

RIVM rapport 607601 006

**Vaststellen van veldeffecten van milieu-
stressoren - het belang van een indicator voor
pollution-induced community tolerance (PICT)**

A.M. Breure, M. Rutgers

december 1999

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling, in het kader van project 607601, Functionele Biodiversiteit, mijlpaal 10/99 SVS40.

Abstract

The phenomenon of Pollution Induced Community Tolerance (PICT) is explained in this report. How the PICT concept can be used to develop an indicator for field-effects of environmental stressors is indicated. The report provides a summary of *in situ* observed relations between the presence of PICT and the structure and functioning of ecosystems. A PICT-indicator is under construction at the RIVM. The advantages and disadvantages of this indicator are discussed, as well as the remaining questions that have to be answered to make it more widely applicable.

PICT is the phenomenon that exposure by a toxic compound results in the adaptation of a natural community of organisms. It is caused by physiological or genetical adaptation of species and/or by mortality of sensitive species, and by the appearance of less sensitive species. With traditional ecological observations (e.g. species and numbers) the relation between an observation of an ecological change and the presence of a toxicant often does not become clear. With PICT there is a causal relationship between an ecological observation and the presence of a toxic compound. This reduces the chance of false negative (there is an adverse effect, but it is not detected) and false positive (there is no adverse effect but an ecological change has been observed) results. The causality between the observed change and the potential stressor is an important advantage of a PICT based indicator.

PICT has been detected in several groups of species, such as bacteria, nematodes, algae, fungi and insects, and is probably a general, but poorly recognised phenomenon. When PICT is observed, functional shifts and shifts in species composition of communities have been detected simultaneously, sometimes accompanied by a decrease of functions and species. In several studies it has been shown that heavy metal adapted bacteria are less efficient in the degradation of aromatic compounds. Furthermore, there is a well documented study that shows the disappearance of a specific strain of a symbiotic nitrogen fixing bacterium (*Rhizobium*) after adaptation of the microbial community to heavy metals, resulting in the phenomenon that white clover (*Trifolium*), can no longer be grown in that area.

An indicator based on PICT in microbial communities can be used to determine, whether a specific pollutant has an effect on an ecosystem. Subsequently other techniques can be used to determine the nature of the ecological changes.

The indicator, which is under development at the RIVM, is a very promising, policy-relevant tool to detect field effect of environmental stressors. It can be used to validate risk assessments and as an instrument for assessment of site specific risks due to the presence of toxic compounds. At the moment, ecological effects of a limited number of heavy metals can be detected. Application of the indicator is limited by the composition of the standard test system (commercially available) at the moment. Further development is therefore necessary to make the indicator applicable for a higher number of stressors (e.g. organic compounds, other metals, acidification) and more types of ecosystems (acidified, aquatic).

Voorwoord

In dit rapport wordt uitgelegd wat PICT (pollution-induced community tolerance) betekent en hoe een PICT benadering in het ecologische effectenonderzoek inzicht kan geven in het causale verband tussen de aanwezigheid van een toxische stof en een ecologisch veldeffect. Daarnaast wordt aangegeven wat de relatie is tussen het optreden van PICT en de structurele en functionele biodiversiteit in ecosystemen. Tenslotte wordt de beleidsrelevantie van een dergelijke indicator aangegeven.

De volgende personen hebben bijgedragen aan de totstandkoming van dit rapport: prof. W. Admiraal (Universiteit van Amsterdam), dr. D. Groenendijk (Vlinderstichting), prof. N. van Straalen (Vrije Universiteit Amsterdam), dr. P. van Beelen (RIVM) en dr. L. Posthuma (RIVM). Wij zijn hen hiervoor zeer erkentelijk.

Inhoud

Samenvatting	5
1. Inleiding	7
2. Wat is PICT	8
3. Wat betekent PICT	9
4. Hoe bepaal je PICT	10
5. Waarom wordt PICT bepaald	11
6. Waarvoor is een PICT benadering toepasbaar	12
7. De PICT methode van het RIVM	14
8. Waar is de PICT benadering wel en niet bruikbaar	16
9. In welke typen organismen is PICT aangetoond	17
9.1 <i>PICT in bacteriën</i>	17
9.2 <i>PICT in algen</i>	17
9.3 <i>PICT in schimmels</i>	18
9.4 <i>PICT in nematoden</i>	18
9.5 <i>PICT in andere organismen</i>	18
10. Waarom PICT bepalen in microbiële gemeenschappen	19
11. De relatie tussen PICT en het functioneren van ecosystemen	20
12. De relatie tussen PICT en de diversiteit van microbiële gemeenschappen	21
13. Relatie tussen PICT en de diversiteit van eukaryote organismen	23
14. Wetenschappelijke conclusies over PICT	24
15. Onderzoeksvragen met betrekking tot PICT	26
16. Beleidsrelevantie van de PICT indicator	27
Literatuur	28
Bijlage 1. Verzendlijst	31

Samenvatting

In dit rapport wordt uitgelegd wat Pollution Induced Community Tolerance (PICT) inhoudt en hoe dit concept kan worden gebruikt om een indicator voor veldeffecten van milieustressoren te ontwikkelen. Tevens wordt de beleidsrelevantie van een dergelijke indicator aangegeven. Dit rapport geeft een samenvatting van *in situ* waargenomen relaties tussen het optreden van PICT en de structuur en het functioneren van ecosystemen. Tevens worden de voor- en nadelen van de op PICT gebaseerde indicator en wordt ingegaan op de vragen die nog antwoord behoeven om de indicator breder toepasbaar te maken.

PICT is het verschijnsel dat blootstelling aan een giftige stof verandering van de natuurlijke gemeenschap van organismen tot gevolg heeft, die veroorzaakt wordt door fysiologische of genetische aanpassing van soorten en/of door het afsterven van gevoelige soorten en het verschijnen van minder gevoelige soorten.

Bij traditionele ecologische observaties (bijvoorbeeld soorten en aantallen) is het verband tussen de waargenomen verandering en de aanwezigheid van een giftige stof vaak niet duidelijk door natuurlijke variatie en de aanwezigheid van andere potentiële oorzaken. Bij observaties van PICT is er wel een oorzakelijk verband tussen de observatie en de aanwezigheid van een giftige stof. Dit vermindert de kans op vals-negatieve (er is wel een nadelig effect, maar het wordt niet opgemerkt) en vals-positieve (er is geen nadelig effect, maar er is wel een ecologische verandering waargenomen) uitslagen. De goede causaliteit tussen de waargenomen verandering en de potentiële stressfactor is een belangrijk voordeel van een indicator die op PICT gebaseerd is.

PICT is gevonden bij vele soortgroepen, zoals bacteriën, nematoden, algen en insectenlarven en is vrijwel zeker een algemeen (maar weinig onderkend) verschijnsel. Bij het RIVM wordt het PICT concept geoperationaliseerd op basis van microbiële gemeenschappen.

Wanneer PICT optreedt blijken verschuivingen op te treden in de functionaliteit van de gemeenschap die uiteindelijk uitmonden in het verlies van functies en een vermindering van het aantal soorten. Dit laatste is inderdaad in een aantal gevallen aangetoond. In verschillende studies heeft men laten zien dat aan zware metalen geadapteerde bacteriën minder efficiënt aromatische koolwaterstoffen kunnen afbreken. Verder leidt het verlies van gevoelige soorten in tolerante gemeenschappen van organismen tot verlies van functies. Op sommige locaties is de diversiteit van veranderde gemeenschap kleiner als gevolg van verontreiniging dan in schone referentie ecosystemen.

Een indicator die gebaseerd is op PICT bij microbiële gemeenschappen kan gebruikt worden om vast te stellen of een specifieke verontreiniging effect heeft op het ecosysteem. Daarna kan met andere technieken worden nagegaan, welke ecologische veranderingen daar nog meer mee verbonden zijn.

De beleidsrelevantie van de indicator bestaat uit de mogelijkheid hem in te zetten voor validatie van methoden voor risicoschattingen: blijft bij een toegelaten risico het negatieve effect in de veldsituatie binnen de gewenste grenzen?

Een tweede toepassing is inzet als instrument om locatiespecifieke risico's van de aanwezigheid van giftige stoffen in te schatten. Door het causale karakter van de indicator kan een direct verband gelegd worden tussen de aanwezigheid van een verdachte stof en een ecologisch effect.

De onderzoeksvragen die nog bestaan met betrekking tot de bij het RIVM ontwikkelde indicator zijn:

1. Welke relatie bestaat er tussen het voorkomen van PICT in microbiële gemeenschappen en de verandering of afname van functionaliteit, m.a.w. is het verloop van processen waarvoor bacteriën verantwoordelijk zijn voldoende gewaarborgd;
2. Kan de PICT-indicator van het RIVM zodanig worden aangepast, dat hij kan worden toegepast in andere typen ecosystemen;
3. Kan de PICT-indicator van het RIVM worden toegepast bij andere stressoren dan zware metalen (organische stoffen, verzuring (pH, aluminium));
4. Wanneer PICT optreedt in microbiële gemeenschappen, betekent dat dan, dat andere functionele groepen ook effecten ondervinden.

De indicator, zoals die nu ontwikkeld wordt bij het RIVM, werkt voor de meting van ecologische effecten van een beperkt aantal zware metalen. Toepassing van de indicator is momenteel beperkt door de samenstelling van het standaard testsysteem (Biolog multiwell systeem). Verdere ontwikkeling is daarom noodzakelijk om een groter aantal stressoren (bijv. organische stoffen, andere metalen, verzuring) en meer typen ecosystemen (zuur, aquatisch) te kunnen bedienen.

1. Inleiding

Binnen het RIVM wordt een indicator ontwikkeld om stress in ecosystemen als gevolg van persistente verontreinigingen te meten op basis van verhoogde tolerantie van microbiële gemeenschappen (Rutgers et al. 1998b). Het ministerie van VROM heeft vervolgens de vraag gesteld wat deze indicator zou kunnen betekenen voor de ondersteuning van het bio-diversiteitbeleid en welk onderzoek er eventueel nog zou moeten worden uitgevoerd om de indicator beter geschikt te maken.

In dit rapport wordt uitgelegd wat PICT betekent voor het ecologisch-effect-onderzoek en vervolgens zal de vraag van het Ministerie van VROM: "Wat is het beleidsmatig belang van een PICT indicator?" worden beantwoord.

2. Wat is PICT

Pollution-Induced Community Tolerance, kortweg PICT, is het fenomeen dat een gemeenschap van organismen, die wordt blootgesteld aan een toxicant, verandert door tolerantie tegen de toxicant te ontwikkelen (Blanck et al.1988). Bovendien is er een duidelijke relatie tussen de mate van blootstelling en de mate van verandering. De ontwikkeling van gemeenschapstolerantie is gebaseerd op fysiologische of genetische aanpassingen binnen soorten en/of op het verdwijnen van gevoelige soorten en het verschijnen van minder gevoelige soorten.

Bij fysiologische aanpassingen binnen de soort blijft de populatie aanwezig, maar gebruikt zij eigen mechanismen om minder last van de toxicant te hebben of de toxicant onschadelijk te maken. Dit betekent dat de organismen zich na verwijdering van de toxicant weer “normaal” gaan gedragen. Bij genetische aanpassingen blijft de soort ook aanwezig, maar treedt een selectie binnen de soort op en verandert de genetische samenstelling. De soort verandert en dat kan betekenen dat de soort niet automatisch weer herstelt, als de toxicant wordt verwijderd.

Bij het verdwijnen van gevoelige soorten en het verschijnen van minder gevoelige soorten verandert de soortensamenstelling van de gemeenschap. Genetische aanpassing van soorten en soortverschuivingen zijn in principe irreversibele veranderingen. De oorspronkelijke structuur in het ecosysteem kan alleen door remigratie van gevoelige soorten weer hersteld worden.

3. Wat betekent PICT

PICT is het verschijnsel dat de organismen in een ecosysteem die blootgesteld worden aan een giftige stof, deze stof ervaren en erop reageren, hetzij door zich aan te passen, hetzij door af te sterven en plaats te maken voor uitheemse, minder gevoelige organismen. Toxicanten hebben in zo'n geval effect. Bij PICT is een oorzakelijk verband tussen de aanwezigheid van een giftige stof en de verandering van de gemeenschap in het veld. Dit oorzakelijke verband kan niet worden aangetoond met andere ecologische metingen (bijvoorbeeld veranderingen van soortensamenstelling, abundantie, functioneren, etc.) in de aanwezigheid van een stressor, omdat er vele redenen kunnen zijn waardoor het ecosysteem kan zijn aangetast. Het aantonen van PICT levert daarentegen een sterke indicatie van het veldeffect van een specifieke stressor. Bijvoorbeeld: als er een hoge concentratie is van zink het betreffende ecosysteem, en je wilt weten of zink effect heeft, dan betekent een verlaagde gevoeligheid voor zink, dat zink inderdaad een effect uitoefent. Als lood ook in hoge concentraties aanwezig is, maar niet leidt tot een veranderde gevoeligheid, dan heeft lood t.o.v. zink weinig effect op het ecosysteem: zink is in dit geval een groter probleem dan lood.

4. Hoe bepaal je PICT

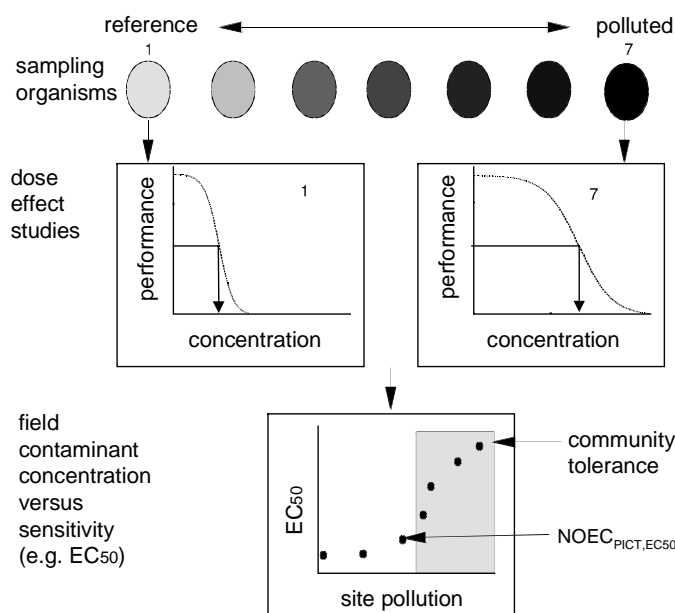
Om PICT te bepalen worden de organismen uit het veld gemonsterd en getoetst in het laboratorium op de gevoeligheid voor de verdachte toxicant. Als eindpunt van de gevoeligheidstest kunnen vele fysiologische kenmerken worden gebruikt zoals activiteit, beweeglijkheid, overleving, voortplanting, etc. De concentratie van de toxicant die de activiteit met 50% remt wordt bepaald. De PICT hypothese is, dat de tolerantie (een hogere EC_{50}) gerelateerd is aan de mate van beïnvloeding door de toxicant als gevolg van de blootstelling in het veld (Figuur 1) (Blanck et al. 1988, Doelman et al. 1994).

Omdat tolerantie wordt uitgedrukt in de toxicant concentratie die t.o.v. de ongeremde controle 50 % respons oplevert (EC_{50}) bij de laboratoriumexperimenten, wordt automatisch gecompenseerd voor verschillen in responsparameters (bijv. activiteiten van organismen) door natuurlijke variatie in de verschillende veldmonsters.

Op deze basis kan een indicator worden ontwikkeld voor de mate waarin organismen in ecosystemen worden blootgesteld en beïnvloed door een toxicant. De uitslag van de indicator zal niet recht evenredig zijn aan de totale toxicant concentratie in het veld, maar aan de mate van beïnvloeding als resultante van de blootstelling en de biobeschikbare fractie, die weer gerelateerd zijn aan fysisch chemische eigenschappen van de toxicant en het ecosysteem (bodem, sediment, water) (Alexander 1995, Peijnenburg et al. 1997, Mulder 1999). Met andere woorden: of een verontreiniging een ecologisch effect veroorzaakt kan wel worden afgelezen aan de mate van PICT, maar niet aan de concentratie waarin de verontreiniging voorkomt in het ecosysteem. De meting van PICT is gevoeliger en nauwkeuriger dan traditionele toxiciteittoetsen, omdat door de opzet van de meting rekening gehouden wordt met verschillen tussen veldmonsters als gevolg van biomassa omvang en activiteit (Lehman et al. 1997, Siciliano en Roy 1999).

5. Waarom wordt PICT bepaald

Ondanks het gebruik van zowel *in vitro* als *in situ* assays is het vaak moeilijk een oorzakelijke relatie vast te stellen tussen de aanwezigheid van een verontreiniging en een waargenomen ecologische verandering (Figuur 2). In de eerste plaats is het effect van een verontreiniging niet afhankelijk van de concentratie maar van de moeilijk vast te stellen biobeschikbare fractie (Peijnenburg et al. 1997, Mulder 1999). Daarnaast zijn vaak ook andere mogelijke oorzaken voor ecosysteemveranderingen aan te wijzen, zoals pH (meestal verzuring), voedingstoestand (eutrofiëring), of de aanwezigheid van andere verstoringen en verontreinigingen. De blootstellingroute is vaak zeer ingewikkeld. Complexe ecologische interacties binnen ecosystemen laten zich moeilijk voorspellen uit de resultaten van toxiciteitsexperimenten in het laboratorium waarbij gewerkt wordt met één soort en één stof per experiment. Bij de bepaling van PICT wordt specifiek het ecologisch effect van één bepaalde verontreiniging nagegaan via een oorzakelijk verband. Overigens is de PICT benadering in principe ook goed bruikbaar om het effect van een mengsel van verontreinigingen aan te tonen. Bij kennis van de oorzaak van een ecologische verandering is het mogelijk om gericht maatregelen te nemen.

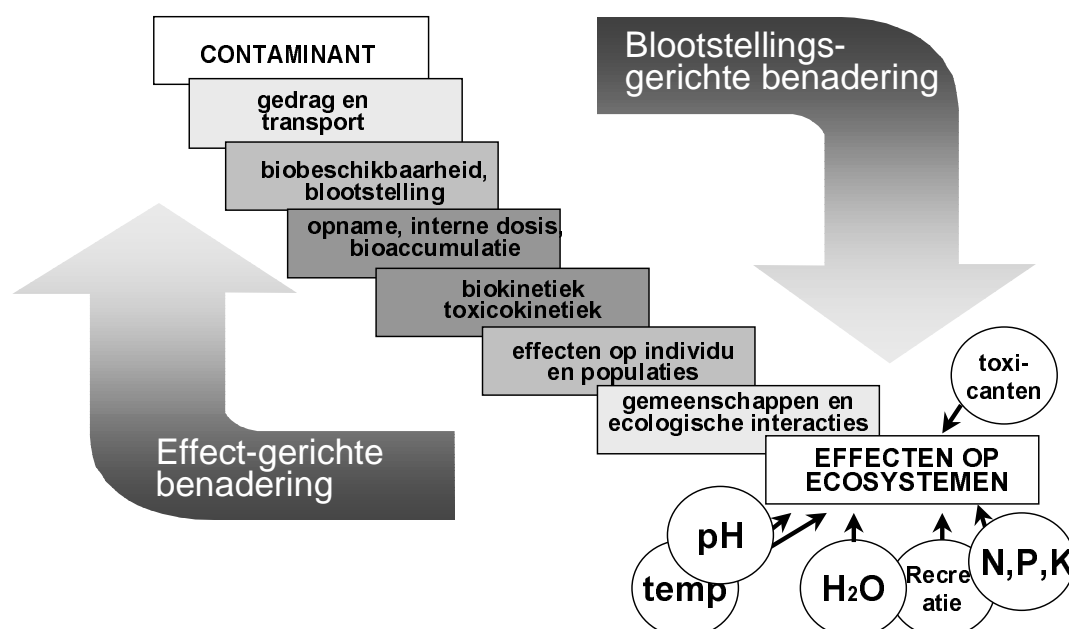


Figuur 1. Schematische voorstelling van een uitgebreid experiment om PICT aan te tonen (naar Posthuma, 1997). Organismen worden gemonsterd uit een gradiënt van verontreiniging. In het laboratorium worden dosis – effect studies gedaan met de verdachte contaminant (twee bovenste grafieken). De concentraties waarbij de activiteit 50% is (effectconcentratie-50 of EC_{50}) worden bepaald en uitgezet tegen de concentratie van de verontreiniging in het veld (onderste grafiek). Een verhoging van de EC_{50} duidt op verlagings van de gevoeligheid en daarmee op PICT.

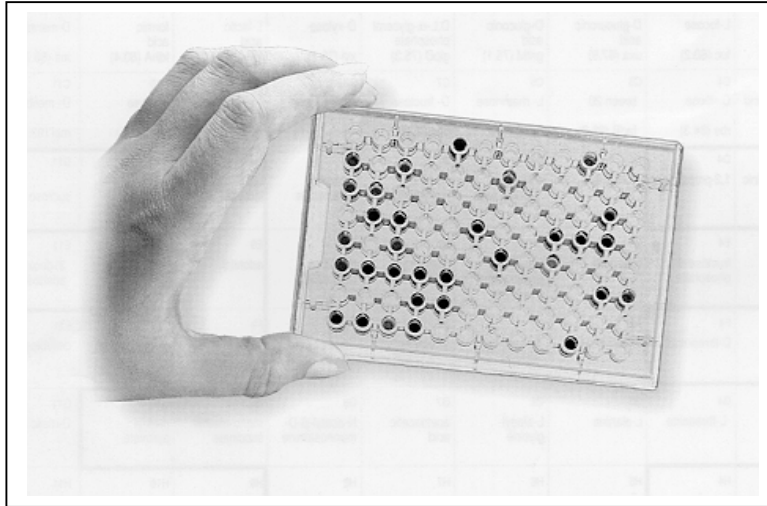
6. Waarvoor is een PICT benadering toepasbaar

De PICT benadering is toepasbaar bij de beantwoording van de vraag, of de aanwezigheid van een bepaalde toxicant effect heeft op de in het ecosysteem aanwezige organismen. Bij de onderbouwing van normstelling, bij locatiespecifieke risicobeoordeling en bij ecologische indicatoren die de gezondheid van het ecosysteem aangeven kan eveneens een PICT benadering gebruikt worden:

1. Bij de onderbouwing van de normstelling kan via veldonderzoek door bepaling van PICT worden nagegaan of er effecten optreden bij de vigerende normen (bijv. Posthuma et al. 1998, Rutgers et al. 1998a,b, Van Beelen et al. 2000).



Figuur 2. De gecompliceerde relatie tussen de aanwezigheid van een verontreiniging in een ecosysteem en het effect. Bij een blootstellingsgerichte benadering wordt bij aanwezigheid van een contaminant (met behulp van modellen) naar een effect geredeneerd. Bij een effect-gerichte benadering wordt bij een waargenomen ecosysteemverandering de oorzaak gezocht. Bij 'traditionele' ecologische observaties (bijvoorbeeld soorten en aantallen) is het verband tussen de waargenomen verandering en de aanwezigheid van verontreiniging vaak niet duidelijk. Bij PICT is er wel een oorzakelijk verband tussen de observatie en de aanwezigheid van verontreiniging, wat de kans op vals-negatieve (er is wel een nadelig effect, maar het wordt niet opgemerkt) en vals positieve (er is geen nadelig effect, maar er is wel een ecologische verandering waargenomen) uitslagen vermindert.



Figuur 3. De activiteitsmeting berust op de bepaling van de kleurverandering van een indicator, die standaard in de Biolog platen aanwezig is. De meting duurt 7 dagen.

2. Bij locatiespecifieke risicobeoordeling van verontreiniging zijn verschillende typen gegevens over de locatie van belang, namelijk milieuchemische gegevens, resultaten van bioassays met veldmonsters en veldwaarnemingen over ecologische effecten die in verband kunnen worden gebracht met de aanwezige verontreiniging. Deze gegevens worden volgens de zogenaamde TRIADE-benadering met elkaar geïntegreerd (Chapman, 1988, De Zwart et al. 1999). Bepaling van PICT kan gebruikt worden om waargenomen ecologische veranderingen in verband te brengen met de verontreiniging.
3. Bepaling van PICT kan een onderdeel zijn van een indicator voor ecologische effecten. Het grote voordeel daarvan is dat er een oorzakelijke verband bestaat tussen de veronderstelde stress en het gemeten veldeffect.

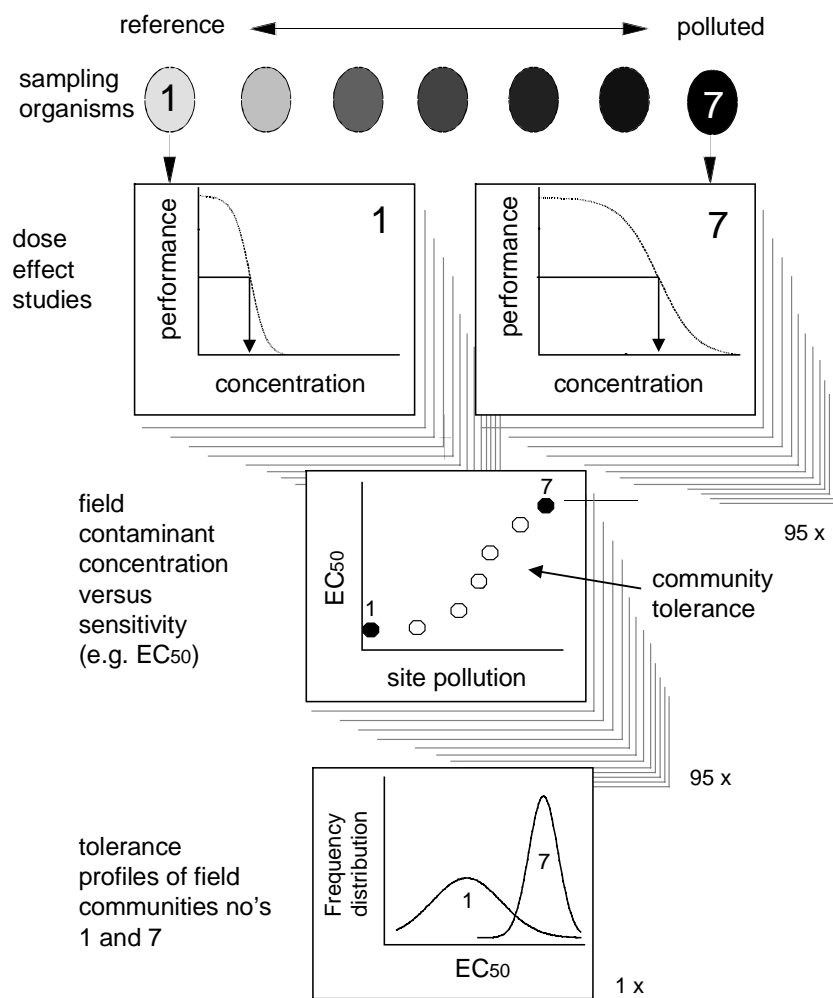
7. De PICT methode van het RIVM

De methode, die ontwikkeld wordt bij het RIVM (Rutgers et al. 1998b), is gebaseerd op de meting PICT in microbiële gemeenschappen. Er zijn verschillende manieren om PICT in dergelijke gemeenschappen te bepalen. Veldmonsters worden genomen op een gradiënt van een verontreiniging. Bacteriën worden geëxtraheerd uit de monsters waarna toenemende hoeveelheden van de verdachte toxicant worden toegevoegd aan verschillende deelmonsters (zie ook Figuur 1). Vervolgens wordt een microbiële parameter gemeten, zoals ^3H -thymidine-inbouw, een maat voor *in situ* groeisnelheid, (Díaz-Raviña et al. 1994), ^{14}C -acetaat mineralisatie, een maat voor metabole activiteit, (Van Beelen en Fleuren-Kemilä 1997), totale bodemademhaling, ook een maat voor metabole activiteit (Giller et al. 1998).

In de RIVM methode wordt de mineralisatie van een set verschillende substraten gemeten (Rutgers et al. 1998b). Hiervoor worden Biolog platen gebruikt waarin tegelijkertijd 95 verschillende microbiële functies bepaald kunnen worden (figuur 3). Bacteriën worden na extractie uit de monsters geënt in een serie Biolog platen waaraan verschillende concentraties van de verdachte verontreiniging toegevoegd zijn. Op deze wijze wordt de gevoeligheid bepaald van 95 bacteriële functies en kan worden nagegaan, in hoeverre de gevoeligheid van een functie of een groep functies is afgenomen bij een toenemende concentratie van een toxicant in het veld. PICT metingen met deze methode zijn tot dusverre alleen uitgevoerd om de effecten van zware metalen vast te stellen (Rutgers et al. 1998a;b, ongepubliceerde data). De effecten van bijv. organische verontreinigingen, kunnen ook worden bepaald. (Siciliano et al. 1999). De resultaten worden uitgedrukt als een verlaging van de gevoeligheid of een verhoging van de effectconcentratie (Figuur 1).

Over het algemeen wordt de aanwezigheid van PICT getoetst aan één eindpunt (bijv. Blanck et al. 1988). De bij het RIVM ontwikkelde methode werkt met 95 eindpunten simultaan en daarmee is de kans op vals negatieve uitslagen (er is geen verandering gemeten, terwijl die er in werkelijkheid wel is) kleiner. Op deze wijze kunnen tolerantieverhogingen voor 95 functies simultaan worden vastgesteld en vervolgens kan per populatie een gevoeligheidsprofiel worden opgesteld (Figuur 4).

De indicator, zoals die nu ontwikkeld wordt bij het RIVM, meet de ecologische effecten van een beperkt aantal zware metalen. Toepassing van de indicator is momenteel beperkt door de samenstelling van het standaard testsysteem. Verdere ontwikkeling is daarom noodzakelijk om een groter aantal stressoren (bijv. organische stoffen, andere metalen, verzuring) en meer typen ecosystemen (zuur, aquatisch) te kunnen bedienen.



Figuur 4. PICT bepaling via de methode zoals bij het RIVM ontwikkeld, waarbij voor 95 functies een gevoeligheidsverandering kan worden vastgesteld en vervolgens per gemeenschap (locatie) een gevoeligheidsprofiel.

8. Waar is de PICT benadering wel en niet bruikbaar

De bepaling van PICT is bruikbaar in alle gevallen waarbij een verdachte stressor aangewezen kan worden. Het PICT concept is ontwikkeld om het effect van verontreiniging met een toxische stof te kwantificeren, maar het principe kan ook gebruikt worden om de effecten van bijvoorbeeld verzuring of vermesting bij levensgemeenschappen in het veld kwantitatief te bepalen. PICT is onbruikbaar in het geval er geen verdachte stressor aanwezig is. In dat geval dienen er andere methoden te worden ingezet, zoals bijvoorbeeld de metingen in de Bodembioologische indicator (Schouten et al. 1997, 1999), veldinventarisaties aan zichtbare soorten (planten en dieren), of aan microbiële gemeenschappen zoals recent door het RIVM werd ontwikkeld (Breure et al. 1997, Rutgers en Breure 1999).

9. In welke typen organismen is PICT aangetoond

9.1 PICT in bacteriën

Bååth et al. (1998a) bepaalden het effect van toepassing van metaalhoudend rioolslib als meststof over een periode van 20 jaar op de micro-organismen in de bodem. Zij vonden een verlaagde gevoeligheid voor de in het rioolslib aanwezige metalen, in vergelijking met schone grond, alsmede een andere soortensamenstelling, gemeten op basis van de fosfolipiden vetzuur (PLFA = phospholipid fatty acid) samenstelling van de micro-organismen.

Ook op metaalgradiënten rond diverse metaalsmelters in Finland en Zweden en in bossen met een van nature verhoogd metaalgehalte in de bodem werden verlaagde gevoeligheden gemeten voor zware metalen alsmede een veranderde soortensamenstelling (Bååth et al. 1998b, Pennanen et al. 1996). De ontwikkeling van de metaaltolerantie wordt toegeschreven aan het afsterven van gevoelige bacteriën, adaptatie en betere competitieve mogelijkheden van de overlevende bacteriën, en de kolonisatie van uitheemse, ongevoelige bacteriën (Díaz-Raviña en Bååth 1996).

Doelman en Haanstra (1979) vonden een duidelijke toename van lood-resistente bacteriën in met lood verontreinigde bodem en Doelman et al. (1994) vonden een sterke verhoging van het aantal resistente organismen in zink en cadmium verontreinigde bodems. Kelly en Tate (1998) vonden hogere aantallen resistente micro-organismen rond zinksmelter locaties. Deze observaties zijn in overeenstemming met de resultaten in bij het RIVM waar verhoogde resistentie aantreffen werd in zink- cadmium- en koperverontreinigde bodems (Rutgers et al. 1998a,b, Rutgers nog niet gepubliceerde gegevens). Admiraal et al. (1999) hebben eveneens verhoogde tolerantie van zink en cadmium in bacteriepopulaties gevonden, gemeten aan ³H-thymidine inbouw, benedenstrooms van een lozingspunt, t.o.v. de situatie bovenstrooms.

9.2 PICT in algen

Blanck et al. (1988) beschreven het PICT concept voor het eerst en illustreerden dat aan het effect van arsenaat op marien periphyton. Zij vonden een afname van de gevoeligheid met een factor 10.000. Zij geven hierbij tevens aan dat co-tolerantie kan optreden, dat wil zeggen, dat ook een verlaagde gevoeligheid voor andere stressoren kan ontstaan, in dit geval voor thiofosfaat.

Molander et al. (1992) en Dahl en Blanck (1996) onderzochten het effect van tri-*n*-butyltin op marien periphyton en vonden een verhoogde tolerantie en een veranderde soortensamenstelling als gevolg van de blootstelling. In de studie van Molander et al. (1992) werden ook effecten gevonden van gelijktijdige aanwezigheid van het pesticide diuron. In deze studie werd naast een verlaagde gevoeligheid voor tri-*n*-butyltin en diuron ook een afname van de soortenrijkdom van de diatomeeën gevonden.

Bérard et al. (1998) onderzochten het effect van atrazineverontreiniging van een aantal Franse meren op de gevoeligheid van het aanwezige fytoplankton en concludeerden, dat het

fytoplankton in het verontreinigde meer veel minder gevoelig was dan in het niet-verontreinigde meer. Daarnaast was ook de soortensamenstelling in de twee meren verschillend. Zij concludeerden dat er aanpassing aan de aanwezige pesticidenverontreiniging optreedt, doch dat de techniek nog verder moet worden ontwikkeld. Op dezelfde plek waar Admiraal et al. (1999) een duidelijke tolerantieverhoging vonden voor zink en cadmium in de bacteriële gemeenschap, vonden zij die niet in de algenpopulatie, gemeten aan de fotosynthetische activiteit via ^{14}C - CO_2 -inbouw. Zij vonden echter wel een soortverschuiving bij verhoogde concentratie van zink en cadmium. (Lehmann et al. 1999). Met andere woorden, de functie fotosynthese was niet minder gevoelig geworden, doch er had zich wel een soortenverschuiving voorgedaan.

9.3 PICT in schimmels

Del Val et al. (1999) onderzochten de effecten van zware metalen op de soortensamenstelling en de gevoeligheid van symbiotische schimmels. Zij concludeerden dat soortverschuivingen optreden in met zware metalen verontreinigde bodems bij metaalconcentraties beneden de maximale richtlijnen van de EU. Verder zagen ze dat de diversiteit aan schimmels bij verhoging van de metalenconcentraties eerst toenam en daarna afnam. Onder alle omstandigheden bleken de gevoeligheden af te nemen bij toenemende metaalconcentraties.

9.4 PICT in nematoden

Millward en Grant (1995, 2000) toonden aan dat de gevoeligheid van nematoden voor koper in het ernstig verontreinigde estuarium Restronguet Creek (zuidwest Engeland) veel lager is dan op een andere, naburige, maar schone locatie. Verder bleek het aantal soorten nematoden ook lager te zijn dan op de schone locatie.

9.5 PICT in andere organismen

In andere organismen kunnen ook aanpassingen aan blootstelling van zware metalen optreden. Zo zijn bijvoorbeeld bij een onderzoek in de Dommel, waar een zinkfabriek loost op de beek, verschuivingen aangetroffen van genotypen binnen de soort (genetische aanpassing) bij de muggenlarve *Chironimus riparius* (een overerfbare cadmiumtolerantie en een verhoogde zinkbehoefte) en de diatomee *Gomphonema parvulum* (zinktolerantie) (Admiraal 1998, Groenendijk et al. 1999).

10. Waarom PICT bepalen in microbiële gemeenschappen

Micro-organismen in ecosystemen zijn in zeer grote aantallen aanwezig (Dykhuisen 1998, Torsvik et al. 1990, 1994) Het overgrote deel van de biomassa en de biodiversiteit op aarde is aanwezig in micro-organismen (Bloem et al. 1994, Karp et al. 1998). Ze zijn zeer gevoelig voor verontreinigingen in bodem (Giller et al. 1998). Dat is niet verwonderlijk, want ze leven in direct contact met de omgeving, in het poriewater of geadsorbeerd aan bodemdeeltjes en ze hebben door hun vorm en kleine omvang een extreem hoge oppervlakte – inhoud ratio. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij vrijwel alle processen zoals de afbraak van organische stof en de nutriëntcycli. Daarom zijn ze onontbeerlijk voor goed functionerende ecosystemen. (Sheppard 1999, Kaputska 1999).

Verder blijken effecten in microbiële ecosystemen al op te treden bij relatief lage concentraties van toxicanten in het veld. Rutgers et al. (1998a,b) vinden effecten van zink beneden de streefwaarden en ook Giller et al. (1998) geven aan, dat ernstige effecten al optreden rond de normconcentraties voor zware metalen van de Europese Unie.

Het zal waarschijnlijk niet mogelijk zijn om voorbeelden te geven waarbij overall effecten op microbiële populaties geen grote effecten zullen hebben op het functioneren van het totale ecosysteem. Er zijn echter nog grote hiaten m.b.t. kennis over de relatie tussen functioneren van bacteriën en functioneren van ecosystemen. Verder reageren microbiële eindpunten sterk op veranderingen in temperatuur, vochtigheid, zuurstofconcentraties en andere omgevingsfactoren, waardoor ze sterk variabel zijn over korte perioden. Dit maakt toepassing ervan bij risicoschattingen complex. Hull et al. (1999) en Efrogmson en Suter (1999) geven aan, dat gezien het belang van micro-organismen voor het functioneren van ecosystemen, microbiële toetsen niet mogen worden uitgesloten bij risicoschattingen van verontreinigingen. Gezien het gebrek aan inzicht in de relaties tussen structuur en functies zal nog aanvullend onderzoek noodzakelijk zijn om te komen tot een uitgebalanceerde set van toe te passen toetsen. Onzes inziens zou toepassing van het PICT concept een oplossing zijn in die gevallen waarbij de variabiliteit in de eindpunten van microbiële toetsen een probleem is, omdat effecten niet worden uitgedrukt in veranderingen in activiteit of samenstelling van de populaties, doch in effectconcentraties.

11. De relatie tussen PICT en het functioneren van ecosystemen

Giller et al. (1998) reviewden de literatuur m.b.t. effecten van zware metalen op het functioneren van microbiële gemeenschappen en concludeerden dat er aanwijzingen zijn dat toxische stress door zware metalen kan leiden tot een verminderde efficiëntie van de groei (organismen hebben meer energie nodig om te overleven en groeien daarom minder hard, hetgeen resulteert in een verlaagde concentratie van bacteriële biomassa). Dit wordt vaak vooraf gegaan door een verandering in soortensamenstelling. Deze verlaagde efficiëntie hoeft niet te leiden tot een verlaagde omzettingcapaciteit. Bååth et al. (1998a) concludeerden uit hun experimenten dat de substraat omzettingcapaciteiten als gemeten m.b.v. Biolog metingen niet veranderen als gevolg van een verhoogde metaaltolerantie. Knight et al. (1997) zagen wel grote veranderingen in de functionele diversiteit van microbiële populaties in bodem a.g.v. blootstelling aan koper, cadmium of zink en zij trokken daaruit de conclusie dat de capaciteit om verschillende substraten om te zetten afneemt door verontreiniging met koper en zink. El Fantroussi et al. (1999) concludeerden dat een verhoogde tolerantie voor pesticiden gepaard gaat met duidelijke veranderingen in de potentiële substraat omzettingcapaciteit (ook gemeten met Biolog-platen). Verder is een goed gedocumenteerde studie van een minder efficiënte stikstof-fixatie in metaalverontreinigde gronden (Giller et al. 1989) door het verdwijnen van een symbiotische stikstof-fixerende *Rhizobium* bacterie in afwezigheid van zijn waardplant. De consequentie hiervan was, dat witte klaver, een groenbemester, niet meer kon worden gekweekt en de functionaliteit van de bodem was afgenomen.

Kelly en Tate (1998) zagen veranderde metabole activiteiten in metaalverontreinigde gronden. Daarnaast zagen ze, dat het oude metabole patroon weer terugkwam na het zuiveren van de grond. Kandeler et al. (1996) onderzochten de invloed van zware metalen op de functionele diversiteit van microbiële gemeenschappen in grond, door enzymactiviteiten te meten. Zij vonden een afname van de activiteiten van heel normale enzymen. Hierbij werden de activiteiten van enzymen in de koolstofcyclus minder geremd dan die in de stikstof-zwavel- en fosfaatcyclus. Doelman et al. (1994) vonden dat een toenemende tolerantie voor zink en cadmium gepaard ging met een afnemende capaciteit om aromatische organische verbindingen af te breken en zij concludeerden dat het zelfreinigend vermogen van de bodem achteruit was gegaan door verontreiniging met zware metalen. Deze observaties worden bevestigd door Wenderoth en Reber (1999) die in isolaten van zink-verontreinigde bodems een lagere capaciteit aantreffen om aromatische koolwaterstoffen af te breken.

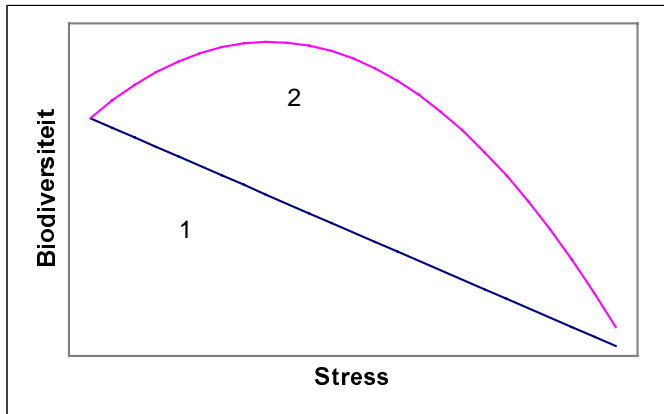
12. De relatie tussen PICT en de diversiteit van microbiële gemeenschappen

Naast de bepaling van gevoeligheidsveranderingen kan ook worden nagegaan in hoeverre de samenstelling van populaties is veranderd. Voor bacteriën is het ondoenlijk om vast te stellen wat de soortensamenstelling is van een natuurlijke gemeenschap, en bovendien is niet duidelijk wat nu precies een soort is. Op basis van een aantal aannames zijn er schattingen van 10.000 – 100.000 soorten per gram grond (Dykhuisen 1998, Torsvik et al. 1990, 1994). Om de diversiteit in de microbiële gemeenschap te bepalen zijn verschillende technieken voorhanden:

1. bepaling van fosfolipidenvetzuur samenstelling in de bodem (PFLA),
2. bepaling van de genetische samenstelling van de bacteriepopulatie (daarvoor zijn vele methoden beschikbaar (zie voor een overzicht Karp et al. 1998),
3. door isolatie en karakterisering van specifieke organismen (bijv. Doelman et al. 1994)
4. door vaststelling van de functionaliteit van de populatie met bijvoorbeeld Biolog-toetsen (Garland en Mills 1991, Breure et al. 1997)
5. enzym-analyses op een andere manier (Kandeler et al. 1996).

Over het algemeen worden verschuivingen in soortensamenstelling en activiteitspatronen gezien bij aanpassing van een populatie. Wenderoth en Reber (1999) gebruiken genetische technieken om de bacteriële populaties van bodems te karakteriseren, en zij vinden een achteruitgang van 39% van het aantal genclusters in zink-verontreinigde bodems, hetgeen suggereert, dat de diversiteit in de populaties afneemt bij toenemende zinkconcentraties in het veld. Voor bacteriën is het moeilijk om aan te geven of de activiteit dan toe- of afneemt maar voor andere soorten kan daar soms iets over gezegd worden.

Del Val et al. (1999) concludeerden, dat de diversiteit van schimmels bij geringe verontreiniging eerst toeneemt en vervolgens afneemt. Dat is in overeenstemming met de hypothese, dat bij een geringe stress competitieve soorten kunnen domineren, wat resulteert in een geringe diversiteit. Bij een verhoging van de stress verliezen deze soorten hun competitieve voordeel en kunnen meer en andere soorten prolifereren, wat leidt tot een toenemende diversiteit. Bij hoge stress neemt dan de diversiteit weer af (Giller et al. 1998), schematisch weergegeven in Figuur 5. Een afname van de diversiteit bij toenemende stress lijkt niet aannemelijk, omdat in stabiele, uniforme ecosystemen met voldoende voedingstoffen en nutriënten het voorkomen van zeer dominante soorten mogelijk in grote dichtheden mogelijk is, gekoppeld aan een lage diversiteit (Austin 1987).



Figuur 5. Twee modellen voor het effect van een stress zoals zware metalen op de diversiteit en het functioneren van microbiële populaties. In model 1 resulteert toename van stress altijd in een afname van biodiversiteit. In model 2 wordt aangenomen dat een stress-vrije (of lage stress) situatie leidt tot dominantie van competitieve soorten en een lage diversiteit. Bij toenemende stress verliezen deze soorten hun competitieve voordeel en kunnen meer soorten overleven. Bij hoge stress-niveaus neemt dan de diversiteit weer af (Giller et al. 1998).

13. Relatie tussen PICT en de diversiteit van eukaryote organismen

Voor nematoden worden verschuivingen verwacht in de soortensamenstelling bij toenemende stress, maar dit heeft niet direct een effect op het functioneren van de nematodenpopulatie (Klepper et al. 1999).

Millward and Grant (1995, 2000) zagen een verhoging van de koperresistentie in de nematodengemeenschap van een verontreinigd estuarium. Het aantal soorten nematoden in het estuarium was lager dan in een nabijgelegen, niet verontreinigd estuarium. Bij deze nematoden lijkt PICT dus samen te vallen met verschuiving van de gemeenschap

Het onderzoek aan dansmuggen (*Chironomus riparius*) in de Dommel toont aan dat deze soort zich genetisch kan aanpassen aan een metaal verontreinigde omgeving (Groenendijk et al. 1999). Deze soort is daardoor in staat om hoge populatiedichtheden op te bouwen en zij domineert de muggengemeenschap op vervuilde locaties. Andere dansmuggen (b.v. Orthocladinen) zijn vrijwel afwezig. De minder vervuilde locaties in de Dommel hebben altijd een relatief groot aandeel Orthocladinen laten zien, terwijl die op de vervuilde locaties nauwelijks voorkomen. Voor hogere trofische niveaus zal deze verschuiving vermoedelijk weinig gevolgen hebben. Voor lagere trofische niveaus worden wel effecten (of gevolgen) verwacht (Van de Bunt 1994). Tussen beide soort(groepen) zijn grote verschillen in ecologie te verwachten (Armitage et al. 1995) die vrijwel zeker verantwoordelijk zullen zijn voor verschillende interacties met andere soorten en een ander voedselregime. Hierdoor wordt het functioneren van microbenthos gemeenschappen in de rivier de Dommel beïnvloed (Groenendijk, niet gepubliceerde resultaten).

14. Wetenschappelijke conclusies over PICT

PICT is een gevoelige indicator voor effecten van verontreinigingen op populaties en gemeenschappen in het veld en biedt de mogelijkheid om waargenomen veranderingen toe te schrijven aan een specifieke verontreiniging.

Over het algemeen zijn aan PICT gekoppelde effecten op de biodiversiteit duidelijk. In de natuurlijke systemen waar PICT is aangetoond treden verschuivingen op in de soortensamenstelling parallel aan de gevoeligheidsveranderingen. Verarming (verlies aan diversiteit) van het systeem wordt aangetroffen of wordt verondersteld bij een verder toenemende stress. Er is één goed gedocumenteerd geval bekend, waarbij een bodemverontreiniging met zware metalen de oorzaak was van verdwijning van een stikstoffixerende *Rhizobium* soort, die de wortels van witte klaver koloniseert. Dit had tot gevolg dat er geen witte klaver kon worden geteeld op die bodem. Dit is een voorbeeld van verlies van één gevoelige soort, die het gewenste functioneren van het bodemsysteem schaadt (de groei van witte klaver). Dit gebeurde overigens bij concentraties van zware metalen rond een Europese signaalwaarde voor verontreinigde bodem. Overigens konden op deze bodem wel andere klaversoorten worden gekweekt, m.a.w. het systeem functioneerde nog, maar in ieder geval één specifieke functie ontbrak.

Bij hogere organismen werden ook aan PICT gerelateerde verarmingen waargenomen, zoals bij nematodengemeenschappen in koper-verontreinigd estuaria (Millward en Grant 1995, 2000) en bij dansmuggen in een zink-verontreinigde rivier (Admiraal 1998, Groenendijk et al. 1998).

Het functioneren van het systeem blijkt over het algemeen door verontreiniging aangetast te worden. De exacte beoordeling in termen van ecologische schade van deze veranderingen is een onderdeel van discussie. Er zijn duidelijke aanwijzingen, dat de bacterie-biomassa in sterk metaal-verontreinigde bodems kleiner is dan in schone grond, maar dat de totale activiteit van de bodem, gemeten als bodemademhaling, niet afneemt. De bacteriën hebben mogelijk moeite met overleven en hebben daardoor meer energie nodig om te groeien of onderhoudsprocessen te laten plaatsvinden. Verder zijn er aanwijzingen dat de capaciteit om aromatische verbindingen af te breken in metaal-tolerante gemeenschappen verlaagd is. Gespecificeerd onderzoek voor de onderbouwing van de koppeling tussen PICT en verlies van biodiversiteit en functioneren is echter nog noodzakelijk.

De PICT benadering is zeer nuttig om aan te geven in welke mate een verontreiniging effect heeft op een ecosysteem. Tevens is de aanwezigheid van PICT een indicatie voor een veranderde samenstelling van de in het ecosysteem voorkomende levensgemeenschappen en zal uiteindelijk verarming optreden.

Er wordt gewerkt aan de koppeling van PICT aan de uitkomsten van risicoschattingen op basis van de milieuchemische aanwezigheid van de verontreiniging uitgedrukt in een maat voor de potentiële toxische druk van een stof (Van Beelen et al. 2000). De conclusie is dat eerst meer experimentele gegevens moeten worden gegenereerd om een dergelijke validatie mogelijk te maken.

Het is duidelijk dat de techniek, zoals die nu wordt toegepast om PICT te meten, verder moet worden ontwikkeld om hem breder toepasbaar te maken. De mogelijkheden daarvoor zijn aanwezig maar afhankelijk van de ruimte die in het meerjaren activiteitenplan van het RIVM dienaangaande geboden zal worden.

15. Onderzoeksvragen met betrekking tot PICT

In veel typen gemeenschappen is PICT aangetoond. Dit type onderzoek wordt echter uitgevoerd door specialisten die zich richten op één type organismen (bacteriën, algen, nematoden, etc.). Het is niet duidelijk of een waarneming van PICT in microbiële gemeenschappen betekent dat ook andere organismen effecten ondervinden van de aanwezigheid van de toxicant. Onderzoek naar PICT in gemeenschappen van organismen op verschillende trofische niveaus in hetzelfde ecosysteem is dus gewenst. Dit onderzoek geeft antwoord op de vraag over de representativiteit van een meting van PICT bij een gemeenschap voor alle (blootgestelde) gemeenschappen in het ecosysteem.

De methode, zoals die nu is ontwikkeld bij het RIVM, is geschikt voor bepaling van het effect van enkele zware metalen in terrestrische ecosystemen, waarbij de neutrale pH van het testsysteem beperkend is voor de gevoeligheid van de meting. Uitbreiding van de toepasbaarheid naar andere typen ecosystemen (aquatische of verzuurde) ecosystemen, andere toxicanten (andere metalen, organische stoffen), mengsels van toxicanten en andere stressoren (bijv. verzuring) is dus gewenst. Dit type onderzoek levert een breder toepasbare indicator op dan nu het geval is.

De indicator dient verder onderbouwd te worden voor wat betreft de relatie tussen PICT en functionaliteit van microbiële gemeenschappen. Daarom verdient het aanbeveling om een verband te leggen tussen PICT, zoals dat wordt gevonden in verontreinigde ecosystemen en de functionaliteit zoals die wordt bepaald in de bodembioologische indicator (Breure et al. 1997, Schouten et al. 1999) in het algemeen en de Biolog indicator voor functionele diversiteit in microbiële systemen in het bijzonder (Rutgers en Breure 1999).

Uitvoering van het hiervoor genoemde onderzoek kan uiteindelijk een breed toepasbare indicator opleveren voor het aantonen van milieudruk (stress) op ecologische receptoren. De indicator is gevalideerd en geijkt in de zin dat een uitslag daadwerkelijk ecologische schade van een vooraf veronderstelde milieudruk aangeeft en is tevens relatief ongevoelig voor niet benoemde milieudruk en heeft een lage ruis.

16. Beleidsrelevantie van de PICT indicator

Meting van het verschijnsel PICT is op dit moment de beste methode om een causaal verband aan te tonen tussen de aanwezigheid van een giftige stof en ecologische effecten in het veld. De bepaling van PICT wordt uitgevoerd op het niveau van levensgemeenschappen, zodat ecologische relevantie gewaarborgd is. Andere methoden, zoals ecologische inventarisaties van soorten en aantallen organismen of metingen aan ecologische processen geven de gesteldheid van het ecosysteem en kunnen slechts via een statistisch verband gekoppeld worden aan een effect als gevolg van de aanwezigheid van een giftige stof.

Om die reden kan de indicator worden toegepast voor validatie van methoden voor risicoschattingen: blijft bij een geschat risico het negatieve effect in de veldsituatie binnen de gewenste grenzen?

Een tweede toepassing is de inzet van de indicator als ecologisch instrument voor de inschatting van locatiespecifieke risico's van de aanwezigheid van giftige stoffen. Met de indicator wordt het causale verband gelegd tussen aanwezigheid van een verdachte stof en ecologische effect en kunnen zo nodig gericht maatregelen worden getroffen om het risico tot een aanvaardbaar niveau terug te brengen.

Bij verdere ontwikkeling van de RIVM indicator komt er een instrument beschikbaar waarmee het effect van de aanwezigheid van een giftige stof of andere milieustressoren in het veld nauwkeurig gemeten kan worden. Op basis hiervan kan dan het verlies aan structurele en functionele biodiversiteit worden afgeleid.

Literatuur

- Admiraal, W. (1998) Bruikbaarheid van het PICT (Pollution induced community tolerance) concept. In: J. Lahr (ed.) Methoden voor de analyse van effecten van toxische stoffen in veldsituaties, verslag van de SAVE-workshop, Bilthoven 10 maart 1998, pp.17-22. SAVE document 1998-1
- Admiraal, W., Blanck, H., Buckert-de Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nyström, B.A.H., Paulsson, M., Sabater, S. (1999) Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33, 1989-1996
- Alexander M. (1995) How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science and Technology* 29, 2713-2717
- Armitage, P., Cranston, P.S., Pinder, L.C.V. (1995) *The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London, UK.
- Austin, M.P. (1987) Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Vegetatio* 69, 35-45
- Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å., Campbell, D.D. (1998a) Effect of metal rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 238-245
- Bååth, E., Frostegård, Å., Díaz-Raviña, M., Tunlid, A. (1998b) Microbial community-based measurements to estimate heavy metal effects in soil: the use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. *Ambio* 27 (1), 58-61
- Bérard, A., Pelte, T., Menthon, E., Druart, J.C., Bourrain, X. (1998) Caractérisation du phytoplancton de deux systèmes limniques vis-à-vis d'un herbicide inhibiteur de la photosynthèse. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance): application et signification. *Annals Limnologiques* 34 (3) 269-282
- Blanck H., Wängberg S.-Å., Molander S. (1988) Pollution-induced community tolerance - A new ecotoxicological tool. In Cairns J Jr, Pratt JR, eds, *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*, ASTM STP 988. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp 219-230.
- Bloem, J., Lebbink, G.M., Zwart, K.B., Bouwman, L.A., Burgers, S.L.G.E., De Vos, J.A., De Ruiter, P.C. (1994) Dynamics of micro-organisms, microbivores, and nitrogen mineralization in winter wheat fields under conventional and integrated management. *Agriculture Ecosystem Environment* 51, 129-143
- Breure, A.M., Wind, B.S., Crum, S.J.H., Rutgers, M. (1997) Naar een indicator voor functionele diversiteit van microbiële gemeenschappen. *RIVM rapport* 607601001
- Chapman, P.M. (1986) Sediment quality criteria from the sediment quality triad: an example. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5, 957-964
- Del Val, C., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. (1999) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 718-723
- De Zwart, D., Rutgers, M., Notenboom, J. (1999) Bepaling van het locatiespecifiek actueel ecologisch risico van bodemverontreiniging: een opzet voor een beoordelingssystematiek, *RIVM rapport* 711701011
- Díaz-Raviña, M., Bååth, E. (1996) Development of metal tolerance of soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2970-2977
- Díaz-Raviña, M., Bååth, E., Frostegård, Å. (1994) Multiple heavy metal resistance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2238-2247
- Doelman, P., Haanstra, L. (1979) Effects of lead on the soil bacterial microflora. *Soil Biology and Biochemistry* 11, 487-491

- Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van Til, M. (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils* 17, 177-184
- Dykhuizen, D.E. (1998) Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 25-33
- Efroymsen, R.A., Suter II, G.W. (1999) Finding a niche for soil microbial toxicity tests on ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 715-727
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M. (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 982-988
- Garland, J.L., Mills, A.L. (1991) Classification of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2351-2359
- Giller, K.E., McGrath, S.P., Hirsch, P.R. (1989) Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 841-848
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: a review *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. (1999) Assessing risks of heavy metal toxicity in agricultural soils: do microbes matter? *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 683-689
- Groenendijk, D., Kraak, M.H.S., Admiraal, W. (1999) Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1225-1231
- Hull, R.N., Klee, U., Bryant, D., Copeland, T. (1999) Soil microbial communities and ecological risk assessment: Risk assessors' perspective. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 707-714
- Kapustka, L.A. (1999) Microbial endpoints: the rationale for their exclusion as ecological assessment endpoints. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 691-696
- Lehman, R.M., Colwell, F.S., Garland, J.L. (1997) Physiological profiling of indigenous aquatic microbial communities to determine toxic effects of metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2232-2241
- Lehmann, V., Tubbing, G.M.J., Admiraal, W. (1999) induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 384-391
- Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O. (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23, 299-306
- Kelly, J.J., Tate III, R.L. (1998) Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *Journal of Environmental Quality* 27, 609-617
- Klepper, O., Traas, T.P., Schouten, A.J., Korthals, G.W., De Zwart, D. (1999) Estimating the effect on soil organisms of exceeding no-observed effect concentrations (NOECs) of persistent toxicants. *Ecotoxicology* 8, 9-21
- Knight, B.P., McGrath, S.P., Chaudri, A.M. (1997) Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 39-43
- Millward, R.N., Grant, A. (1995) Assessing the impact of copper on nematode communities from a chronically metal-enriched estuary using pollution-induced community tolerance. *Marine Pollution Bulletin* 30, 701-706
- Millward, R.N., Grant, A. (2000) Pollution-induced tolerance to copper of nematode communities in the severely contaminated Restronguet Creek and adjacent estuaries, Cornwall, United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* (in press)
- Molander, S., Dahl, B., Blanck, H., Jonsson, J., Sjöström, M. (1992) Combined effects of tri-*n*-butyltin and diuron on marine periphyton communities detected as pollution-induced community tolerance. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 419-427

- Mulder, H. (1999) Relation between mass-transfer and biodegradation of hydrophobic pollutants in soil. Proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E. (1997) A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163-172
- Pennanen, T., Frostegård, Å., Fritze, H., Bååth, E. (1996) Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 420-428
- Posthuma, L. (1997) Effects of toxicants on population and community parameters in field conditions, and their potential use in the validation of risk assessment methods. In: Van Straalen, N.M., Løkke, H. (eds), *Ecological risk assessment of contaminants in soil*, pp. 85-117, Chapman & Hall, London
- Posthuma, L., Van Gestel, C.A.M., Smit, C.E., Bakker, D.J., Vonk, J.W. (1998) Validation of toxicity data and risk limits for soils: final report. *RIVM rapport 607505004*
- Rutgers, M., Breure, A.M. (1999) Risk assessment, microbial communities, and pollution induced community tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 661-670
- Rutgers, M., Sweegers, B.M.C., Wind, B., Van Veen, R.P.M., Folkerts, A.J., Posthuma, L., Breure, A.M. (1998a) Pollution-induced community tolerance in terrestrial microbial communities. In: *Conference proceedings Contaminated Soil 1998 – Vol.1*, pp. 337-343, Thomas Telford, London, U.K.
- Rutgers, M., Verlaat, I. van 't, Wind, B., Posthuma, L., Breure, A.M. (1998b) Rapid method to assess pollution-induced community tolerance in contaminated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 792-797
- Sheppard, S. C. (1999) Soil microbial Bioassays: Quick and relevant but are they useful? *Human and ecological risk assessment* 5, 697-705 *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 697-705
- Schouten, A.J., Breure, A.M., Bloem, J., Didden, W., De Ruiter, P.C., Siepel, H. (1999) Life support functies van de bodem: operationalisering t.b.v. het biodiversiteitsbeleid. *RIVM rapport 607601003*
- Schouten, A.J., Brussaard, L., De Ruiter, P.C., Siepel, H., Van Straalen, N.M. (1997) Een indicatorsysteem voor life support functies in de bodem in relatie tot biodiversiteit. *RIVM rapport 712910005*
- Siciliano, S.D., Roy, R (1999) The role of soil microbial tests in ecological risk assessment: differentiating between exposure and effects. *Human and Ecological Risk Assessment* 5, 671-682
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L. (1990) High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* 56, 782-787
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L., Sørheim, R., Michalsen, J., Salte, K. (1994) Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: *Ritz, K., Dighton, J, Giller, K.E. (eds) Beyond the biomass. Compositional and functional analysis of soil microbial communities.* pp.39-48, John Wiley, Chichester
- Van Beelen, P., Fleuren-Kemilä, A.K. (1997) Influence of pH on the toxic effects of zinc, cadmium, and pentachlorophenol on pure cultures of soil organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 146-153
- Van Beelen, P., Fleuren-Kemilä, A.K., Aldenberg, T. (2000) The relation between extrapolated risk and community effects, expressed as pollution induced community tolerance (PICT). submitted
- Van de Bund, W (1994) Food web relations of littoral macro- and meiobenthos. Proefschrift Universiteit van Amsterdam
- Wenderoth, D.F., Reber, H.H. (1999) Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 345-352

17. Bijlage 1. Verzendlijst

1. Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen. Veiligheid, Straling
2. Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Bodem
3. Plv. D.G. Milieubeheer, Dr.ir. B.C.J. Zoeteman
4. Drs. A.W.M. Eijs, DGM/SVS
5. Dr. D. Jung, DGM/SVS
6. Mw. Dr. G.H. Crommentuijn DGM/Bo
7. Drs D. Jonkers, DGM/DWL
8. Drs. J. Karres, LNV/N
9. Dr. J.M. Roels, DGM/Bo
10. Prof.dr. W. Admiraal, UvA, Amsterdam
11. Dr. J. Bloem, DLO-Alterra, Wageningen
12. Dr. W. de Boer, NIOO, Heteren
13. Prof.dr. L. Brussaard, LUW, Wageningen
14. Dr. P. Doelman, IWACO, Rotterdam
15. Prof.dr. H. Eijsackers, DLO-Alterra, Wageningen
16. Dr. F.P. van den Ende, UvA, Amsterdam
17. Dr. J. Faber DLO-Alterra, Wageningen
18. Dr. C.A.M. van Gestel, VU, Amsterdam
19. Dr. D. Groenendijk, Vlinderstichting, Zeist
20. Dr. J. Kammenga, LUW, Wageningen
21. Prof.dr. N.M. van Straalen, VU Amsterdam
22. Drs. J.J. van der Waarde, Bioclear, Groningen
23. Dr. G. Zwart, NIOO Nieuwersluis
24. Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
25. Directie RIVM, t.a.v. Prof. ir. N.D. van Egmond
26. Dr.ir. G. de Mik, RIVM
27. Drs. H. Canton, RIVM/ECO
28. Ir. R. van den Berg, RIVM/LBG
29. Ir. A.H.M. Bresser, RIVM/LWD
30. Drs. T. Aldenberg, RIVM/LWD
31. R. Baerselman, RIVM/ECO
32. Dr. P. van Beelen, RIVM/ECO
33. Drs.ing. J.J. Bogte, RIVM/ECO
34. Dr. A.M. Breure, RIVM/ECO
35. Drs. Th. Ietswaard, RIVM/LWD
36. Dr.ir. D. van de Meent, RIVM/ECO
37. Dr.ir. J. Notenboom, RIVM/NPB
38. Dr. L. Posthuma, RIVM/ECO
39. Drs. C.J. Roghair, RIVM/ECO

40. Dr. M. Rutgers, RIVM/ECO
41. Drs. A.J. Schouten, RIVM/LBG
42. Dr. E. Smit, RIVM/MGB
43. Dr. A. Sterkenburg, RIVM/ECO
44. Dr. J. Struijs, RIVM/ECO
45. Dr.ir. F.A Swartjes, RIVM/LBG
46. Drs. T.P. Traas, RIVM/ECO
47. Dr.ir. K. Wernars, RIVM/MGB
48. Mw. M. Wouterse, RIVM/ECO
49. Drs. D. de Zwart, RIVM/ECO
50. SBD/Voorlichting & Public Relations
51. Bureau Rapportenregistratie
52. Bibliotheek RIVM
- 53-60. Bureau Rapportenbeheer
- 61-70. Reserve exemplaren