227	194						
461.73	82.24	10	17	18	10	15	20	6.076	5.057	234	220						
615.72	120.78	10	15	12	10	11	8	5.412	5.439	269	296						
Het experiment is gebalanceerd met chloride																	
De zink-stock was 0.099 M (en had 0.1 M moeten zijn)																	
Als actuele concentraties worden nominale concentraties gebruikt, gecorrigeerd voor stockaanmaakfouten																	
Voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt																	

CdCl ₂ + ZnCl ₂ experiment met <i>Eisenia andrei</i>										vochtgehalte 55 %						
Cd				Zn			replica A			replica B			interne concentraties			
nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	adulte wormen t = 3	aantal cocoons t = 3	aantal juvenielen t = 8	adulte wormen t = 3	aantal cocoons t = 3	aantal juvenielen t = 8	Cd (mg/kg droge worm)	Zn (mg/kg droge worm)	opmerkingen		
0.00	-	0.06	0.00	-	0.06	10	21	35	10	28	53	7.11	6.17	132	141	"echte" blanco niet meegenomen in berekening concentratie-effect curve chloridablanca
0.00	-	0.07	0.00	-	0.07	10	21	18	10	23	29	8.62	8.52	133	137	
1.53	1.76	0.10	9.74	17.06	0.88	10	24	31	10	19	11	45.02	46.46	143	141	
2.71	-	0.25	17.31	-	1.71	10	15	17	10	27	26	65.68	67.75	145	145	
4.83	-	0.56	30.79	-	3.74	10	22	33	10	17	18	80.96	91.64	137	137	
8.58	8.71	1.22	54.75	70.08	7.04	10	21	24	10	18	29	103.20	98.06	148	160	
15.26	-	2.24	97.35	-	13.08	10	20	18	10	22	31	132.31	129.22	170	162	
27.14	-	4.18	173.12	-	27.38	10	16	13	10	17	14	190.18	151.02	167	175	
36.19	31.88	5.49	230.86	220.44	36.18	10	14	8	10	24	31	178.93	187.61	168	193	
48.26	60.55	77.44	307.86	358.56	49.04	9	19	15	10	15	19	220.21	195.31	218	214	
64.35	70.01	112.80	410.54	386.00	73.48	10	7	6	10	8	7	259.42	211.92	242	227	
Het experiment is gebalanceerd met chloride																
De zink-stock was 0.099 M (en had 0.1 M moeten zijn)																
De cadmium-stock was 0.107 M (en had 0.1 M moeten zijn)																
Als actuele concentraties worden nominale concentraties gebruikt, gecorrigeerd voor stockaanmaakfouten (behalve voor conc. 3, 6, 9, 10 & 11)																
Voor conc. 3, 6, 9, 10 & 11 is de totale concentratie bepaald om te controleren of de extraheerbaarheid van Cd in de 2 hoogste concentraties een artefact is																

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CdCl ₂ -exp. met <i>Enchytraeus crypticus</i>													vochtigheids 35 %	
Cd (mg/kg droge grond)		Cd (mg/kg vochtige grond)		replica A		replica B		replica C		replica D				
nominaal	actueel	CaCl ₂ extraheerbaar	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	opmerkingen	
0	<0.12	<0.12	1519	16	1552	15	1704	15	1632	15	1632	15	*echte* blanco niet meegenomen in berekening concentratie-effect curve chlorideblanco	
0	<0.12	<0.12	1224	13	1752	15	1624	15	1648	15	1648	14		
2	1.59	1.03	1672	15	1640	15	1232	15	1320	15	1320	14		
10	8.18	5.11	1808	16	1528	15	1336	15	1680	15	1680	16		
20	17.87	10.23	1304	15	1032	14	1344	15	1336	15	1336	14		
30	43.39	24.97	1680	16	1360	16	1184	15	1712	15	1712	15		
50	46.36	26.01	1624	15	1672	16	1552	15	1336	15	1336	15		
80	64.74	44.02	1372	15	346	15	1428	15	1018	15	1018	14		
125	119.05	66.36	810	15	632	15	0	15	904	15	904	15		
200	191.15	112.8	54	14	353	14	52	16	382	16	382	13		
Elke replica is gestart op t = 0 met 15 adulten														
Bepaling van het aantal adulten op t = 4 gebeurt a.d.h.v. de grootte van de individuen														
Het experiment is chloride-gebalanceerd														
Toegepaste methode: direct tellen														

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

Zn (mg/kg droge grond)		ZnCl ₂ -exp. met <i>Enchytraeus crypticus</i>				vochtgehalte 35 %	
nominaal	actueel	Zn (mg/kg vochtige grond)		replica A	replica B	replica C	replica D
		CaCl ₂ extraheerbaar		aantal juvenielen t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal juvenielen t = 4
0	6.00	0.03	0.03	505	681	404	324
0	6.00	0.03	0.03	516	620	424	405
20	21.70	<0.03	0.19	350	355	317	390
29	33.60	0.35	0.49	421	466	440	229
43	43.60	0.19	0.31	322	385	635	473
63	78.70	1.50	1.20	295	347	461	322
93	126.30	2.16	2.15	375	449	386	298
136	156.90	2.81	2.79	481	523	210	389
200	210.40	10.20	10.87	303	392	192	472
355	367.10	25.57	25.67	5	22	17	22
632	553.30	77.09	64.40	5	3	5	1
760	751.20	93.54	90.20	9	6	1	10
Zink-recovery (bepaald met BRS-monsters) bedroegen 117 en 97 %							
Op t = 0 is in iedere testcontainer gestart met 15 adulten							
Met de gehanteerde opspoelmethode zijn adulten niet te onderscheiden op t = 4							
Het experiment is chloride-gebalanceerd							
Toegepaste methode: Oostenbrink							
opmerkingen							
echte blanco niet meegenomen in berekening concentratie-effect curve							
chloridebalanco							

exp. code 12 Ec

NaCl-exp. met <i>Enchytraeus crypticus</i>				vochtgehalte 55 %	
Cl		replica A	replica B		
nominaal (mg/kg droge grond)	HNO ₃ ext. (mg/kg vochtige grond)	aantal juvenielen t = 4	aantal juvenielen t = 4	opmerkingen	
0.00	25	135	132	voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt	
44.31	48	150	210		
139.67	104	130	163		
442.06	288	240	128		
1398.15	844	172	162		
4421.32	2630	6	3	schimmel in beide replicas	
Voor dit experiment is dezelfde grond gebruikt als in 3 Ea					
Elke replica is gestart op t = 0 met 10 adulten					
Met de gebruikte opspoelmethode zijn adulten niet te onderscheiden					
Toegepaste methode: Oostenbrink					

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

NaNO ₃ -exp. met <i>Enchytraeus crypticus</i>				vochtgehalte 55 %	
NO ₃		replica A	replica B		
nominaal (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext (mg/kg vochtige grond)	aantal juvenielen t = 4	aantal juvenielen t = 4	opmerkingen	
0.00	0.7	0.7	104	101	voor de fit op nominale gehalten is een blancoconcentratie van 0.05 mmol/kg gebruikt
77.51	10.0	10.4	138	156	
244.32	28.9	29.7	151	146	
773.26	92.0	94.3	161	120	
2445.67	298.2	286.8	176	92	
	331.2	300.9			controlemeting
7733.89	913.1	943.2	2	0	
Voor dit experiment is dezelfde grond gebruikt als in 4 Ea					
Elke replica is gestart op t = 0 met 10 adulten					
Met de gebruikte opspoelmethode zijn adulten niet te onderscheiden					
Toegepaste methode: Oostenbrink					

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CdCl ₂ experiment met <i>Enchytraeus crypticus</i>										vochtigheids 35 %								
Cd										replica A		replica B		replica C		replica D		opmerkingen
nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal aduften t = 4	aantal juvenielen t = 4				
0.00	0.61	0.05	15	1168	14	1184	16	1320	16	1080	16	1080	16	1144	chlorideblanco			
30.33	26.94	16.12	16	1000	15	816	16	944	15	1144	16	888	16	888				
41.86	33.40	21.43	15	824	14	1176	16	1144	16	872	16	872	16	864				
57.76	46.83	30.70	17	584	15	792	17	920	15	864	16	864	16	312				
79.71	60.20	32.82	16	888	17	560	15	840	16	568	15	568	15	544				
110.00	83.74	46.35	21	480	16	360	16	568	14	784	14	784	14	320				
134.20	122.49	56.80	15	320	18	608	14	784	15	576	15	576	15	344				
163.72	153.85	73.95	19	192	25	496	15	576	24	304	18	344						
199.73	182.38	96.01	17	56	19	248												
Het experiment is gebalanceerd met chloride																		
Iedere replica is gestart met 15 aduften op t = 0																		
Met de gebruikte methode worden aduften puur op grootte van juvenielen onderscheiden																		
Toegepaste methode: direct tellen																		

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

ZnCl ₂ experiment met <i>Enchytraeus crypticus</i>														
		Zn				replica A				replica B		vochtgehalte 35 %		
nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	replica C	replica D	opmerkingen	
0.00	14.00	0.64	15	1392	17	1664	16	1456	14	1176			chlorideblanco	
71.92	75.25	35.56	14	928	18	1664	15	1400	20	1496				
79.83	82.31	40.16	15	1008	15	1128	15	1432	14	1096				
97.39	100.20	51.13	18	1400	15	1616	11	1168	19	1272				
108.11	117.53	51.68	17	1160	16	1384	18	1240	0	0			replica D uitgesloten van berekening wegens oudersterfte	
120.00	139.68	62.82	15	1184	16	768	16	1000	16	1200				
175.20	163.02	92.13	22	848	13	632	17	1120	18	1120				
255.79	260.61	130.73	19	488	16	736	23	408	18	608				
373.46	414.00	192.36	17	52	23	11	23	22	18	26				
Het experiment is gebalanceerd met chloride														
Iedere replica is gestart met 15 adulten op t = 0														
Met de gebruikte methode worden adulten puur op grootte van juvenielen onderscheiden														
Toegepaste methode: direct tellen														

Toxische effecten van combinaties van cadmium, zink en koper op terrestrische oligochaeten in relatie tot bodem-chemische interacties

CdCl ₂ + ZnCl ₂ experiment met <i>Enchytraeus crypticus</i>												vochtigheids 35 %								
Cd						Zn						replica A		replica B		replica C		replica D		
nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	nominaal (mg/kg droge grond)	actueel (mg/kg droge grond)	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	CaCl ₂ ext. (mg/kg vochtige grond)	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	aantal adulten t = 4	aantal juvenielen t = 4	opmerkingen	
0.00	0.20	<0.06	0.00	8.37	0.79	16	1512	21	1320	0.66	16	1208	16	1608	19	1608	19	1608	"echte" blanco uitgestoten van berekening	
0.00	0.61	0.05	0.00	14.00	0.64	19	1136	16	984	0.62	19	1136	17	1040	19	1040	19	1040	concentratie-effect curve chloridablanca	
24.83	19.23	12.89	54.17	51.62	27.17	17	1080	16	1216	26.31	17	800	19	1152	17	1152	17	1152	concentratie uitgestoten van berekening wegens niet toevoegen van Cd	
30.29	0.39	0.40	66.08	156.56	78.84	16	1240	16	856	82.53	16	1016	22	1008	16	1008	16	1008		
36.95	32.06	20.19	80.62	80.36	39.90	20	792	23	896	45.84	20	557	19	392	13	392	13	392		
45.08	41.65	22.95	98.96	114.69	47.22	14	520	16	432	49.72	14	888	18	728	17	728	17	728		
55.00	49.80	30.65	120.00	130.43	62.74	16	432	18	1096	66.34	16	392	19	400	15	400	15	400		
75.90	72.78	27.86	165.60	183.47	83.24	15	376	15	496	84.32	15	536	22	624	15	624	15	624		
104.74	86.91	47.23	228.53	224.95	120.06	17	88	17	115	117.99	17	191	14	135	16	135	16	135		
144.54	120.20	69.48	315.37	304.95	166.37	14	6	20	10	161.84	14	13	20	21	16	21	16	21	replica C uitgestoten van berekening wegens oudersterfte	
199.47	168.73	98.54	435.21	432.27	227.74	15	0	19	0	218.43	15	0	4	0	19	0	19	0		
Het experiment is gebalanceerd met chloride																				
Iedere replica is gestart met 15 adulten op t = 0																				
Met de gebruikte methode worden adulten puur op grootte van juvenielen onderscheiden																				
Toegepaste methode: direct tellen																				