

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIËNE
BILTHOVEN

Rapportnr. 719102025

Onderzoek naar de geschiktheid van de potwormsoorten
Enchytraeus albidus en *E. crypticus* (Oligochaeta,
Annelida) in bodemecotoxicologisch onderzoek.

E.M. Dirven-van Breemen, R. Baerselman en
J. Notenboom.

april 1994

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van DGM Directies Bodem (Bo) en
Stoffen, Veiligheid en Straling (SVS).

VERZENDLIJST

1 t/m 3	Directoraat-Generaal voor Milieubeheer, Directie Bodem
4 t/m 5	Directoraat-Generaal voor Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling
6	Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, Dr. Ir. B.C.J. Zoeteman
7	Dr. J.M. Roels (DGM/Bo)
8	Drs. C.A.J. Denneman (DGM/Bo)
9	Ir. J.G. Robberse (DGM/Bo)
10	Dr. C.J. van Leeuwen (DGM/SVS)
11	Ir. P.T.J. van 't Zandt (DGM/SVS)
12	Dr. J. de Bruijn (DGM/SVS)
13	Dr.Ir. C.A.M. van Gestel (VU)
14	Dr. Ir. W. Didden (LUW)
15	Depôt nederlandse publikaties en nederlandse bibliografie
16	Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
17	Dr. Ir. G. de Mik
18	Prof. Dr. H.A.M. de Kruijf
19	Dr. W. Slooff
20	Ir. C.J. Roghair
21	Dr. J. Struijs
22	A.M. Kalif
23	A.J. Folkerts
24	Dr. L. Postuma
25	Ir. T. Hamers
26	Drs. L. Weltje
27 t/m 29	Bibliotheek RIVM
30	Depôt ECO/LWD
31	Depôt ECO
32	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
33 t/m 35	Auteurs
36	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
37 t/m 50	Reserve-exemplaren

INHOUDSOPGAVE

VERZENDLIJST	ii
INHOUDSOPGAVE	iii
SUMMARY	v
SAMENVATTING.	vi
DANKWOORD	viii
1. INLEIDING	1
2. ECOLOGIE VAN ENCHYTRAEËN EN GEBRUIK IN DE ECOTOXICOLOGIE	3
3. GROEI EN ONTWIKKELING VAN ENCHYTRAEËN ONDER INVLOED VAN VOCHTGEHALTE, TEMPERATUUR, pH EN ORGANISCHSTOFGEHALTE.	5
3.1. Een overzicht van studies uit de literatuur	5
3.2. Experimenten uitgevoerd op het RIVM	9
3.2.1. Temperatuur	10
3.2.2. Vochtgehalte.	11
3.2.3. pH	12
3.2.4. Organische stofgehalte	13
4. KWEKEN VAN ENCHYTRAEËN	15
4.1. Methoden genoemd in de literatuur	15
4.2. Kweekmethoden uitgevoerd op het RIVM	19
5. EXTRAHEREN VAN ENCHYTRAEËN UIT GROND	22
5.1. Methoden genoemd in de literatuur	22

5.2. Ervaring met de extractie van enchytraeën.	23
5.3. Voorstel voor een RIVM-methode voor het extraheren van enchytraeën	26
6. TOXICITEITSTESTEN MET ENCHYTRAEËN	27
6.1. Testen genoemd in de literatuur	27
6.2. Voorstel voor een RIVM-toetsmethode met enchytraeën	29
6.3. Toxiciteitsexperimenten met zink	30
7. CONCLUSIE	32
8. LITERATUUR	34
BIJLAGE I. Het kweken van <i>E. albidus</i>.	38
BIJLAGE II. Het kweken van <i>E. crypticus</i>.	40
BIJLAGE III. Het extraheren van <i>E. albidus</i>.	41
BIJLAGE IV. Het extraheren van <i>E. crypticus</i>.	42
BIJLAGE V. Procedure voor een reproductietoets met <i>E. albidus</i>.	43
BIJLAGE VI. Procedure voor een reproductietoets met <i>E. crypticus</i>	45

SUMMARY

This report describes a research on the use of enchytraeids in soil ecotoxicology. Aiming the implementation of methods for assessing effects of toxicants on the reproduction of enchytraeids within the Department of Soil Ecotoxicology, Laboratory of Ecotoxicology. Actually many soil ecotoxicological research is restricted to the earthworm *Eisenia andrei/fetida*. This limits possibilities for generalisation and ecologically relevant test results.

This study consists of literature survey and experimental work. The influence of soil moisture, pH, temperature on the reproduction of enchytraeids is reviewed from the literature. Moreover, literature on breeding techniques and methods for isolation of enchytraeids from soil samples is studied. The experimental work focusses on two species, *Enchytraeus albidus* and *E. crypticus*, laboratory cultures of both species are obtained from other laboratories. Special attention is given to determine optimal temperature, soil moisture, pH and soil organic matter content for the reproduction of both species. Several breeding techniques and extraction methods are applied and compared. An important starting-point was that reproduction preferably should be investigated in OECD-artificial soil, so that results could be compared with those of *Eisenia andrei/fetida*. For both species this proved to be possible.

The proposed toxicity test, very similar for both species, is performed in 15 ml vials containing approx. 7 g. "soil" to which 10 animals are added. Test duration for *E. albidus* is 9 weeks with two phases. After four weeks adults are removed and counted, and after again five weeks juveniles and cocoons are counted. The test with the smaller *E. crypticus* has a total duration of four weeks and gives the total number of juveniles per container. Model toxicant used in this study is zinc. This substance has been applied twice in order to check the reproducibility. Differences between replicated experiments were small, the EC₅₀ determined for *E. crypticus* was 98.7 and 86.3 mg/kg, and for *E. albidus* for juv./worm/week 137.9 and 147.0 mg/kg, and for cocoons/worm/week 363.0 and 350.6 mg/kg.

It is concluded that toxicity tests with both *Enchytraeus* species are rather easily to perform under similar conditions as the standardized test with the earthworm *Eisenia andrei/fetida*. This makes that results are comparable and that differences in sensitivity are probably of biological origin. Both tests fulfil the criteria, the test with *E. crypticus* is probably more easily to implement in the current soil ecotoxicological research because of its shorter test duration.

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft een onderzoek naar het gebruik van potwormen of enchytraeën in de bodemecotoxicologie. Het doel is methoden te ontwikkelen waarmee de toxiciteit van stoffen op de reproductie van deze dieren kan worden bepaald. Deze methoden kunnen dan ingezet worden voor de verschillende projecten die binnen de afdeling Bodemecotoxicologie van het Laboratorium voor Ecotoxicologie worden uitgevoerd. De noodzaak over deze methoden te beschikken komt voort uit de wens tot generalisatie en vergroting van de ecologische relevantie. Momenteel beperkt veel onderzoek zich tot het bodemecotoxicologisch modelorganisme: de compostworm *Eisenia andrei/fetida*. Op basis van resultaten aan één organismen kunnen moeilijk uitspraken gedaan worden over de effecten van toxische stoffen op wormachtigen (bodemdieren) in een meer algemene context.

Het onderzoek is opgebouwd uit twee delen: literatuuronderzoek en experimenteel laboratoriumonderzoek, deze tweedeling is ook steeds weer in dit rapport terug te vinden. Het literatuuronderzoek spitst zich toe op de biologie van potwormen, vooral tegen de achtergrond van het gebruik als laboratoriumproefdier. Veel aandacht is geschonken aan de invloed van vochtgehalte, temperatuur en pH op de groei, reproductie en ontwikkeling van enchytraeën. Eveneens wordt een overzicht gegeven van beschreven methoden voor het kweken en extraheren uit grond van enchytraeën. Tenslotte is gekeken naar in de literatuur beschreven ecotoxicologische onderzoeksmethoden met enchytraeën.

Het praktisch werk is gericht op *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus*, twee soorten waarvan laboratoriumpopulaties beschikbaar zijn. Aandacht is besteed aan het bepalen van de optimale temperatuur, vochtgehalte, en pH, de invloed van het organische stofgehalte op de reproductie, en het uitproberen van verschillende kweekmethoden. Eveneens zijn verschillende extractiemethoden vergeleken waarmee de wormen uit grond kunnen worden geïsoleerd. Uitgangspunt voor de te ontwikkelen reproductietoets was dat deze bij voorkeur in OECD-kunstgrond uit te voeren zou zijn, in analogie met de toxiciteitstoetsen met *Eisenia andrei/fetida*. Voor beide enchytraeën-soorten is het mogelijk gebleken de effecten van toxicanten op de reproductie in deze kunstgrond te bepalen.

Uiteindelijk wordt een methodiek voorgesteld waarbij toxicanten door OECD-kunstgrond worden gemengd waarvan vervolgens ca. 7 gr. over 15 ml kunststofpotjes wordt verdeeld. In

elk potje worden dan 10 wormen op de grond geplaatst. De toets met *E. albidus* duurt in totaal 9 weken en bestaat uit twee fasen, na 4 weken worden de volwassen dieren verwijderd en geteld, en 5 weken daarna het aantal juvenielen en cocons. De toets met *E. crypticus*, een kleinere soort, telt slechts een fase, na 4 weken worden het aantal juvenielen uit de grond geextraheerd en geteld. Als modeltoxicant bij de ontwikkeling van deze toetsen is zink gebruikt. De toxiciteit van zink op de reproductie van beide soorten is tweemaal bepaald om inzicht te krijgen in de reproduceerbaarheid. De verschillen tussen beide experimenten bleken gering te zijn; voor *E. crypticus* werd een EC_{50} van 98,7 en 86,3 mg/kg gevonden; voor *E. albidus* voor het aantal juvenielen/worm/week van 137,9 en 147,0 mg/kg, en voor het aantal cocons/worm/week van 363,0 en 350,6 mg/kg.

Geconcludeerd kan worden dat een relatief eenvoudig uit te voeren toxiciteitstoets met beide soorten mogelijk is. De omstandigheden van beide toetsen zijn sterk vergelijkbaar, en lijken ook veel op die van de gehanteerde reproductietoets met *Eisenia andrei/fetida*. Dit maakt dat eventuele verschillen in toetsresultaten vooral van biologische aard zullen zijn. Beide toetsen voldoen aan het beoogde doel waarbij de toets met *E. crypticus* vanwege de korte duur mogelijk makkelijker te implementeren is het lopend bodemecotoxicologisch onderzoek.

DANKWOORD

Hierbij willen we Prof. Dr. W. Westheide en Dr. V. Brockmeyer van de universiteit van Osnabruck, en Dr. J. Römbke van het Batelle instituut Frankfurt bedanken voor het beschikbaar stellen van de enchytraeën en de informatie die zij hebben verstrekt over het werken met deze dieren in het laboratorium. Dhr. R. van Veen (FCT) en Dhr. H. Vissenberg (LBG) worden bedankt voor de analytische ondersteuning. Dr. ir. C.A.M. van Gestel (Vrije Universiteit) heeft het ecotoxicologisch onderzoek met enchytraeën op de afdeling Bodemecotoxicologie geïnitieerd en in de beginfase begeleid, op een eerdere versie van dit rapport heeft hij commentaar gegeven.

1. INLEIDING

In vergelijking met het aquatische milieu zijn er voor de bodem slechts weinig ecotoxicologische toetsystemen beschikbaar. De enige bodemdieren die wijdverbreid in ecotoxicologische toetsen worden gebruikt zijn de twee nauw verwante compostwormen *Eisenia fetida* en *E. andrei*. Een belangrijk nadeel bij het gebruik van compostwormen is hun ecologische relevantie. Het zijn voornamelijk bewoners van composthopen, mestvaalten, en afvalbergen, daardoor zijn ze ecologisch minder relevant voor natuur- of landbouwgronden met lage gehalten aan organisch materiaal.

Verschillende soorten potwormen (enchytraeën) blijken potentieel geschikt te zijn voor bodemecotoxicologisch onderzoek. De dieren kunnen makkelijk in het laboratorium worden gekweekt en parameters zoals coconproductie, levensvatbaarheid van juvenielen en ontwikkelingstijd zijn goed te bepalen (Bethke-Beilfuss & Westheide, 1987; Römke, 1989; Westheide et al., 1989; Westheide & Beilfuss, 1991). Daarnaast zijn de enchytraeën een ecologisch relevante diergroep voor de bodem. Een groot aantal soorten komt in gematigde klimaatzones voor. Het zijn in het algemeen bewoners van wat zuurdere bodems, zowel in landbouwgebieden als natuurgebieden. Enchytraeën spelen een rol bij de afbraak van organisch materiaal in de bodem, hun voedsel kan bestaan uit bacteriën, schimmels, vers en dood plantenmateriaal, en allerlei vormen van rottend materiaal (zie Didden, 1991).

Het doel van onderhavige studie is het ontwikkelen en implementeren van een hanteerbare methode om sublethale effecten van bodemverontreinigende stoffen op enchytraeën te bepalen. Een dergelijke methode kan als aanvulling dienen op gestandaardiseerde ecotoxicologische toetsen met compostwormen, en heeft als voordeel dat een betere verdeling van bodemecotoxicologische toetsorganismen over de verschillende taxonomische en functionele groepen in verschillende bodemtypen bereikt wordt. Om dit doel te bereiken zijn soorten uitgezocht waar voldoende over bekend is, die goed in het laboratorium zijn te kweken, en die hanteerbaar zijn voor experimenteel onderzoek.

Er is een literatuurstudie uitgevoerd naar de hanteerbaarheid van enchytraeën in het laboratorium. Beschikbare informatie over kweken, toetsen en extraheren van enchytraeën uit grond, alsmede gegevens over groei en reproductie zijn samengevat. Op basis hiervan zijn een aantal voor het onderzoek relevante methoden uitgeprobeerd. Het onderzoek richt zich vooral

op de soorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus*¹ omdat deze goed hanteerbaar en redelijk te kweken zijn en omdat met deze soorten al enige ervaring is opgedaan in andere laboratoria. Van beide soorten zijn op de afdeling Bodemecotoxicologie (Laboratorium voor Ecotoxicologie) kweken opgezet op basis van materiaal dat verkregen is van Prof. Dr. Westheide, universiteit van Osnabrück.

Een voorstel voor een bodemecotoxicologische toetsmethode met bovengenoemde soorten wordt gedaan. Met deze methode is zowel het effect van systeemp parameters zoals vochtgehalte, temperatuur, en zuurgraad, als het effect van de modeltoxicant zink op de reproductie van beide soorten bestudeerd.

¹ De taxonomie van *E. crypticus* verdient enige toelichting. Het door ons gebruikte materiaal is afkomstig van een kweek (sinds 1984) aan de universiteit van Osnabrück. Uitgangsmateriaal van deze kweek kwam uit gft compost, Kompostwerk Duisburg-Huckingen en werd door Dr. J. Römcke beschikbaar gesteld. De soort werd in eerste instantie herkend als sterk gelijkend op *E. globuliferus*. Er bleven echter twijfels over de juiste identificatie, de soort is jarenlang benoemd als *E. cf. globuliferus* en onder deze naam in verschillende publicaties en rapporten genoemd. In een recente publicatie wordt het materiaal door Westheide en Graefe (1992) als nieuwe soort beschreven, n.l. *E. crypticus* welke sterk lijkt op *E. variatus*. De oorspronkelijke identificatie als *E. cf. globuliferus* berustte op een grote overeenkomst in algemene gelijkenis, maar het detail onderzoek heeft aangetoond dat *E. globuliferus* en *E. crypticus* verschillen in anatomie van de hersenen en dat alleen de laatste spermathecale openingen heeft (Westheide & Graefe, 1992).

2. ECOLOGIE VAN ENCHYTRAEËN EN GEBRUIK IN DE ECOTOXICOLOGIE

De familie van de Enchytraeidae behoort tot de klasse van de Annelida en de subklasse Oligochaeta waartoe ook de familie Lumbricidae behoort. Wereldwijd zijn zo'n 600 soorten Enchytraeidae bekend (Dash, 1991). Voor Europa noemt O'Connor (1967) 141 bodemsoorten behorende tot 21 genera. Enchytraeën hebben een cosmopolitische verspreiding en komen zowel in marine en zoetwater milieu's als in de bodem voor. Bijna iedere hand grond bevat enkele enchytraeën (O'Connor, 1971). De kleinste soorten zijn 1 mm terwijl de grootste 5 cm lang zijn. Veel voorkomende genera in bodems zijn *Enchytraeus*, *Cognettia*, *Fridericia*, *Lumbricillus*, *Henlea* en *Buchholzia*. Enchytraeën komen in het algemeen onder een grotere verscheidenheid aan milieucondities voor dan regenwormen. De hoogste aantallen, tot duizenden per m², komen voor in zure humusrijke gronden. Zoals bijvoorbeeld de zuurtolerante (acidofiele) *Cognettia sphagnetorum*, die waarschijnlijk door de afwezigheid van competitie in grote aantallen kan voorkomen. De meeste soorten hebben een voorkeur voor licht zure tot alkalische bodems. Enchytraeën dragen bij aan de decompositie van organische stof in de grond, onder andere door fragmentatie. De temperatuur lijkt onder natuurlijke omstandigheden meer invloed te hebben op de dichtheid van de populaties dan op het vóórkomen van enchytraeën.

Aangezien de huid van enchytraeën permeabel is voor water en de dieren geen tot nu toe bekend beschermingsmechanisme hebben tegen uitdrogen, zijn enchytraeën genoodzaakt in vochtige habitats te verblijven. De dichtheid van enchytraeën populaties wordt voor een belangrijk deel bepaald door het vochtgehalte en is daarnaast afhankelijk van temperatuur, organische stofgehalte en structuur van de grond. De mate waarin deze factoren werkzaam zijn op populatiedichtheid is ook soortafhankelijk. Enchytraeën soorten kunnen extreme omstandigheden overleven door fysiologische en gedragsadaptaties op soortsniveau (zie verder Didden (1991) voor een overzicht van de ecologie van enchytraeën en belangrijke literatuur referenties).

Het laatste decennium zijn verschillende enchytraeën soorten met name door duitse onderzoekers in ecotoxicologische toetsen gebruikt. Westheide et al. (1989) en Westheide en Bethke-Beilfuss (1991) beschrijven een sublethale toxiciteitstest in agar met de soorten *Enchytraeus* c.f. *globuliferus* en *E. minutus* en geven effecten van verschillende

bestrijdingsmiddelen (benomyl, carbofuran, cypermethrin, en parathion) op het aantal cocons/worm/dag, de vruchtbaarheid en de levensduur. Römcke (1989a, b) heeft de toxiciteit van verschillende bestrijdingsmiddelen (pentachloorfenol, 2,4,5-T, benomyl) onderzocht voor *Enchytraeus albidus* in toetsystemen met verschillende substraten (filterpapier, agar, en kunstgrond). Effecten waarnaar gekeken zijn zijn zijn sterfte, biomassa ontwikkeling, aantallen cocons en juvenielen, en morfologische en gedragsveranderingen van de wormen. Toetsen met sommige terrestrische enchytraeën kunnen ook worden uitgevoerd in water zoals Römcke en Knacker (1989) voor *E. albidus*, *E. cf. buchholzi*, *Cognettia sphagnetorum*, *Marionina cambrensis*, en *Achaeta cf. affinis* hebben laten zien.

3. GROEI EN ONTWIKKELING VAN ENCHYTRAEËN ONDER INVLOED VAN VOCHTGEHALTE, TEMPERATUUR, pH EN ORGANISCH STOFGEHALTE.

3.1. Een overzicht van studies uit de literatuur

Door Learner (1972) is de levensgeschiedenis van *Lumbricillus rivalis*, *Enchytraeus coronatus*, *E. buchholzi* en *E. albidus* bestudeerd. Van deze soorten zijn bij verschillende temperaturen (8, 15 en 20 °C) het aantal geproduceerde cocons, de lengte van de dieren, het aantal eieren per cocon, de lengte van het ei en de lengte van de cocon bepaald. Enchytraeën worden donker bewaard in petrischalen met een laag zwart filtreerpapier dat vochtig gehouden wordt met kraanwater. De enchytraeën worden gevoerd met slib uit afvalwater en dagelijks geobserveerd. De geproduceerde cocons worden in aparte petrischaaltjes overgebracht en onder dezelfde omstandigheden geïncubeerd.

Voor alle onderzochte soorten blijkt het gemiddeld aantal eieren per cocon het hoogst te zijn bij 15 °C, behalve voor *E. coronatus* waarbij het hoogste gemiddelde bij 8 °C is gevonden. Naarmate de temperatuur toeneemt neemt de incubatieperiode van de cocon, de juveniele fase, en de generatietijd af. De langste levensduur is voor alle soorten gevonden bij 8 °C. De invloed van de temperatuur op de netto reproductieratio verschilde per soort, voor *L. rivalis* en *E. coronatus* is de ratio het hoogste bij 15 °C en voor *E. buchholzi* en *E. albidus* bij 8 °C.

Uit de experimenten van Learner blijkt dat *E. albidus* (Tabel 1) een generatieduur heeft van gemiddeld 2 maanden met 3,3 generaties per jaar, de lengte van een ei 0,34 mm is, en het percentage vruchtbare cocons 47 %, 69 %, en 49 %, bij respectievelijk, 8, 15 en 20 °C. Het aantal eieren per cocon kan oplopen tot 22. Het gemiddeld aantal eieren per cocon is het hoogste bij 15 °C. Het aantal eieren per cocon is sterk gecorreleerd met de coconlengte. Een verlaging van de kweektemperatuur van 20 naar 8 °C laat een verdubbeling van de duur van het coconstadium zien.

Reynoldson (1939) observeerde *Lumbricillus lineatus* in bacteriebedden van afvalwater zuiveringsinstallaties en in glazen buisjes in het laboratorium. De buisjes zijn gedeeltelijk bedekt met zwart papier, gevuld met een plukje katoen en daarop 2 enchytraeën. Het voer bestaat uit wier, het katoen wordt vochtig gehouden en het buisje is afgesloten met een kurk.

Temperaturen beneden de 6 °C blijken in dit experiment een negatief effect te hebben op de coconproductie, op de groei van de dieren, en op het percentage uitgekomen cocons. Steriliteit van het ei blijkt toe te nemen bij temperaturen boven 20 °C. De enchytraeën vermenigvuldigen zich met name gedurende de koude maanden.

In een vergelijkbaar laboratoriumexperiment met 5 dieren per buisje heeft Reynoldson (1943) onderzoek gedaan naar het effect van de temperatuur op de vruchtbaarheid, coconproductie en groei van *E. albidus* (Tabel 1). Later bleek dat Reynoldson waarschijnlijk niet *E. albidus* maar *E. coronatus* bestudeerd heeft (volgens Learner, 1972).

Christensen (1956) ontwikkelde een enchytraeën broedkamer om speciale aspecten van de reproductie te kunnen observeren. De broedkamer bestaat uit een U-vormig velletje karton met de grootte van een objectglas. De dikte van het karton is afhankelijk van de grootte van de wormen. Voor *E. albidus* met een lengte van 20-35 mm en een diameter van 0,7-1,0 mm moet het 1,5 mm dik zijn. In de U vormige opening wordt geschikt substraat geplaatst. Het karton wordt aan beide zijden afgesloten met een objectglas en met een elastiek samengedrukt. Verschillende broedkamers kunnen met een dik elastiek samengebonden worden en op een petrischaal met vochtig filtreerpapier geplaatst. Op deze manier blijven de broedkamers op het juiste vochtgehalte door de capilaire werking van het karton. Uit de broedkamerexperimenten van Christensen (1956) blijkt dat *E. albidus* de cocons actief wikkelt in gecoaguleerde mucus, zandkorrels en plantenmateriaal. Dit proces duurt ongeveer 1½ uur en na afloop zijn de cocons nog maar heel moeilijk tussen het bodemmateriaal te onderscheiden.

Römbke (1989a) bestudeerde de levensgeschiedenis van *Enchytraeus cf. globuliferus* op agarplaten bij een temperatuur van 21 °C. Uit deze studie blijkt het embryonale stadium 6 dagen en het totale coconstadium 9 dagen duurt. Adulte dieren zijn gemiddeld 8,4 mm lang en hebben een levensduur van 5 maanden. Een verlaging van de temperatuur naar 15 °C verdubbelde de ontwikkelingstijd. Het temperatuuroptimum voor deze soort ligt bij 28 °C. *E. cf. globuliferus* is erg afhankelijk van de kwaliteit en de hoeveelheid voer, dit kan de grootte van de individuen beïnvloeden. Römbke (1989) bestudeerde *E. cf. globuliferus* en *E. albidus* ook in OECD-kunstgrond waarbij 10 enchytraeën in een pot kunstgrond zijn geplaatst waarna de overleving en het aantal juvenielen na 2 maanden is bepaald. Hieruit blijkt dat *E. crypticus* zich parthenogenetisch kan voortplanten en dat het overlevingspercentage in kunstgrond kleiner is dan 70 %. Het aantal juv./worm/week ligt tussen de 2,74 en 3,03 in kunstgrond.

Voor *E. albidus* geldt dat het aantal eieren per cocon sterk afhankelijk is van de temperatuur.

Schulz (1953) bestudeerde m.b.v. een temperatuurorgel de voorkeurstemperatuur van *E. albidus*. Het temperatuurorgel bestaat uit een reep vloeipapier van 5 x 45 cm dat op een strook zink, aan alle kanten 5 cm breder, is geplaatst. Aan één zijde van de strook wordt het zink met een brandertje verwarmd. Hierboven staat een druppelaar deze houdt het vloeipapier vochtig. Aan de andere kant van de strook staan thermometers op een afstand van 5-6 cm van elkaar. Het temperatuurorgel staat in het donker bij konstante temperatuur. Per experiment werden 10-20 dieren gebruikt die aan de koude kant van het temperatuurorgel geplaatst worden. Daarnaast bestudeerde Schulz (1953) het effect van temperatuur, temperatuur veranderingen en het vochtgehalte van zand op *E. albidus*. Deze blijkt een grote range aan temperaturen te kunnen verdragen. Binnen een in de natuur voorkomende temperatuurrange van -3 °C tot +28 °C kan *E. albidus* extreme fluctuaties verdragen. Temperaturen boven de 28 °C worden vermeden terwijl temperaturen boven 34 °C en onder de -11 °C dodelijk zijn. Uit de experimenten in zand blijkt dat *E. albidus* een voorkeur heeft voor een vochtgehalte van het zand van 5-15% (waterverzadiging van dit zand was bij 18.5%).

Abrahamsen (1971) bestudeerde de invloed van de temperatuur en het vochtgehalte van humus op *Cognettia sphagnetorum*. Hij gebruikte hiervoor gehomogeniseerde, bij 50 °C gedroogde en 2 mm gezeefde humus. In een bekerglas gevuld met ongeveer 9 g humus van de juiste vochtigheid worden 10 wormen gedaan en vervolgens in een klimaatkast bij 6, 15 of 18 °C weggezet. De humus wordt op een vochtgehalte van 7, 13, 19, 25, 30, 50, 70, 95 en 115 % van het watervasthoudend vermogen pF 0,5 gebracht, hetgeen overeenkomt met een pF waarden van respectievelijk 4,8, 3,7, 2,8, 2,3, 2,1, 1,5, 1,0, 0,5 en 0,25. Uit deze experimenten blijkt dat de kritische pF-waarde voor overleving van adulten $\geq 4,0$ was. Het optimum voor deze soort ligt tussen pF 0,6 en 1,5. Uit de experimenten blijkt ook dat het effect van het vochtgehalte van de humus afhankelijk is van de temperatuur. Boven een pF van 2,8 was temperatuur minder belangrijk dan het vochtgehalte. De dieren prefereerden een temperatuur van 12 °C boven 18 °C. Bij een pF 0,6-2,1 hebben na 5 maanden de 10 enchytraeën waarmee gestart werd zich vermenigvuldigd bij een temperatuur van 6, 12 en 18 °C tot respectievelijk 19, 86 en 406 individuen.

O'Connor (1967) geeft voor *E. albidus* een optimum kweektemperatuur van 18 °C.

Nielsen en Christensen zie Lübeck (1975) observeerden het effect van de temperatuur (7 -

22 °C) op de groei en ontwikkeling van *Enchytraeus coronatus* in petrischalen met daarin een 0,05 % knopoplossing met 2 % agar. De enchytraeën werden met havervlokken gevoerd. De optimumtemperatuur voor deze soort ligt tussen de 15 en 22 °C met een opbrengst van 2,45 cocons/worm/week. Het aantal eieren per cocon neemt af naarmate de temperatuur toeneemt en het aantal eieren per worm per dag heeft een optimum bij 15 °C. De vruchtbaarheid van de cocons heeft een optimum bij 10 °C. Met de toename van de temperatuur neemt het embryonale stadium, de coconrijpingstijd en de generatieduur af.

Learner (1972) bestudeerde het effect van de temperatuur (een range 8, 15 en 20 °C) op de groei en ontwikkeling van *Lumbricillus rivalis*, *E. coronatus*, *E. buchholzi* en *E. albidus* in petrischalen bekleed met vochtig filtreerpapier, de enchytraeën worden met bacterieslurry gevoerd en in het donker geïncubeerd. Zowel het uitkomen van cocons als ontwikkeling van de eicellen in de cocons zijn voor alle onderzochte soorten het hoogste bij 15 °C. Naarmate de temperatuur toeneemt neemt de cocon incubatieperiode, het stadium om volwassen te worden, de generatietijd en de levensduur af. De invloed van de temperatuur op de netto reproductieratio verschilt per soort, voor *L. rivalis* en *E. coronatus* is deze ratio het hoogste bij 15 °C en voor *E. buchholzi* en *E. albidus* is deze het hoogst bij 8°C.

Westheide et al. (1989) bestudeerden de levenscyclus van *E. globuliferus* op agar. De generatieduur van deze soort tussen de 12,3 en 15,6 dagen, de ontwikkelingstijd van ei tot het uitkomen van de juvenielen duurt 4 tot 6,3 dagen, en na het uitkomen van de cocon duurt het nog de 7,8 tot 9 dagen voordat de juvenielen volwassen zijn. Het aantal eieren per cocon bedraagt 25, de vruchtbaarheid van de eieren is 94 %, en 94,2 % van de eieren komt uit. De eerste 30 dagen produceren de enchytraeën de meeste cocons, 0,6-1,1 cocons per dag. De levensduur van deze enchytraeën is 120-160 dagen.

Dózsa-Farkas (1976) onderzocht de voedselkeuze van *Fridericia hegemon* en *Henlea nasuta* in grond met grof organisch materiaal. In een schaal van 18 cm doorsnede wordt een laag vochtige grond aangebracht. Hierop werden van 16 verschillende boom-struiksoorten stukjes blad van dezelfde grootte neergelegd. Na 90 dagen wordt door het wegen van de stukjes blad de vraat bepaald. Ook wordt om de 10 dagen gekeken naar het eetgedrag van de enchytraeën.

Tabel 1. Levensgeschiedenissenkenmerken van *Enchytraeus albidus* zoals gevonden door verschillende onderzoekers.

	Reynoldson(1943)*	Ivleva (1953)	Learner (1972)	Römbke (1989)a
cocon lengte (mm)	0,59	0,5-1,8	0,68-1,49	1,0
aantal eieren/cocon	2,1	1-35	0-22 (gem. 8)	3-25
cocon/worm/week		0,53-2,8 (18 °C)	0,52 (20 °C) 0,31 (15 °C) 0,82 (8 °C)	
eieren/worm/week			3,6 (20 °C) 3,4 (15 °C) 4,3 (8 °C)	
cocon stadium (dag)	11-32	12 (18 °C)	15 (20 °C) 28 (8 °C)	46 (12 °C)
juv. stadium (dag)	25-56	21 (18 °C)	28 (20 °C) 80 (8 °C)	
generatieduur (dag)	38-90		57 (20 °C) 129 (8 °C)	74
lengte adult (mm)	4,7-7,8		13-31	15-35
juv./worm/week				0,68

* volgens Learner (1972) heeft Reynoldson (1943) *Enchytraeus coronatus* bestudeerd i.p.v. *E. albidus*

3.2. Experimenten uitgevoerd op het RIVM

Op het RIVM zijn de effecten bestudeerd van temperatuur en vochtgehalte op de groei en ontwikkeling van de enchytraeën in OECD-kunstgrond. De gebruikte materialen en methoden zijn dezelfde als gebruikt tijdens de later uitgevoerde toxiciteitsexperimenten zie bijlage V en VI. De gehanteerde extractiemethode is beschreven in bijlage III en IV, zie ook hoofdstuk 5. De voor deze experimenten gebruikte soorten *E. albidus* en *E. crypticus* kwamen uit een eigen kweek volgens in bijlage I en II omschreven methoden. Gebruikt zijn volwassen dieren, te herkennen aan de aanwezigheid van een duidelijk zichtbaar ei in het lichaam van *E. crypticus* of een clitellum bij *E. albidus*. De gebruikte OECD-kunstgrond is samengesteld uit: 10 % gemalen turf, 20 % klei, 69,6 % zand en 1-0,4% calciumcarbonaat (om de pH op $6,0 \pm 0,5$ te brengen), demiewater is toegevoegd om de OECD-kunstgrond op het juiste vochtgehalte te

brengen. Bij een vochtgehalte van 55 % heeft dit medium een pF waarde van 2 - 2,5, hetgeen overeenkomt met veldcapaciteit van deze grond.

De experimenten zijn per soort en per behandeling in viervoud uitgevoerd. Testpotjes zijn gebruikt met ongeveer 7 g OECD-kunstgrond en daarin 10 enchytraeën. Als voer werd aan de testpotjes met *E. albidus* wekelijks een in water geweekte havervlok toegevoegd en aan de potjes met *E. crypticus* een fijngewreven havermoutvlok.

Testpotjes met enchytraeën zijn gedurende 4 weken aan een bepaalde conditie blootgesteld. In geval van *E. albidus* zijn de volwassenen dieren m.b.v. pincet en prepareernaald geïsoleerd en geteld. De potjes zijn vervolgens noch 5 weken geïncubeerd, met wekelijkse toevoeging van een fijngewreven havervlok indien nodig (wanneer het voer opgegeten was). De geproduceerde juvenielen en cocons zijn uit de kunstgrond geëxtraheerd volgens de in bijlage III omschreven methode en vervolgens geteld. *E. crypticus* is na 4 weken geëxtraheerd en geteld volgens de in bijlage III omschreven methode.

Om het tijdstip van de aanwezigheid van de eerste juvenielen van *E. crypticus* te bepalen zijn een aantal extra blanco's ingezet. Op verschillende tijdstippen zijn deze extra blanco's geëxtraheerd en aanwezige juvenielen geteld. Na een incubatieduur van 4 weken hadden de enchytraeën zich verdertigvoudigd (Tabel 2).

Tabel 2. Resultaten van het aantal juvenielen *E. crypticus* dat zich in de blanco monsters na een bepaald aantal dagen bevinden .

	t=0	t=15 d.	t=22 d.	t=28 d
gem. aantal (n=4)	0	0	167	338
std.	0	0	95	61

3.2.1. Temperatuur

Bij het temperatuurexperiment werden de potjes geïncubeerd in verschillende klimaatkasten met de volgende temperatuurinstellingen: 5 °C (-4 - +6 °C), 10 °C (8,5 - 10 °C), 15 °C (14 - 16 °C), 20 °C (20 - 20,5 °C), 25 °C (23 - 26 °C) en 30 °C (-). De getallen tussen haakjes geven de gemeten minimum en maximum temperatuur aan tijdens het experiment. De klimaatkast met de temperatuurinstelling van 5 °C ging één dag voor het beëindigen van het

Tabel 3. De resultaten van het effect van de temperatuur op de reproductie van *E. albidus* en *E. crypticus*.

Temp °C	<i>E. albidus</i> juv/w/w	<i>E. albidus</i> coc/w/w	<i>E. albidus</i> juv/cocon	<i>E. crypticus</i> juv/w/w
5	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.10 ± 0.15	0.19 ± 0.14	0.47 ± 0.51	0.00
15	1.35 ± 1.30	0.60 ± 0.21	2.33 ± 2.62	0.84 ± 0.28
20	1.23 ± 0.61	0.70 ± 0.23	1.84 ± 0.68	1.74 ± 0.83
25	0.00	0.46 ± 0.60	0.00	6.13 ± 1.79
30	0.00	0.00	0.00	5.85 ± 2.22

experiment kapot, de temperatuur daalde tot het vriespunt.

Bij het experiment met *E. albidus* (Tabel 3) werden na 4 weken bij een temperatuur van 30 °C geen levende volwassen dieren meer aangetroffen. Het gemiddeld aantal overlevende dieren bij 25 °C en 5 °C bedroeg respectievelijk 8,2 en 5,2. Bij de overige temperaturen bedroeg het gemiddeld aantal terug gevonden enchytraeën 10. Bij de testtemperatuur van 25 °C zou het lage aantal teruggevonden enchytraeën veroorzaakt kunnen zijn doordat de OECD-kunstgrond wat ingedroogd was en bij 5 °C door de temperatuurdaling in de kapotte klimaatkast. Voor *E. albidus* werd het maximum aantal juvenielen per worm per week en het maximum aantal juvenielen per cocon gevonden bij 15 °C, het maximum aantal cocons per worm per week werd gevonden bij 20 °C. Bij 5 en 30 °C werd geen reproductie vastgesteld en bij 25 °C alleen coconproductie.

Resultaten van de temperatuurexperimenten met *E. crypticus* staan eveneens samengevat in Tabel 3. De hoogste aantallen juvenielen per worm per week werden gevonden bij temperaturen van 25 en 30 °C. Bij een temperatuur ≤ 10 °C werd geen reproductie meer gevonden.

3.2.2. Vochtgehalte

De vochtgehalte-experimenten zijn uitgevoerd bij een temperatuur van 17 °C. De dieren zijn blootgesteld aan grond met de volgende vochtgehaltes: 15 % (17,3 %), 35 % (34,5 %), 55

% (54,5 %), 65 % (63,9 %) en 90 % (90,7 %). De gemeten waarden bij de start van het experiment staan tussen haakjes.

In het vochtgehalte-experiment met *E. albidus* (Tabel 4) zijn na 4 weken bij alle vochtgehalten alle ingezette volwassen wormen teruggevonden. Het optimale vochtgehalte in de OECD-kunstgrond voor de reproductie van *E. albidus* ligt boven de 35 % en onder de 90 % voor wat betreft het aantal juvenielen per worm per week en het aantal cocons per worm per week, voor het aantal juvenielen per cocon ligt het optimum bij een vochtgehalte ≥ 90 %. Voor *E. crypticus* is het optimum voor het aantal juvenielen per worm per week gevonden bij een vochtgehalte van 35 %, maar bij de hogere geteste vochtgehaltenes was er ook een goede reproductie (Tabel 4). Voor beide soorten werd bij een vochtgehalte ≤ 15 % geen reproductie meer geconstateerd.

3.2.3. pH

De pH-experimenten zijn uitgevoerd bij een temperatuur van 17 °C. De dieren zijn blootgesteld aan grond met de volgende pH waardes: 3,2, 3,6, 4,0, 5,3, 6,8 en 7,0. Resultaten van de pH-experimenten met *E. crypticus* staan samengevat in Tabel 5. De hoogste aantallen juvenielen per worm per week zijn gevonden bij een pH van 6,8. Bij *E. albidus* is 10 % sterfte

Tabel 4. De resultaten van het effect van het vochtgehalte van de OECD-kunstgrond op de reproductie van *E. albidus* en *E. crypticus*

vochtgehalte %	<i>E. albidus</i> juv/w/w	<i>E. albidus</i> coc/w/w	<i>E. albidus</i> juv/cocon	<i>E. crypticus</i> juv/w/w
15	0.00	0.00	0.00	0.00
35	0.36 ± 0.32	0.29 ± 0.9	1.06 ± 1.01	3.80 ± 0.65
55	1.82 ± 0.89	0.69 ± 0.15	2.71 ± 1.01	2.65 ± 0.69
65	1.62 ± 0.58	0.72 ± 0.19	2.45 ± 0.87	1.43 ± 0.28
90	1.38 ± 0.67	0.54 ± 0.15	2.71 ± 1.04	2.11 ± 0.60

opgetreden bij pH 3,2 en 3,6. De optimum pH in de OECD-kunstgrond voor de reproductie van *E. albidus* lag boven de pH 6,8 voor wat betreft het aantal juvenielen per worm per week

en het aantal cocons per worm per week. Voor het aantal juvenielen per cocon ligt het optimum voor deze soort boven pH 5,3.

Tabel 5. De resultaten van het effect van de pH van de OECD-kunstgrond op de reproductie van *E. albidus* en *E. crypticus*

pH	<i>E. albidus</i> juv/w/w	<i>E. albidus</i> coc/w/w	<i>E. albidus</i> juv/cocon	<i>E. crypticus</i> juv/w/w
3.2	0.01±0.01	0.00±0.00	0.00	0.64±0.53
3.6	0.01±0.02	0.08±0.13	0.05±0.08	3.27±0.51
4.0	0.30±0.42	0.23±0.28	1.20±1.94	5.49±2.35
5.3	2.79±1.19	0.66±0.30	5.11±2.17	4.78±2.15
6.8	5.75±2.11	1.17±0.37	4.87±0.67	9.54±1.55
7.0	7.63±1.14	1.38±0.41	6.11±2.14	8.25±0.98

3.2.4. Organisch stofgehalte

Om het effect van het organisch stofgehalte in de OECD-kunstgrond op de reproductie van enchytraeën te bepalen is een experiment uitgevoerd met verschillende percentages organisch stof in de vorm van turf, de pH is gesteld door CaCO₃ in vereiste hoeveelheid toe te voegen. Het experiment is voor elke soort in viervoud uitgevoerd. Aan ieder testpotje is ongeveer 7g OECD-kunstgrond toegevoegd. De pF is op 2 gesteld door toevoeging van de juiste hoeveelheid demiewater. Testpotjes met elk 10 enchytraeën zijn geïncubeerd in een klimaatkast van 17 °C en wekelijks gevoerd. Na 4 weken zijn in geval van *E. albidus* de volwassen dieren gesorteerd en geteld en vervolgens nog 5 weken geïncubeerd. Na de tweede incubatieperiode zijn geproduceerde juvenielen en cocons uit de OECD-kunstgrond geëxtraheerd, volgens de in de bijlage III omschreven methode. De pH van de OECD-kunstgrond lag bij aanvang van het experiment tussen de 5,5 en 5,8. Het aantal juvenielen per worm per week, het aantal cocons per worm per week zijn berekend. Testpotjes met *E. crypticus* werden na 4 weken incubatie volgens de in de bijlage IV omschreven methode geëxtraheerd. M.b.v. de student T-Toets is berekend of er sprake was van significante afwijkingen van de blanco (Dunnett, 1955, 1964). De resultaten van deze experimenten staan

samengevat in Tabel 6.

Tabel 6. Effect van het gehalte organisch stof in OECD-kunstgrond op de reproductie van de enchytraeën.

organische stof %	<i>E. albidus</i>	<i>E. albidus</i>	<i>E. crypticus</i>
	juv/w/w	coc./w/w	juv/w/w
5	6.4±1.7	1.2±0.22	4.4±0.55
10	8.8±2.2	1.4±0.38	4.0±1.1
20	8.2±2.4	0.30±0.17**	4.1±1.4

** geeft significant verschil met de 2 andere organische stofgehalten aan $P < 0.01$, m.b.v. Student t-toets.

Voor *E. albidus* is de coconproductie in de OECD-kunstgrond met het hoogste gehalte aan turf (20 %) lager dan die bij 5 en 10 %. Dit kan komen doordat deze soort de cocons verpakt in organisch materiaaldeeltjes waardoor ze niet goed te onderscheiden zijn van de turfdeeltjes uit de kunstgrond die in hoog percentage aanwezig zijn. Het aantal juvenielen is daarentegen wel goed te onderscheiden. De opbrengst van het aantal juvenielen is voor zowel *E. albidus* als *E. crypticus* bij de verschillende organische stofgehalten gelijk.

4. KWEKEN VAN ENCHYTRAEËN

Het belang van een goede kweekmethode is dat ten alle tijde voldoende enchytraeën voor experimenteel onderzoek beschikbaar zijn. Van het kweekmateriaal dienen soort, leeftijd en voorgeschiedenis bij voorkeur bekend te zijn hetgeen de reproductiviteit van toxiciteitsexperimenten met enchytraeën ten goede komt.

4.1. Methoden genoemd in de literatuur

Springett (1964) noemt een methode waarmee verschillende soorten enchytraeën kunnen worden gekweekt. De kweek bestaat uit een petrischaal met een laagje agar van 5 mm bedekt met een laagje grond waarin de te kweken soorten zich bevinden. De agar wordt bereid op basis van grondextract dat is verkregen door een liter grond met 1 liter gedestilleerd water te schudden en vervolgens te filtreren. Het extract wordt vervolgens aangevuld met gedestilleerd water tot 1 liter. Aan het grondextract wordt 2% agar toegevoegd en vervolgens geautoclaveerd, 30 min. bij een temperatuur van 120 °C. Sterile petrischalen worden gevuld met de agar en bedekt met een laagje grond dat van tevoren 30 min. is verhit bij 50 °C, om eventueel aanwezige enchytraeën en cocons te doden.

Ervaring wijst uit dat de laag grond niet te dik mag zijn omdat de enchytraeën anders niet meer zichtbaar zijn. De platen worden vochtig gehouden met steriel grondextract en geïncubeerd bij een temperatuur van 10 °C. Eventueel kunnen de platen op de kop geïncubeerd worden om te verhinderen dat de enchytraeën ontsnappen. Op deze manier heeft Springett een jaar lang *Marionina clavata*, *Cognettia cognetti*, *Achaeta eiseni* en *A. affinis* gekweekt.

Het voordeel van deze methode is dat de cocons die zich tussen de agar en de grond bevinden goed zichtbaar zijn. De methode is daarom niet alleen geschikt voor het kweken maar ook voor het volgen van de ontwikkeling van Enchytraeidae. Het nadeel van de methode is dat veel soorten meer voer nodig hebben dan dat zich in het laagje grond op de agar bevindt.

Dougherty (1960) beschrijft een methode voor een monoxenische cultuur van *Enchytraeus fragmentosus*. Enchytraeën van een xenische cultuur worden overgezet op een petrischaal met 'Difco Nutrient Agar' bedekt met een laag *Escherichia coli*. De enchytraeën worden iedere

dag gedurende een maand op een nieuwe plaat van dezelfde samenstelling overgezet. Hierdoor ontstaat een monoxenische kweek met *Enchytraeus fragmentosus* en *Escherichia coli*. Nadeel van deze methode is dat ze erg bewerkelijk is en waarschijnlijk alleen toepasbaar op deze specifieke soort. Als massakweek lijkt deze methode niet geschikt.

Een axenische cultuur van *E. fragmentosus* is beschreven door Dougherty (1961). De kweek bestaat uit enchytraeën afkomstig uit een monoxenische cultuur zoals hier boven beschreven. Dieren afkomstig uit deze kweek worden 3 keer gespoeld met gesteriliseerd water en vervolgens overgezet op een oplossing met antibiotica waarin ze 1,5 uur blijven. Behandeling met deze oplossing wordt vervolgens gedurende 50 min. herhaald. Vervolgens worden de dieren per stuk in buisjes van 16 mm met nutriënt agar geplaatst en na 20 uur weer overgezet op een schoon buisje met het eigenlijke kweekmedium. De gebruikte antibiotica-oplossing bestaat uit kaliumpeniciline en streptomycine-sulfaat, in verhouding 1:100 per ml. Het gebruikte kweekmedium wordt in 2 stappen bereid, eerst worden buisjes met 1,5 % agaroplossing geautoclaveerd en afgekoeld tot 48 °C en vervolgens wordt hieraan een suspensie van steriel verhitte lamslever met een gelijke hoeveelheid water aan toegevoegd (HLE-suspensie), in verhouding 1:16. Nadat dit medium is afgekoeld en voordat de enchytraeën op de buisjes zijn geplaatst wordt 0,1 ml HLE suspensie per buisje toegevoegd en worden de buisjes horizontaal geïncubeerd totdat het water uit de HLE suspensie is verdampt. De kweekmethode is erg kunstmatig en lijkt weinig relevant voor de bodem. Een nadeel is voorts dat de methode erg bewerkelijk is en waarschijnlijk alleen toepasbaar voor deze ene specifieke soort.

Gotthold en Koch (1971) hebben een axenische cultuur van *Enchytraeus fragmentosus* ontwikkeld. Hierbij wordt een petrischaal gevuld met een dun laagje glaswol en bedekt met een laagje water, haveremout wordt als voedsel toegediend. Op dit medium worden twee enchytraeën geplaatst. De enchytraeën worden overgezet zodra er een te groot aantal in de petrischaal aanwezig zijn.

Westheide (mond. meded.) noemt een methode waarbij volwassen potwormen geplaatst worden op een 1,5 % agarplaat en waarbij als voer haveremoutvlokken worden toegediend. Hij heeft deze methode gebruikt voor het kweken van *E. cf. globuliferus* en *E. albidus*, de eerste bij een temperatuur van 20 °C en de tweede bij een lagere temperatuur. De incubatie vindt plaats in het donker. Vermenigvuldiging van de enchytraeën op de platen vindt na enkele

weken plaats.

Römbke (1989a) heeft drie verschillende substraten getest voor het kweken van *E. albidus* en *E. cf. globuliferus* in petrischalen: OECD-kunstgrond, grondsuspensieagar (zie Bijlage I) en vochtig filtreerpapier. Als voer worden 10 mg havervlokken per week per petrischaal toegediend en de incubatie vindt plaats in schalen bij 12 °C. De tijd die het duurt voordat de eerste nakomelingen aanwezig zijn blijkt substraat afhankelijk te zijn. Bij *E. albidus* worden de eerste nakomelingen op agar en filtreerpapier na 5 weken waargenomen terwijl op de OECD-kunstgrond de eerste nakomelingen na 6 weken waargenomen worden. De eerste adulten *E. albidus* worden op filtreerpapier waargenomen na 10-11 weken, op agar na 11-12 weken en op OECD-kunstgrond na 13-14 weken. Bij *E. cf. globuliferus* worden de eerste nakomelingen op filtreerpapier en OECD-kunstgrond na 5 weken waargenomen en op agar na 6 weken. De verdere ontwikkeling van *E. cf. globuliferus* is dan in vergelijking met *E. albidus* sneller, na 8 weken is 5-50% volwassen. Het aantal juvenielen per worm per week geproduceerd in OECD-kunstgrond na drie maanden bedraagt voor *E. albidus* 0,65 en voor *E. cf. globuliferus* 3,03. Voor *E. cf. globuliferus* is de opbrengstin OECD-kunstgrond na 3 maanden twee maal zo groot als op agar en filtreerpapier, respectievelijk 3,03, 1,28 en 1,52 juv./w/w. Voor *E. albidus* is de opbrengst op agar hoger dan die op filtreerpapier en OECD-kunstgrond, respectievelijk 1,26, 0,72 en 0,18 juv/w/w. De overleving in OECD-kunstgrond bedroeg na 2 maanden voor *E. albidus* 86 % en voor *E. cf. globuliferus* <70 %. Het gewicht van *E. albidus* nam na 2 maanden met 90 % toe in OECD-kunstgrond.

Griffiths en Alexander (1986) beschrijven een methode waarbij veldgrond wordt gebracht in een kolom met aan de onderkant een aftappunt, in de grond bevindt zich een mengpopulatie van enchytraeën. De kolom wordt constant besprenkeld met 2 ml aquadest per uur bij een temperatuur van 20 °C. Onder het aftappunt bevindt zich een potje waarin de uitgespoelde enchytraeën worden opgevangen. De opbrengst na 13 weken is 100 enchytraeën per week per kolom. Voordeel van deze methode lijkt de geringe hoeveelheid werk te zijn die er aan verbonden is. Nadelen zijn dat de leeftijd van de enchytraeën niet bekend is, verschillende soorten naast elkaar voorkomen en dat de dieren niet goed houdbaar zijn in het water van het opvangpotje omdat daarin binnen 2 dagen zuurstofgebrek optreedt.

Richter (1980) beschrijft een methode waarbij enchytraeën in een met grond gevuld houten kistje worden gekweekt. In een houten kistje (25*18*10cm) wordt eerst een laagje turf

aangebracht. Vervolgens wordt het kistje voor 3/4 gevuld met een mengsel van bosgrond en turfmol in de verhouding 2:1 met een beetje zand en water om het vochtig te houden. In een kuiltje wordt een theelepel voer toegevoegd, bestaande uit sla, gekookte havermout en pudding in gelijke verhoudingen, en een mespunt suiker. Het voer wordt afgedekt met een glasplaatje en wekelijks aangevuld. Het kistje wordt geïncubeerd in het donker bij een temperatuur van 18 °C en regelmatig met een plantenspuit vochtig gehouden. Richter heeft deze methode met succes voor *E. albidus* gebruikt. De methode heeft als voordeel dat men konstant over een grote hoeveelheid *E. albidus* kan beschikken, het nadeel is dat de leeftijd van de enchytraeën onbekend is.

Römbke (1989a) toont aan dat *E. albidus* ook in OECD-kunstgrond kan worden gekweekt. Een plastic bakje van 40*20*20 cm wordt gevuld met 1 kg OECD-kunstgrond samengesteld uit: 10 % aan de lucht gedroogde turf (pH 5,5-6,0), 20 % klei (met een kaoliengehalte van 30 %), 70 % zand (waarvan 50 % tussen de 50-200 µm) en 50 % water. De pH wordt met CaCl₂ op 6,0 ± 0,5 gesteld. Twee maal per week worden de enchytraeën in het bakje gevoerd met een stevig papje van een theelepel levertraan, drie theelepels havervlokken, een theelepel biergist en een theelepel eiwitpoeder in een beetje melk. Eventueel wordt het papje verhit om schimmelgroei tegen te gaan. Incubatie vindt plaats bij 12 °C en om de 2 weken wordt de kweek omgeschept om deze wat luchtiger te maken. Om de 3 maanden worden de enchytraeën overgezet op nieuwe OECD-kunstgrond. Het voordeel van deze methode is dat men altijd beschikt over voldoende enchytraeën en de methode makkelijk en niet arbeidsintensief is. Nadeel is dat de leeftijd van de gekweekte enchytraeën onbekend is, omdat de kweek pas na drie maanden overgezet wordt en de generatie tijd van *E. albidus* een maand is (Römbke 1989). Ook kan men veel last krijgen van mijten en schimmelvorming. Als remedie tegen schimmelgroei wordt het bakje afgedekt met aluminiumfolie.

Naast *E. albidus* zijn door Römbke (1989) verschillende soorten enchytraeën gekweekt in grond uit het oorspronkelijk habitat. Dit gebeurde bij een temperatuur van 10 °C en meestal zonder voer omdat deze soorten doorgaans geen kunstmatig voer accepteren. Alleen *E. cf. globuliferus* en *E. cf. buchholzi* accepteren havervlokken als voer; dat 3x per week in kleine hoeveelheden wordt toegediend. Het voordeel van deze methode is dat bijna iedere soort gekweekt kan worden die van voedingsstoffen aanwezig in de veldgrond kan leven. Nadeel is dat kleine soorten moeilijk zonder beschadigen uit de grond te isoleren zijn. Voorts is het

voedsel in de gesteriliseerde veldgrond vaak onvoldoende voor een langdurige kweek.

Steiner (1963) meldt een methode waarbij enchytraeën in potgrond worden gekweekt. In een 1 liter bekeerglas met 300 ml geautoclaveerde potgrond worden 60 enchytraeën toegevoegd. Als voer wordt havermoutpap toegediend en het bekeerglas wordt afgesloten met een doekje gedrenkt in DDT tegen ontsnappen. Na 4 weken verschijnen de eerste juvenielen welke na 12-13 weken beschikbaar zijn voor experimenten.

4.2. Kweekmethoden uitgevoerd op het RIVM

Twee soorten enchytraeën *E. albidus* en *E. crypticus* zijn gedurende enige tijd in met agar gevulde plastic petrischalen gekweekt. Gebruikt zijn platen bestaande uit 1,5 % agar op basis van veengrondextract. Veengrondextract is verkregen door een 1 liter veengrond gedurende een nacht te schudden met 3 liter gedemineraliseerd water en vervolgens te filtreren over een papieren filter en aan te vullen met demiwater tot 2 liter. Daarnaast zijn 1,5 % agarplaten gebruikt met daarin havermout dat mee geautoclaveerd werd. Deze laatste platen zijn gebruikt met de gedachte dat de havermout op deze manier minder beschikbaar zou zijn als voer voor ongewenste mijten (Acari). Er zijn zowel agarplaten met een doorsnede van 5,5 als 9 cm gebruikt welke respectievelijk met 5 en 10 exemplaren van *E. crypticus* zijn geënt. De grotere *E. albidus* is alleen op 9 cm platen gekweekt. Beide *Enchytraeus* soorten kregen havermoutvlokken als voer, al naar gelang de mate van consumptie. Daarnaast zijn platen ingezet zonder dat voer is toegediend. Iedere week zijn de overgebleven enchytraeën overgeplaatst op nieuwe agarplaten. De oude platen met cocons zijn verder geïncubeerd samen met de nieuwe platen in een klimaatkast bij 17°C. Na een aantal dagen komen de juvenielen uit de cocons en kunnen nadat ze volwassen zijn gebruikt worden voor experimenten.

De ervaring op het RIVM heeft uitgewezen dat *E. albidus* niet goed te kweken is op agarplaten, de reproductie is laag waardoor de aangroei onvoldoende is om voldoende opbrengst te krijgen. De productie van *E. crypticus* bleek op alle drie de soorten agarplaten 2-3 cocons/worm/week, voldoende om een goede opbrengst te krijgen. Op de 5,5 cm platen werd *E. crypticus* niet volwassen, op de 9 cm platen gebeurde dit wel. In de havermout agarplaten was de voedselconsumptie niet te volgen zodat juvenielen mogelijk een te

kort aan voedsel gehad zouden kunnen hebben. Mijten kwamen op alle platen voor zelfs op de platen zonder voedsel, op geen enkele plaat was de mijten produktie explosief. Op grond van deze ervaringen kan worden geconcludeerd dat *E. crypticus* goed te kweken is op veenextract-agarplaten met een diameter van 9 cm waaraan havermoutvlokken als voer worden toegevoegd.

Zowel *E. albidus* als *E. crypticus* zijn gedurende enige tijd in OECD-kunstgrond gekweekt volgens Römbke (1989a) (zie 4.1.2). Er zijn glazen potten gebruikt (in tegenstelling tot Römbke) welke zijn geïncubeerd bij 17°C in een klimaatkast. De groei en de reproductie van de potwormen bleek goed te zijn. Er trad echter een overmatige groei van mijten op, waarschijnlijk een soort *Caloglyphus* welke in alkalisch milieu's voorkomt en leeft van jonge enchytraeën. De mijtengroei was te beperken door de enchytraeën over te zetten op nieuwe OECD-kunstgrond en de hoeveelheid voer te reduceren.

E. albidus bleek relatief gemakkelijk uit de OECD-kunstgrond te isoleren m.b.v. een pincet, dit in tegenstelling tot *E. crypticus* die veel moeilijker te isoleren is. De laatste is kleiner en de huid doorzichtiger waardoor de darm dezelfde kleur aanneemt als de OECD-kunstgrond. De enige manier *E. crypticus* uit de OECD-kunstgrond te isoleren is met een extractiemethode. Het gebruik van een extractiemethode kan echter nadelige gevolgen hebben op de vitaliteit van de dieren. Vaak gaat extractie (zie Hfst. 5) gepaard met grote temperatuurverschillen en kan een temperatuur shock optreden. Op grond van de kweekervaring in OECD-kunstgrond wordt geconcludeerd dat een dergelijke methode zich beter leent voor *E. albidus* dan voor *E. crypticus*.

Naar aanleiding van boven geschetste ervaring wordt de voorkeur gegeven *E. albidus* in OECD-kunstgrond te kweken op basis van de methode Römbke (1989a). Een belangrijke overweging is dat de beoogde toxiciteitstoets bij voorkeur ook in grond wordt uitgevoerd dat zodoende de overgang van kweek- naar toetsstelsel zo klein mogelijk is. Een gedetailleerde beschrijving van de voorgestelde kweekmethode staat in Bijlage I. Door iedere maand 25 volwassen enchytraeën over te zetten op nieuwe potten is de leeftijd van de dieren in de kweekpotten ongeveer gelijk. De generatieduur van deze soort is ongeveer 74 dagen, drie maanden na inzetten is het grootste gedeelte van de tweede generatie volwassen.

Voor *E. crypticus* wordt de voorkeur gegeven voor een kweek op agar. De methode staat eveneens in detail beschreven in Bijlage II. De keuze voor het kweken op agar is gemaakt

omdat de dieren moeilijk uit grond te isoleren zijn en het gebruik van extractiemethoden nadelige gevolgen kan hebben voor de vitaliteit van de dieren.

5. EXTRAHEREN VAN ENCHYTRAEËN UIT GROND

5.1. Methoden genoemd in de literatuur

De methode van Nielsen's (naar O'Connor 1967) is gebaseerd op de actieve beweging van enchytraeën langs een temperatuur en vochtgradiënt. Een met een boor gestoken grondkern wordt in een cylinder geplaatst waarin zich een grindlaag bevindt. Bovenop de kern wordt een laag zand aangebracht. De cylinder wordt in een warm waterbad geplaatst zodat een temperatuur- en vochtgradiënt wordt veroorzaakt. Bovenin de cylinder is het koel en vochtig, onderin warm en nat. De enchytraeën zullen zich naar de bovenste zandlaag bewegen, uit deze laag kunnen de enchytraeën vervolgens door wassen en decanteren worden geïsoleerd.

Voordeel van deze methode is de korte extraktietijd van 3 uur. Ieder grondmonster onafhankelijk van de grootte kan op deze manier geëxtraheerd worden. De methode is vooral geschikt voor minerale bodems (Dunger, 1989). Nadeel van de methode is dat niet alle enchytraeën worden geëxtraheerd, de enchytraeën die door omstandigheden minder actief zijn hebben een langere extraktietijd nodig. Daarnaast is de methode arbeidsintensief en kunnen door het wassen en dekanteren enchytraeën verloren gaan of beschadigd raken. Ook sterven waarschijnlijk veel enchytraeën doordat ze niet snel genoeg kunnen vluchten voor de hitte van het waterbad (O'Connor, 1955).

Om de nadelen van bovengenoemde methode te ondervangen heeft O'Connor (1967) de "wet funnel extraction" methode ontwikkeld. Deze is eveneens gebaseerd op de actieve beweging van enchytraeën en gaat als volgt. Een trechter met aan de onderkant een aftappunt en aan de bovenkant een zeef wordt gevuld met water; de te extraheren grond wordt boven op de zeef geplaatst, en vervolgens over een tijdsbestek van 3 uur van bovenaf verhit (45 °C) met een 60 watt lamp. Als gevolg hiervan verplaatsen de enchytraeën zich naar beneden en vallen door de zeef in het water (bij een hoge kamertemperatuur kan met water gekoeld worden). Voordeel van deze methode is de korte extraktietijd (3 uur) en grondmonsters onafhankelijk van de grootte geëxtraheerd kunnen worden. De methode is vooral geschikt gebleken voor de extractie van minerale bodems en strooisel. De opbrengst is ca. 87 % (Dunger 1989). De opbrengst is 3 keer ($P < 0,01$) zo hoog als met de hierboven beschreven methode volgens Nielsen's.

Methode volgens Graefe (naar Dunger & Fiedler, 1989). Een grondmonster van 50 - 100 cm³ wordt op een zeef met een doorsnede van 10 - 12 cm en een maaswijdte van 1,0 - 1,6 mm (een theezeefje) geplaatst. De zeef wordt in een bakje water gehangen, waarin zich een laagje water bevindt dat de zeef net raakt. Na 1 uur tot 10 dagen zijn de enchytraeën uit het grondmonster gekropen en bevinden zich in het bakje met water.

Voordeel van deze methode is dat ze eenvoudig en goedkoop is. Uit eigen ervaring blijkt dat de fijne deeltjes zoals klei uit het grondmonster ook in het opvangbakje kunnen komen en de enchytraeën hierdoor slecht te tellen zijn. Alleen door dekanteren en spoelen is het extract helder te krijgen, wat weer tot een verlies van de opbrengst kan leiden.

5.2. Ervaring met de extractie van enchytraeën

E. crypticus

Oostenbrink (1960) ontwikkelde een extractiemethode voor het extraheren van nematoden uit bodemmonsters, deze methode is gebaseerd op het feit dat nematoden een lager soortelijk gewicht hebben dan de meeste bodemdeeltjes. Door een opwaartse waterstroom blijven de nematoden in de Oostenbrinktrechter zweven en kunnen afgetapt worden en vervolgens met een zeef opgevangen. Met deze methode is op het RIVM en elders goede ervaring opgedaan, met name ook in routine-onderzoek. Mede hierdoor en de beschikbaarheid van de benodigde apparatuur op het RIVM is de bruikbaarheid voor de extractie van enchytraeën onderzocht.

De methode volgens Oostenbrink is gebruikt voor de extractie van *E. crypticus* uit OECD-kunstgrond. Zie bijlage IV voor een gedetailleerde omschrijving van de methode. Bij aanvang van het experiment werden 10 volwassen enchytraeën in een grondmonster van grond Kooyenburg geplaatst, het experiment werd in 4-voud uitgevoerd, na 3 weken waarin de dieren konden reproduceren werd de grond geextraheerd. Bij de extractie zijn verschillende opspoelsnelheden gebruikt. De beste opspoelsnelheid bleek 1000 ml/min. te zijn, bij deze snelheid werden alle enchytraeën die in de trechter gespoeld werden terug gevonden. De volwassen enchytraeën bleken op het wattenfilter van het uitkruipschaaltje of bovenop de topzeef van de Oostenbrinktrechter achter te blijven. Het kruipen van de enchytraeën door het wattenfilter naar het extractieschaaltje bleek bij de juvenielen van *E. crypticus* wat langer te duren dan bij nematoden, waarschijnlijk doordat enchytraeën borstels hebben in tegenstelling

tot nematoden.

Om de beste uitkruiptijd te bepalen is vervolgens een experiment uitgevoerd waarbij 16 potjes werden gevuld met ongeveer 7 gram OECD-kunstgrond (voor de samenstelling zie bijlage V.), in elk potje werden 10 volwassen *E. crypticus* geplaatst, na 5 weken werden alle potjes met de methode volgens Oostenbrink opgespoeld (zie bijlage IV). Na één dag (serie A) werden de enchytraeën uit acht extractieschaaltjes geteld. De zeeffjes met wattenfilter werden vervolgens weer op de bijbehorende extractieschaaltjes geplaatst en vervolgens tijdens de opvolgende drie dagen geteld. De inhoud van de acht andere extractieschaaltjes (serie B) werd na drie dagen, en de daarop volgende dag geteld. De extractieschaaltjes werden dagelijks aangevuld met kraanwater. De resultaten van dit experiment staan in Tabel 7. De aantallen enchytraeën staan cumulatief in de tijd vermeld. Met behulp van de students T-toets werd berekend op welk tijdstip geen significante toename meer was van het aantal enchytraeën. En of er een verschil is tussen het dagelijks tellen van de toename van het aantal enchytraeën in het extractieschaaltje en het slechts op één tijdstip tellen van de enchytraeën in de schaaltes.

Er bleek een significant verschil te zijn tussen $A_{(t=1)}$ en $B_{(t=3)}$. Er is géén significant verschil tussen $A_{(t=3)}$ en $B_{(t=3)}$; en tussen $A_{(t=2)}$ en $B_{(t=3)}$. De toename tussen $t=3$ en $t=4$ is te verwaarlozen. Geconcludeerd kan worden dat de beste uitkruiptijd twee dagen is. En er geen significant verschil is tussen het op 2 opvolgende dagen tellen en het na twee dagen tellen (met een keer bijvullen met water) van de enchytraeën in een extractieschaaltje. De recovery van deze methode is moeilijk te bepalen.

Eveneens is de methode volgens Dunger en Fiedler (1989) uitgetoetst. Zes potjes met ongeveer 7 g OECD-kunstgrond en 10 adulte *E. crypticus* werden gelegd op een theezeeffje dat vervolgens op een bakje met water geplaatst werd zodat de onderkant van het zeeffje het water raakte. De enchytraeën kropen naar het vochtige deel van de OECD-kunstgrond en vielen vervolgens in het bakje. Het nadeel van deze methode was dat er erg veel zand, klei en turf in het bakje terecht kwam zodat de enchytraeën niet goed te tellen waren. De methode werd opnieuw uitgetoetst met in het zeeffje een stukje watten filter en daarop het grondmonster. Kleideeltjes kwamen nu nog steeds in het bakje terecht en de enchytraeën waren noch steeds niet goed te tellen. Met behulp van de kleurstof bengaalrood is geprobeerd de enchytraeën te kleuren, de dieren kleurden wel maar bewogen minder waardoor ze toch niet goed te tellen waren.

E. crypticus werd op agar gekweekt, om de beesten uit het kweek medium te extraheren werden ze, zonder dat ze aan overbodige stress bloot gesteld waren zoals opspoelen, met een fijne pincet, prepareernaald of satéstokje van de agarplaat gehaald worden. De beste ervaring werd

Tabel 7. Het aantal enchytraeën geteld op verschillende tijdstippen na het spoelen met de Oostenbrinktrechter (serie A aanvang tellen na een dag, serie B aanvang tellen na drie dagen).

monster/tijdstip	t = 1 aantal juv.	t = 2 aantal juv.	t = 3 aantal juv.	t = 4 aantal juv.
A1	288	343	361	375
A2	486	533	560	563
A3	466	481	494	504
A4	333	386	400	410
A5	344	350	393	409
A6	465	469	510	518
A7	337	352	410	420
A8	319	323	341	356
B1	-	-	497	511
B2	-	-	365	382
B3	-	-	517	541
B4	-	-	518	524
B5	-	-	555	578
B6	-	-	513	530
B7	-	-	370	378
B8	-	-	463	490

opgedaan met een prepareernaald met gebogen punt of een satéstokje omdat daar de enchytraeën niet van afglijden. In geval er veel enchytraeën in de agar zijn gekropen of de agar dun is, dan kan door decanteren de agar van de enchytraeën verwijderd worden. Een schep agar met enchytraeën werd dan overgebracht in een bakje hieraan werd voorzichtig water toegevoegd, het bakje wordt voorzichtig heen en weer bewogen. Vervolgens werd het bakje enkele seconden stil gehouden waarop de enchytraeën naar de bodem zonken, de agar dreef dan nog en kon voorzichtig worden afgeschonken.

E. albidus

Volwassenen, juvenielen en cocons van *E. albidus* werden uit grond geextraheerd m.b.v. een douche en zeven van verschillende maaswijdte. Een pot gevuld met OECD-kunstgrond en daarin een kweek van *E. albidus* werd hiervoor gebruikt. OECD-kunstgrond met enchytraeën werd met een douche door de verschillende zeven gespoeld. Volwassen enchytraeën bleven op een zeef met een maaswijdte kleiner dan 1 mm achter, juvenielen op een zeef kleiner dan 45 µm en de cocons op een zeef kleiner dan 0,5 mm. De inhoud van de zeven kan met een straal water in een plastic beslagkom gespoeld worden. Door de OECD-kunstgrond eerste door een 2 mm zeef te spoelen kon veel van de grove delen OECD-kunstgrond gescheiden worden van de dieren.

5.3. Voorstel voor een RIVM-methode voor het extraheren van enchytraeën

Op grond van de literatuurstudie (5.1.), en eigen ervaring opgedaan met het extraheren van enchytraeën (5.2.), en tegen de achtergrond van de beoogde toepassing (toxiciteitstoetsen in OECD-kunstgrond) lijken de volgende methodes het best geschikt voor beide soorten.

Extraktie van *E. crypticus* uit de grond: Voor de extractie van volwassen en juveniele dieren van deze soort uit OECD-kunstgrond is de methode volgens Oostenbrink (1960) geschikt, wel moet de opspoelsnelheid anders ingesteld worden en moet de uitkruiptijd twee dagen zijn. Een gedetailleerde beschrijving wordt gegeven in de Bijlage IV.

Extraktie van *E. albidus* uit de grond: Volwassenen van deze soort kunnen uit OECD-kunstgrond met behulp van een douche en twee gestapelde zeven van 1 en 0,5 mm geextraheerd worden. Op de 1mm zeef blijven adulte enchytraeën van deze soort achter. Voor het isoleren van cocons en juvenielen kunnen zeven van 45 µm en 0,5 mm gebruikt worden. De cocons blijven op de 0,5 mm zeef achter en de juvenielen op de 45 µm. Uiteindelijk wordt de inhoud van de zeven in aparte kommen gespoeld. Volwassen dieren kunnen dan eventueel met een prepareernaald worden overgebracht naar andere potjes. Cocons en juvenielen kunnen beide door decanteren in een kleiner volume worden geconcentreerd. Een gedetailleerde beschrijving wordt gegeven in de Bijlage III.

6. TOXICITEITSTESTEN MET ENCHYTRAEËN

6.1. Testen genoemd in de literatuur

Testen uitgevoerd in waterig of agar medium

Hagens en Westheide (1987) beschrijven een methode om subletale effecten te bestuderen op *Enchytraeus minutus*. Hierbij worden de dieren op een agarplaat met speciale voedingsoplossing gekweekt zie 4.1.1. De agar wordt als deze nog warm is met 3 vol. % teststof gemengd. Vervolgens worden 9 dagen oude enchytraeën op de agar geplaatst. De incubatieduur is 4, 6 en 10 dagen. De enchytraeën worden gefixeerd en vervolgens behandeld voor observatie met de electronenmicroscop. Met dit instrument wordt gekeken naar de veranderingen in de structuur van de chloracogeen- en darmcellen.

Römbke (1989) test enchytraeën in een waterige oplossing. De testcondities zijn overeenkomstig met die van de acute test met *Daphnia* (OECD richtlijn 202). De testparameter is sterfte. Voor iedere concentratie worden 30 *E. albidus* gebruikt uit een cultuur op OECD-kunstgrond zie 4.1.2. De enchytraeën worden per 10 stuks in een 100 ml bekersglas geplaatst met 50 ml testoplossing, en gedurende 96 uur zonder bijvoeren blootgesteld. De testoplossing bestaat uit een bepaalde hoeveelheid nutriënten in gedemineraliseerd water, met een conductiviteit van 10 mS/cm² en een pH van 7,8. Iedere dag worden dode enchytraeën geteld en uit de oplossing verwijderd. K₂ Cr₄ O₄ wordt gebruikt als referentiestof.

Weuffen (1968) heeft een test ontwikkeld in waterig medium waarbij naar sterfte is gekeken. De enchytraeën worden gekweekt in grond zie 4.1.2, en van daaruit per 20 in 12,8 ml water met teststof geplaatst. Dit is in 3-voud uitgevoerd. In geval van slecht oplosbare stoffen is een oplosmiddel (aceton) gebruikt, waarbij dient te worden opgemerkt dat 5 % aceton al effect heeft op de enchytraeën. Na 0,25, 0,5, 1, 2, 4 en 8 uur worden de blootgestelde enchytraeën bekeken. Na deze periode worden ze gewassen 3 keer met 300 ml water en vervolgens in schoon leidingwater geplaatst. Wanneer ze dit overleefden is een langere blootstelingsperiode uitgeprobeerd.

Westheide (mond. meded.) ontwikkelt eveneens een toxiciteitsexperiment uitgevoerd in agar met sterfte als toetsingsparameter. In kleine petrischalen wordt 5 ml vloeibare warme

agar gemengd met de te testen oplossingen. Wanneer de agar gestold is worden 10 dieren op de agar geplaatst, met 50 mg havervlokken als voer. De incubatie gebeurt bij 21 °C en na 5 en na 10 dagen worden de dieren geteld. Als testorganismen zijn *E. albidus* en *E. cf. globuliferus* gebruikt. Deze test is later door Westheide en Bethke-Beilfuss (1987) uitgebreid tot een reproductie-experiment met *E. cf. globuliferus* op de gestolde agar worden 3 adulte dieren op de agar geplaatst, het experiment wordt in 5-voud ingezet. De incubatie gebeurt bij 21 °C en duurde 30 dagen, iedere 5 dagen worden de enchytraeën op een vers schaalje met de zelfde concentratie van de te testen stof geplaatst. De cocons worden op de onder kant van de petrischaal gemarkeerd en de vruchtbaarheid wordt vastgesteld door het aantal juvenielen na 10 dagen te tellen.

Testen uitgevoerd in grond

Römbke (1989) ontwikkelde een test waarin lethale en sublethale parameters gecombineerd zijn in een experiment in OECD-kunstgrond met als testparameters sterfte, biomassa en reproductie. Het door hem gebruikte organisme is *E. albidus*. De test is tweedelig, een 4 weken durende acute toxiciteitstest, gevolgd door een 8 weken durende reproductietest. Het geheel wordt in 3-voud ingezet. Testvatjes bevatten 10 g OECD-kunstgrond met homogeen gemengde teststof en 10 Enchytraeidae. Aan het begin en na 2 weken van de 4 weken durende test krijgen de dieren 20 mg voer in de vorm van havervlokken. Incubatie gebeurt in het donker bij 12 °C. De enchytraeën worden wekelijks geteld en gewogen. De overlevende adulten worden aan het eind van deze test uit het medium gehaald en de testvaten worden noch 8 weken geïncubeerd, na 4 weken wordt gevoerd. De juvenielen worden aan het eind van de test met de hand geteld. Aan het eind van de acute toxiciteitstest mag de sterfte niet meer dan 10 % in de blanco bedragen. En na 2 en na 4 weken moet het gewicht van de enchytraeën met respectievelijk 25 % en 50 % zijn toegenomen. Aan het eind van de test moet het aantal juvenielen in de blanco minstens 25 bedragen per testvatje. Chlooracetamide wordt gebruikt als referentiestof.

Schöne (1971) ontwikkelde een test in zand. De test wordt uitgevoerd in melkpakken met daarin een laag zand en kapot gemaakt wier als voer; testorganisme is *E. albidus*. De testen werden bij een temperatuur van 20-22 °C uitgevoerd. Het blijkt dat de dieren slecht te volgen zijn op deze manier zodat op petrischalen met daarin een laag filterpapier is

overgegaan. De geproduceerde cocons worden apart in kleine ringetjes geplaatst de ringetjes worden op vochtig filtreerpapier gezet. Op deze manier kan de ontwikkeling van cocons geobserveerd worden. De juvenielen worden op zand met wier in filmkokertjes bewaard voor nadere bestudering. Gekeken wordt naar de invloed van voedsel (verschillende wiersoorten) en de saliniteit van het substraat, op de levensduur, voortplanting en de vochtregulatie. van *E. albidus*. Door van de enchytraeën lichaamsvocht af te tappen en hiervan de vriespuntsdaling te bepalen, wordt de aanpassing van de worm aan de saliniteit van de omgeving bekeken.

6.2. Voorstel voor een RIVM-toetsmethode met enchytraeën.

De voorgestelde methode wordt uitgevoerd in de OECD-kunstgrond met de soorten *E. crypticus* en *E. albidus*. Als testparameter wordt reproductie gekozen, waarbij voor *E. crypticus* naar het aantal geproduceerde juvenielen gekeken wordt, en bij *E. albidus* naar zowel het aantal geproduceerde juvenielen als het aantal cocons. Uitvoering van de experimenten vindt bij voorkeur in viervoud plaats. Toxicanten worden homogeen door de OECD-kunstgrond gemengd zoals in de OECD richtlijn voor de acute toxiciteitstoets voor regenwormen (OECD, 1984). De enchytraeën worden per tiental willekeurig over de testpotjes verdeeld. De enchytraeën krijgen wekelijks haverhout als voer. Er vindt geen voorincubatie plaats.

Na 4 weken worden uit de testpotjes met de soort *E. albidus* de volwassenen op het oog gesorteerd en geteld. De potjes worden vervolgens noch 5 weken geïncubeerd. Vervolgens worden de geproduceerde juvenielen en cocons uit de OECD-kunstgrond geëxtraheerd door de grond over zeven te spoelen volgens de in bijlage III omschreven methode.

De testpotjes met *E. crypticus* worden na de 4 weken incubatie met de aangepaste opspoelmethode volgens Oostenbrink geëxtraheerd (zie bijlage IV) waarna het aantal juvenielen geteld kan worden.

De voorgestelde toetsmethoden voor beide soorten staan gedetailleerd omschreven in de bijlage V en VI.

6.3. Toxiciteitsexperimenten met zink.

Ter bepaling van de reproduceerbaarheid van de toxiciteitstoetsen, zijn op basis van het voorgestelde protocol (zie bijlage V en VI), opeenvolgend twee toxiciteitsexperimenten (A en B) met zink uitgevoerd. Met de soorten *E. albidus* en *E. crypticus*.

Zink is in de vorm van zinkchloride ($ZnCl_2$ van Merck > 98 % zuiver) getest. Het experiment werd voor elke soort in viervoud uitgevoerd. In ieder testpotje ging ongeveer 7g OECD-kunstgrond met een vochtgehalte van 55 %. Zinkchloride werd opgelost in demiewater en aan de droge OECD-kunstgrond toegevoegd.

Testpotjes met elk 10 enchytraeën werden geïncubeerd in een klimaatkast van 17 °C en wekelijks gevoerd. Na 4 weken werden uit de testpotjes met *E. albidus* volwassenen gesorteerd en geteld. Deze potjes werden vervolgens nog 5 weken geïncubeerd. Na deze 5 weken werden geproduceerde juvenielen en cocons uit de OECD-kunstgrond geëxtraheerd volgens de in de bijlage III omschreven methode. De pH van de OECD-kunstgrond was bij aanvang van het experiment tussen de 6,2 en 5,9 voor respectievelijk de blanco en de hoogst geteste concentratie. Het aantal juvenielen per enchytrae per week, het aantal cocons per enchytrae per week en het aantal juvenielen per cocon zijn berekend.

Testpotjes met *E. crypticus* werden na 4 weken incubatie volgens de in de bijlage IV omschreven methode geëxtraheerd. Voor de berekening van de No-Observed-Effect-Concentraties (NOEC-waarden) zijn met het programma TOXSTAT en de Student T-Toets significante afwijkingen met de blanco berekend (Dunnnett 1955, 1964). De EC50 werd berekend met het GENSTAT programma EC50.BET. De resultaten staan in Tabel 8 en 9.

De EC50-waarden voor *E. crypticus* waren 251 en 186 mg/kg voor respectievelijk Zink A en Zink B experiment. De EC10-waarden voor *E. crypticus* berekend uit de experimenten A en B waren respectievelijk 98 en 86 mg/kg. De EC50-waarde voor het aantal juvenielen van *E. albidus* is 138 en 147 mg/kg de EC10-waarden 3 en 42 mg/kg. De EC50-waarde voor het aantal cocons 363 en 350 mg/kg. Er is geen groot verschil tussen de resultaten van de twee experimenten met zink.

Van Gestel et al. (1992) vinden een NOEC-waarde van 320 mg/kg voor reproductie bij de compostworm *Eisenia andrei*. Deze waarde is hoger dan de in deze experimenten gevonden waarden. Neuhauser et al. (1985) vinden een LC50 van 662 mg/kg voor *Eisenia fetida* in

OECD-kunstgrond. Net zoals bij de compostworm ligt de NOEC-waarde dicht bij de EC50-waarde van de Enchytraeidae.

Tabel 8. De resultaten van het effect van zink (exp. A) op de reproductie van *E. albidus* en *E. crypticus* in OECD-kunstgrond.

conc. mg/kg	<i>E. albidus</i> juv/w/w	<i>E. albidus</i> coc/w/w	<i>E. albidus</i> juv/cocon	<i>E. crypticus</i> juv/w/w
0	2.1±0.85	0.80±0.14	2.6±0.71	8.6±1.4
100	3.3±1.2	0.76±0.14	4.2±0.71	9.6±1.5
180	2.6±1.3	0.76±0.14	3.4±1.1	8.3±1.5
320	0.61±0.04	0.57±0.10*	1.1±0.28*	3.9±3.2*
560	0.06±0.00*	0.13±0.01*	0.4±0.07*	0.04±0.09*
1000	0.01±0.014*	0.07±0.03*	0.2±0.35*	0.00±00*

* geeft significant verschil met de blanco aan, $p < 0.05$, m.b.v. de Williamstest in TOXSTAT.

Tabel 9. De resultaten van het effect van zink (exp B) op de reproductie van *E. albidus* en *E. crypticus*.

conc. mg/kg	<i>E. albidus</i> juv/w/w	<i>E. albidus</i> coc./w/w	<i>E. albidus</i> juv/cocon	<i>E. crypticus</i> juv/w/w
0	1.8±0.17	0.85±0.21	2.2±0.4	8.9±1.4
100	1.2±0.5*	0.94±0.26	1.3±0.4*	9.2±2.3
180	0.97±0.49*	0.69±0.27	1.3±0.3*	7.4±1.9
320	0.49±0.49*	0.73±0.07	0.74±0.52*	0.6±0.4*
560	0.00*	0.00*	0.00*	0.0
1000	0.00*	0.00*	0.00*	0.0

* geeft significant verschil met de blanco aan, $p < 0.05$, m.b.v. de Williamstest in TOXSTAT.

7. CONCLUSIE

De enchytraeënsoorten *E. albidus* en *E. crypticus* blijken makkelijk te kweken onder laboratoriumcondities en geschikt voor experimenteel onderzoek. De soorten vertegenwoordigen een groep van bodemdieren die ecologisch relevant zijn voor de nederlands bodem. *E. albidus* wordt in OECD-kunstgrond gekweekt en *E. crypticus* op agar. De kweekmethoden zijn goedkoop, kosten relatief weinig tijd en ruimte, en leveren voldoende beesten voor ecotoxicologisch onderzoek.

Voor beide enchytraeënsoorten is eveneens een methode ontwikkeld voor de extractie uit grond. *E. albidus* wordt over zeven geextraheerd en *E. crypticus* m.b.v. de Oostenbrinktrechter, een methode die ook gebruikt wordt voor nematoden. De extractiemethoden lijken efficiënt en betrouwbaar voor het beoogde doel.

Voor beide soorten kunnen de effecten van toxische stoffen op de reproductie bepaald worden, blootstelling vindt plaats in OECD-kunstgrond. Bij *E. albidus* wordt het aantal cocons en het aantal juvenielen bepaald, bij *E. crypticus* wordt alleen het aantal juvenielen bepaald. De toxiciteitstoetsen zijn relatief eenvoudig en niet arbeidsintensief, waardoor een groot aantal replica's binnen een toets mogelijk is. De toetsomstandigheden van beide toetsen zijn sterk vergelijkbaar en benaderen de natuurlijke situatie. De enchytraeëntoetsen zijn aanvullend op het gangbaar bodemecotoxicologisch met *Eisenia andrei/fetida*.

Met de enchytraeën is het goed mogelijk gebleken de respons op blootstelling aan toxische en op abiotische bodemfactoren te onderzoeken. Uit de resultaten van de uitgevoerde experimenten blijkt dat de optimum temperatuur voor *E. albidus* rond de 15°C is. Het grootste aantal juvenielen/worm/week en cocons/worm/week werd gevonden bij een pH groter dan 6,8, terwijl hoge aantal juvenielen per cocon al gevonden werden bij een pH groter dan 5,3. Het optimum voor de reproductie van *E. crypticus* is gevonden bij een temperatuur van 25 °C en een pH groter dan 6,8. Voor organische stofgehalte kon voor de beide soorten geen specifieke optimum bepaald konden worden.

Het effect van zink op de reproductie, dit experiment was in 2-voud uitgevoerd, van *E. albidus* voor het aantal juvenielen/worm/week 137,9 en 147,0 mg/kg en het aantal cocons/worm/week 363,0 en 350,6 mg/kg, en van *E. crypticus* 98,7 en 86,3 mg/kg. Uit deze resultaten blijkt dat de experimenten goed reproduceerbaar zijn.

E. crypticus heeft als voordeel dat de totale toetsduur 4 weken bedraagt het nadeel van het gebruik van deze soort is dat slechts één toxicologische parameter kan worden bepaald (aantal juvenielen per enchytrae). Een bijkomend aspect is dat de kweek van *E. crypticus* in ager plaatsvindt terwijl de dieren blootgesteld worden aan toxische stoffen in OECD-kunstgrond. *E. crypticus* behoort tot een groep van *Enchytraeus* soorten welke in de nederlandse, ook wat zuurdere, bodems voorkomt.

De totale toetsduur in geval van *E. albidus* duurt 9 weken, de toxicologische parameters die bepaald kunnen worden zijn zowel het aantal cocons per enchytrae als het aantal juvenielen per enchytrae, en het daaruit af te leiden aantal juvenielen per cocon. Zowel de kweek als de blootstelling aan toxische stoffen vindt in OECD-kunstgrond plaats. *E. albidus* is een soort met de voorkeur voor ophopingen van organisch materiaal en lijkt daarin wat betreft ecologie mogelijk meer op de compostworm *Eisenia andrei/fetida* dan op *E. crypticus*.

8. LITERATUUR

Abrahamsen, G. 1971

The influence of temperature and soil moisture on the population density of *Cognettia sphagnetorum* {Oligochaeta: Enchytraeidae} in cultures with homogenized raw humus. *Pedobiologia*, 11; 417-424.

Bethke-Beilfuss, D. & Westheide, W. 1987.

Sublethale Schädigungen terrestrischer Enchytraeiden (Oligochata, Annelida) durch Pflanzenbehandlungsmittel: Veränderungen der Kokonproduktion und der Eifertilität. *Verhdlg. Ges. Ökol.*, 16; 417-422.

Christensen, B. 1956

Studies on Enchytraeidae 6. Technique for culturing Enchytraeidae, with notes on cocoon types. *Oikos*, 7;II, 302-307.

Dash, M. C. 1990

Oligochaeta: Enchytraeidae. In: D. L. Dindal, *Soil Biology Guide*, J. Wiley & sons, New York etc.; 311-340.

Didden, W. 1991

Population ecology and functioning of Enchytraeidae. Proefschrift Landbouwniversiteit, Wageningen; 116 pp.

Dougherty, E. C. and Solberg, B. 1960

Monoxenic cultivation of Enchytraeid annelid. *Nature*, 186; 4730, 1067-1068.

Dougherty, E. C. and Solberg, B. 1961

Axenic cultivation of an Enchytraeid annelid. *Nature*, 192; 4798, 184-185.

Dózsa-Farkas, K. 1982

Konsum verschiedener Laubarten durch Enchytraeiden (Oligochaeta). *Pedobiologia* 23; 251-255.

Dózsa-Farkas, K. 1976

Über die nahrungswahl zweier enchytraeiden-arten(oligochaeta: enchytraeidae). *ACTA Zoologica academiae scientiarum hungaricae*, XXII; 1-2, 5-28.

Dunger, W. und Fiedler, H.J. 1989

Methoden der biologie.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart; New York

Dunnnett, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Stat. Assoc.* 50, 1096-1121.

Dunnnett, D.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.

- Gotthold, M. L. and Koch, J. 1974
Further developement of an artificial medium for the axenically cultured annelid *Enchytraeus fragmentosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 48B, 307-317.
- Griffiths, B.S. and Alexander, C.E. 1986
A technique for cultering enchytraeid worms on coniferous litter. *Soil Biol.Biochem.* 18;1, 123-124.
- Hagens, M. und Westheide, W. 1986
Sublethale schädigungen bei *Enchytraeus minutus* (oligochaeta, annelida) durch das insektizid Parathion: Veränderung in der Ultrastruktur von Chloragog- und Darmzellen in abhängigkeit von der Belastungsdauer. *Verhandlungen Gesellschaft Für Ökologie Band XVI Gießen.*
- Jacot, A. P. 1940
The fauna of the soil. *Quarterly Review Biology*, 15;1, 28-58.
- Latter, P. M. 1977
Axenic cultivation of an Enchytraeid worm, *Cognettia Sphagnetorum*. *Oecologia*, 31, 251-254.
- Learner, M. A. 1972
Laboratory studies on the life-histories of four Enchytraeid worms (*Olichochaeta*) which inhabit sewage percolating filters. *Ann. appl. Biol.*, 70, 251-266.
- Lübeck, R. A. 1975
Zum lebenszyklus von *Enchytraeus coronatus* Nielsen and Christensen 1959 (*Olichochaeta*). *Mitt. Hamburg. Zool. Inst.*, 72, 79-90.
- Neuhauser, E. F., R. C. Loehr, D. L. Milligan and M. R. Malecki, 1985 Toxicety of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biol. Fertil. Soils*, 1: 149-152.
- O'Connor, F. B. 1955
Extraction of Enchytraeid Worms from a Coniferous Forest Soil. *Nature*, 175, 815-816.
- O'Connor, F. B. 1967.
The Enchytraeidae. chapter 8. In: Burges, A. and Raw, F. (ed.). *Soil Biology*. Academic Press, London and New York; 213-257.
- O'Conner, F. B. 1971
The enchytraeids. In: Philipson J. (ed.). *Methods of study in quantitative soil ecology*. Blackwell, Oxford and Edinburgh; 83-106.
- OECD (1984)
Guideline for testing of chemicals no 207. Earthworm, acute toxicety test. Adopted 4 april 1984.

- Oostenbrink, M. 1960.
Estimating nematode populations by some elected methods. In: J.N. Sasser and W.R. Jenkins, Nematology: 85-102.
- Popovici, I. 1977
The influence of atrazin on soil fauna. Pedobiologia, 17, S, 209-215.
- Reynoldson, T. B. 1939
On the life-history and ecology of *Lumbricillus lineatus* Mull. (*Olichochaeta*). Ann. Appl. Biol. 26, 782-799.
- Reynoldson, T. B. 1943
A comperative account of the live cycles of *Lumbricillus lineatus* Mull. and *Enchytraeus albidus* Henle in relation to temperature. Ann. appl. Biol., 30, 60-66.
- Richter, K. 1980
Hausgemachte Würmer: Enchytraën. Aquarien und terrarien, Stuttgart, 1967, 00014, 224-227
- Römbke, J. and Knacker, Th. 1989
An aquatic Toxicity Test for Enchytraeids. Hydrobiol. J. 180; 235-242
- Römbke, J. 1989a
Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen Enchytraeen. Abschlußbericht, FE - Vorhaben 106 03 051/01. Teil B: Beschreibung der Entwicklungsarbeiten für Umweltbundesamt Berlin von Battelle Institut e. V. Abt. Toxikologie § Pharmakologie.
- Römbke, J. 1989b
Enchytraeus albidus (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a test organism in terrestrial laboratory systems. Arch. Toxicol., Suppl. 13: 402-405.
- Schöne, Chr. 1971
Über den Einfluß von Nahrung und Substratsalinität auf Verhalten, Fortpflanzung und Wasserhaushalt von *Enchytraeus albidus* Henle (*Olichogaeta*). Oecologia (Berl.) 6, 254-266.
- Springett, J. A. 1964
A method for cultering enchytraeidae. Oikos, 15;I, 175-177.
- Schulz, W. 1954
Zur Biologie von *Enchytraeus albidus* (Henle). Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 158;1, 31-78.
- Steiner, G. 1963
Das zoologische Laboratorium. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.

Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen and P.M. Sparenburg. 1989
Development of a standardized reproduction toxicitytest with earthworm species *Eisenia andrei* using Copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. *Ecotox. Environ. Safety* 18; 305-312.

Van Gestel C.A.M., Dirven-van Breemen E.M., Baerselman R. Emans H.J.B., Janssen J.A.M., Postuma R., and Van Vliet P.J.M. 1992
Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different Chemicals in standardized toxicity test using the earthworm *Eisenia andrei*.

Van Gestel C.A.M., Dirven-van Breemen E.M. and Baerselman R. 1992
Accumulation and elimination of cadmium, chromium and Zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ* submitted.

Westheide, W., Bethke-Beilfuss, D., Hagens, M., Brockmeyer, V. 1989.
Enchytraeiden als Testorganismen - Voraussetzung für ein terrestrisches Testverfahren und Testergebnisse. *Verhdlg. Ges. Ökol.* 17; 793-798.

Westheide, W. and D. Bethke-Beilfuss, 1991.
The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. *Modern Ecology. Basic and applied aspects.* Esser, G. & D. Overdieck, Elsevier Amsterdam.

Westheide, W. & Graefe, U. 1992.
Two new terrestrial Enchytraeus species (Oligochaeta, Annelida). *Journal of Natural History* 26; 479-488.

Weuffen, W. 1968
Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung. *Arch. Exp. Veterinärmed* 22, 127-132

BIJLAGE I.

Het kweken van *E. albidus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

Enchytraeën van de soort *E. albidus* worden in OECD-kunstgrond gekweekt. Om gebruikt te kunnen worden voor bodem ecotoxicologische experimenten.

1.2 Principe

Volwassen enchytraeën zetten gedurende 4 weken cocons af in een kweekmedium met havermoutpap als voedsel. Na deze periode worden de volwassen enchytraeën overgeplaatst in een volgende kweekcontainer en krijgen de cocons de gelegenheid uit te komen. Door dit telkens te herhalen wordt een zekere synchronisatie verkregen en kan continue beschikt worden over voldoende volwassen enchytraeën voor het toxiciteitsonderzoek. Vermenging van de soorten wordt vermeden door ze in verschillende klimaatkasten te incuberen.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPSTOFFEN

2.1 OECD-kunstgrond

10 % gemalen turf (Fins sphagnum nr. CO, Jongkind BV, Aalsmeer)
 20 % klei (china Clay ast, 85,9 % kaolien, Vingerling BV, Haastrecht).
 69,6 % zilverzand (M32, van Loon Vreeswijk, Nieuwegein).
 0-1 % calciumcarbonaat (chemisch zuiver, 98,5-100,5 %. Merck Nederland BV), om de pH op $6,5 \pm 1,0$ te brengen.
 Gedemineraliseerd water(demiwater), om het vochtgehalte op 55 % te brengen.

2.2 Voer

1 theelepel levertraan
 3 theelepels havermoutvlokken
 1 theelepel biergist
 1 theelepel eiwitpoeder
 melk

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

Enchytraeën van de soort *Enchytraeus albidus*. Deze moeten volwassen zijn met een duidelijk zichtbaar clitellum.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- 4.1 Kweekcontainer, poederflessen, van 1 liter, wit glas.
- 4.2 Petrischalen, van glas met een diameter van 7 cm deze worden gebruikt als deksel.
- 4.3 Mixer, plus gardes en kom.
- 4.4 Klimaatkast.
- 4.5 Minimum/maximum thermometer.
- 4.6 Kookplaatje.

5. PROCEDURE

De droge bestanddelen van de OECD-kunstgrond 2.1) worden homogeen met een mixer (4.3) door elkaar gemengd. Vervolgens wordt het demiwater toegevoegd. En het geheel wordt nochmals goed door elkaar gemengd met behulp van de mixer. Er moet een pH en een vochtgehalte monster genomen worden van het OECD-kunstgrond.

Twee kweekcontainers(4.1) worden voor 3/4 gevuld met de OECD-kunstgrond.

De ingredienten voor het voer (2.2) worden doorelkaar gemengd met net zoveel melk dat het geheel schenkbaar is en even aan de kook (4.6) gebracht. Hierna kan het eventueel ingevroren worden in afgepaste porties.

In de OECD-kunstgrond in de kweekcontainer wordt een een kuiltje gemaakt hierin wordt een kleine hoeveelheid voer gedaan.

25 volwassen enchytraeën (3) worden in de kweek container geplaatst. Plaats de glazen (4.2) deksel op de container.

De kweek wordt geïncubeerd in een klimaatkast (4.4) van 17 °C in het donker.

Maandelijks wordt de temperatuur in de kweekkast met een minimum/maximum thermometer (4.5) gecontroleerd.

Na 4 weken worden alle volwassen enchytraeën uit de kweekcontainer verwijderd en overgebracht in de volgende container. Deze volwassen enchytraeën kunnen gedurende lange tijd opnieuw gebruikt worden. Omdat het aantal in de tijd door sterfte kan afnemen is het noodzakelijk af en toe enkele nieuwe volwassen enchytraeën toe te voegen. In het achtergebleven kweekmedium bevinden zich de cocons. Deze komen na 3 weken uit en de juvenielen zijn na 6-8 weken volwassen.

Verzorg de kweek wekelijks door aan alle containers een kleine hoeveelheid havermoutpap in een kuiltje in het OECD-kunstgrond toe te voegen, de hoeveelheid moet aangepast worden aan de eet behoefte van de enchytraeën. Geef nooit te veel voer omdat dit een infectie van mijten kan veroorzaken.

BIJLAGE II.

Het kweken van *E. crypticus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

Enchytraeën van de soort *E. crypticus* worden op agar gekweekt. Om gebruikt te kunnen worden voor bodem ecotoxicologische experimenten.

1.2 Principe

Volwassen enchytraeën van de soort *E. crypticus* zetten gedurende 4 weken cocons af op een kweekmedium van veenextract agar met haveremout als voedsel. Na 4 weken wordt een volgende serie platen ingezet. Door dit telkens te herhalen wordt een zekere synchronisatie verkregen en kan continue beschikt worden over voldoende volwassen enchytraeën voor het toxiciteitsonderzoek. Vermenging van de soorten wordt vermeden door ze in verschillende klimaatkasten te incuberen.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPSATOFFEN

- 2.1 Agar NO. 3 van Oxoid.
- 2.2 Veengrond, afkomstig van Wanneperveen met een pH (KCL) van 3,6.
- 2.3 Haveremout.

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

Enchytraeën van de soort *Enchytraeus crypticus*. Deze moeten volwassen zijn met een duidelijk zichtbaar wit minder doorzichtig ei in de buik van de enchytrae.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- 4.1 Hogedrukpan.
- 4.2 Petrischalen, van glas met een diameter van 20 cm.
- 4.3 Papierenfilter.
- 4.4 Minimum en maximum thermometer.
- 4.5 Oven.
- 4.6 Klimaatkast.

5. PROCEDURE

Glazen petrischalen met een diameter van 20 cm(4.2) worden gesteriliseerd door ze 1 nacht in een oven(4.5) met een temperatuur van 200 °C te plaatsen.

Een liter veengrond(2.2) wordt gedurende een nacht geschud met 3 liter gedemineraliseerd water en vervolgens gefiltreerd over een papieren filter(4.3). Het extract wordt aangevuld met demiwater tot 2 liter.

Veenextractagar wordt bereid door 7.5 g agar no.3 van Oxoid (2.1) aan 500 ml (genoeg voor 4 platen) veenextract toe te voegen en dit 30 minuten bij 120 °C te autoclavieren in hogedrukpan (4.1).

De veenextractagar wordt in de glazen petrischalen gegoten. Als de platen afgekoeld zijn worden 25 volwassen enchytraeën (3) van de soort *E. crypticus* op deze platen geplaatst met een kleine hoeveelheid haveremoutvlokken (2.3) ± 3 vlokken per petrischaal. De haveremoutvlokken worden voor gebruik eerst geweekt in demiwater.

De enchytraeën worden in een klimaatkast (4.6) bij 17 °C en in het donker geplaatst. Controleer maandelijks de temperatuur in de kweekkast met een minimum/maximum thermometer (4.4).

Wekelijks worden alle enchytraeën op de platen gevoerd met haveremoutvlokken. Al naar gelang de behoefte van de enchytraeën, door te veel voer ontstaat er schimmeligroei op het voer. Iedere maand worden 4 nieuwe schalen met 25 volwassen *E. crypticus* ingezet. Na 2-3 maanden zijn er ruim voldoende volwassen enchytraeën beschikbaar.

BIJLAGE III.

Het extraheren van *E. albidus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

Het extraheren van enchytraeën van de soort *E. albidus* uit de OECD-kunstgrond na een bodem ecotoxicologisch experiment. Om de reproductie, in de vorm van cocons en juvenielen, vast te kunnen stellen.

1.2 Principe

Na afloop van het reproductie experiment met enchytraeën worden de juvenielen m.b.v. een stapel zeven en een douche uit de grond geextraheerd en opgevangen op een stapel zeven. De juvenielen en de cocons die op de zeven achtergebleven zijn worden in een beslagkom overgespoeld. De inhoud van de kom wordt in een potje geschonken. Na fixatie en kleuring van de juvenielen kunnen deze op ieder gewenst moment geteld worden. De cocons worden direct geteld.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPSTOFFEN

2.1 Kleurstof, Bengaalrood gemengd met formaline.

2.2 Formaline 36 %

3. APPARATUUR EN GLASWERK

3.1 Zeven met een maaswijdte van 0,5 en 45 μm .

3.2 Douche.

3.3 2 Kommen, beslagkommen van 2 liter.

3.4 Glazen pot 250 ml met deksel.

3.5 Pipetman P200.

3.6 Plastic petrischaaltjes met vakverdeling.

3.7 Binoculair.

4. PROCEDURE

Plaats de 45 μm zeef op de 0,5 mm zeef(3.1).

Schud de inhoud van de testcontainer over de zeef uit.

Spoel de grond met de douche (3.2) door de zeven zorg ervoor dat het gehele oppervlak van de bovenste zeef constant nat blijft.

De juvenielen krijgen hierdoor geen kans om door de zeef te kruipen. Het is verstandig om al tijdens het doorspoelen van de grond te zorgen dat de juvenielen en de cocons naar een punt van de zeef gespoeld worden.

Spoel de inhoud van de twee verschillende zeven met een straal water in de twee kommen (3.3).

Giet het bovenstaande water af. Laat een kleine hoeveelheid water met daarin de juvenielen en/of de cocons achter in de kommen. De inhoud van de kom van de 0,5 mm zeef, hierin bevinden zich voornamelijk cocons, wordt overgebracht in een plastic petrischaaltje (3.8). De cocons kunnen geteld worden.

Breng de inhoud van de overgebleven kom en het schaalpje met de getelde cocons (hierin bevinden zich ook juvenielen) over in een 250 ml pot (3.4).

Fixeer de enchytraeën door met een pipetman (3.5) 0,2 ml kleurstof (2.1) en 10 ml formaline 36 % (2.2) in het potje.

De enchytraeën en de cocons kunnen op ieder gewenst tijdstip geteld worden. Door de inhoud van het potje over een 38 μm zeef (3.7) te schenken verwijder je de formaline.

BIJLAGE IV.

Het extraheren van *E. crypticus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

Het extraheren van enchytraeën van de soort *E. crypticus* uit de OECD-kunstgrond na een bodem ecotoxicologisch experiment. Om de reproductie, in de vorm van juvenielen, vast te kunnen stellen.

1.2 Principe

Na afloop van het reproductie experiment met enchytraeën worden de juvenielen m.b.v. de Oostenbrinktrechter uit de grond geextraheerd en opgevangen op een stapel zeven. De juvenielen die op de zeven achtergebleven zijn worden in een beslagkom overgespoeld. De inhoud van de kom wordt over een wattenfilter gegoten en na 2 dagen zijn de juvenielen door het filter in een schaalte gekropen. De inhoud van dit schaalte wordt in een potje geschonken. Na fixatie en kleuring van de juvenielen kunnen deze op ieder gewenst moment geteld worden.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPSTOFFEN

2.1 Kleurstof Bengaalrood (10%) gemengd met formaline 36%.

3. APPARATUUR EN GLASWERK

- 3.1 Zeven met een maaswijdte van 45 μ m.
- 3.2 Oostenbrink trechter met toebehoren.
- 3.3 Plastic petrischaaltjes met vakverdeling.
- 3.4 Kom, beslagkom van 2 liter.
- 3.5 Pipetman P200.
- 3.6 Glazenpot 100 ml met deksel.
- 3.7 38 μ m zeef.
- 3.8 binoculair.

4. PROCEDURE

Vul de Oostenbrinktrechter (3.2) met water tot het eerste niveau, ter hoogte van de afvoerbuisk van de onder de topzeef geplaatste trechter. Stel de opwaartse stroomsnelheid in op 100 mm (1000 ml/minuut).

Spoel de grond in de topzeef en spoel deze m.b.v. de sproeier door, tot het tweede niveau bereikt is. Wanneer niveau twee bereikt is, draai dan de kraan van het sproeistuk dicht. Verwijder als het water het derde niveau bereikt heeft de stop uit het aftappunt en vang het water plus zwevend materiaal op met de set van 4 zeven met een maaswijdte van 45 μ m (3.1).

Spoel de inhoud van de zeven, met een zachte naar boven gerichte waterstraal over in een plastic kom (3.4).

Plaats een wattenfilter in een nematodenzeef. Klem deze vast m.b.v. een ringklem. Bevochtig de filters zodanig dat er geen lucht tussen zit. Zet het geheel in een decanteerschaaltje met kruis. Leg om stukgaan van de filters te voorkomen een horlogeglas op de wattenfilters tijdens het gieten.

Giet de inhoud van de kom over de filters.

Plaats de nematodenzeef in een extractieschaal, met 100 ml water en zet deze trillingsvrij weg.

Vul na 24 uur voorzichtig het extractieschaaltje aan met 50 ml water verwijder na totaal 48 uur de zeef.

Giet water uit het extractieschaaltje over in een potje van ongeveer 100 ml (3.6).

Fixeer de enchytraeën door met een pipetman (3.5) 0,1 ml kleurstof (2.1) en 5 ml formaline 36 % (2.2) aan het potje toe te voegen.

De enchytraeën kunnen op ieder gewenst tijdstip geteld worden. Door de inhoud van het potje over een 38 μ m zeef (3.7) te schenken verwijder je de formaline. De inhoud van de zeef wordt in een schaalte overgebracht en de enchytraeën kunnen geteld worden m.b.v. een binoculair (3.8).

BIJLAGE V.

Procedure voor een reproductietoets met *E. albidus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

Enchytraeën van de soort *E. albidus* worden in OECD-kunstgrond blootgesteld aan een chemische stof, onder geconditioneerde omstandigheden. Na deze blootstelling kan naar het effect van een chemischestof, een combinatie van chemischestoffen of andere abiotische parameters op de reproductie van enchytraeën worden gekeken. Het aantal juvenielen en het aantal geproduceerde cocons kan worden bepaald.

1.2 Principe

Volwassen enchytraeën van de soort *E. albidus* worden gedurende 4 weken op een concentratiereeks van een te testen chemische stof in OECD-kunstgrond geplaatst. Met wekelijkse toevoeging van een havermoutvlok als voedsel. Na 4 weken worden de adulten geteld en verwijderd en worden de testcontainers gedurende 5 weken geïncubeerd om vervolgens het aantal geproduceerde cocons en juvenielen te bepalen.

2. RAGENTIA, MEDIA, HULPSTOFFEN

2.1 OECD-kunstgrond:

10 % gemalen turf (Deens sphagnum nr. CO, Jongkind BV, Aalsmeer)

20 % klei (china Clay ast, 85,9 % kaolien, Vingerling BV, Haastrecht).

69,6 % zilverzand (M32, van Loon Vreeswijk, Nieuwegein).

0,0-1,0 % calciumcarbonaat (chemisch zuiver, 98,5-100,5 % Merck Nederland BV), om de pH op $7,0 \pm 0,5$ te brengen.

De turf, klei, zand en het calciumcarbonaat worden droog door elkaar gemengd. Vervolgens wordt het demiwater aan toegevoegd om de OECD-kunstgrond op een vochtgehalte van 55 % te brengen. De pF van dit medium is 2 - 2,5, dit komt overeen met de veldcapaciteit.

2.2 Havermout vlokken

3. BIOLOGISCHMATERIAAL

De voor de toxiciteit gebruikte soort is *E. albidus* en kan gekweekt worden volgens de in de Bijlage I omschreven methode. De enchytraeën moeten volwassen zijn met een duidelijk zichtbaar clitellum.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- 4.1 Testcontainers plasticpotjes van 15 ml met snapdekseltjes.
- 4.2 Analytische balans.
- 4.3 Bovenweger.
- 4.4 Mixer plus kom plus gardes.
- 4.5 Klimaatkasten.
- 4.6 Minimum/maximum thermometer.

5. PROCEDURE

Label de testcontainers(4.1) en monsterpotjes.

Maak de OECD-kunstgrond(2.1) aan. Door 10 % gemalen turf, 20 % klei, het zand en de calciumcarbonaat (om de pH op $7,0 \pm 0,5$) droog door elkaar te mengen.

Het toxiciteitsexperiment wordt per soort enchytrae in viervoud uitgevoerd. In iedere testcontainer(4.1) gaat ongeveer 7 g OECD-kunstgrond met een vochtgehalte van 55 %. De pF van dit medium is 2 - 2,5, dit komt overeen met de veldcapaciteit.

In een mixerkom(4.4) wordt een bepaalde hoeveelheid OECD-kunstgrond afgewogen (4.3) die voldoende is voor het vullen van de testcontainers, een pH monster, een vochtgehalte monster en indien nodig een monster voor analyse.

De te testen toxicant wordt indien het goed oplosbaar is in het toe te voegen demiwater opgelost en aan de droge OECD-kunstgrond toegevoegd. De OECD-kunstgrond wordt op een vochtgehalte van 55 % gebracht.

Wanneer het echter een slecht oplosbare toxicant betreft moet deze droog, of eerst gemengd met wat zand, door de OECD-kunstgrond gemengd worden en vervolgens wordt het toe te voegen demiwater door de OECD-kunstgrond gemengd.

De OECD-kunstgrond wordt over de testcontainers verdeeld m.b.v. pincet of satéstokje, waarna de enchytraeën (3) per tental willekeurig over de testcontainers verdeeld worden.

De testcontainers worden gewogen. Doormiddel van weging wordt het vochtgehalte wekelijks aangevuld met demiwater.

De testcontainers met *E. albidus* krijgen wekelijks een in water geweekte havervlok(2.2).

De testcontainers worden geïncubeerd in een klimaatkast(4.5) van 17 °C in het donker. In de klimaatkast wordt een minimum/maximum thermometer geplaatst(4.6). Het verloop van de temperatuur gedurende het experiment wordt m.b.v. een minimum en maximum thermometer gemeten en aan het eind van het experiment genoteerd.

Na 4 weken worden uit de testcontainers met de soort *E. albidus* de volwassenen gesoorterd en geteld. Deze containers worden vervolgens noch 5 weken in de klimaatkast geïncubeerd, met wekelijks 1 fijngewreven havervlok indien nodig.

Na deze 5 weken worden de geproduceerde juvenielen en de cocons uit de OECD-kunstgrond geëxtraheerd en geteld.

6. BEREKENINGEN

Het aantal juvenielen per enchytrae per week, per testcontainer en per concentratie. En de standaardafwijking.

Het aantal cocons per enchytrae per week, per testcontainer en per concentratie. En de standaardafwijking.

Het aantal juvenielen per cocon per week, per testcontainer en per concentratie. En de standaardafwijking.

De EC50 kunnen met het programma EC50.BET of hormesis in GENSTATT berekend worden.

De NOEC kan met het programma toxstatt berekend worden.

KWALITEITSCONTROLE

De sterfte van de adulten in de blanco mag na 4 weken niet meer dan 10 % per testcontainer bedragen.

BIJLAGE VI.

Procedure voor een reproductietoets met *E. crypticus*.

1. INLEIDING

1.1 Doel

De enchytraeën van de soort *E. crypticus* worden in OECD-kunstgrond blootgesteld aan een chemische stof, onder geconditioneerde omstandigheden. Na deze blootstelling kan naar het effect van een chemischestof, een combinatie van chemischestoffen of andere abiotische parameters op de reproductie van enchytraeën worden gekeken. Het aantal juvenielen per enchytrae per week wordt bepaald.

1.2 Principe

Volwassen enchytraeën van de soort *E. crypticus* worden gedurende 4 weken op een concentratiereeks van een te testen chemische stof in OECD-kunstgrond geplaatst. Met wekelijkse toevoeging van een haverhoutvlok als voedsel. Na 4 weken worden de juvenielen uit de grond geëxtraheerd om vervolgens het aantal geproduceerde juvenielen te bepalen.

2. RAGENTIA, MEDIA, HULPSTOFFEN

2.1 OECD-kunstgrond: zie Bijlage V.

2.2 Kleurstof Bengaalrood (10%) gemengd met formaldehyde (36%).

2.3 Gemalen haverhout vlokken.

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

De voor de toxiciteit gebruikte soort is *E. crypticus* en kan gekweekt worden volgens de in de bijlage omschreven methode. De enchytraeën moeten volwassen zijn met een duidelijk zichtbaar wit gekleurd ei in het lichaam.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

4.1 Testcontainers plasticpotjes van 15 ml met snapdekseltjes.

4.2 Analytische balans.

4.3 Bovenweger.

4.4 Mixer plus kom plus gardes.

4.5 Klimaatkasten.

4.6 Minimum/maximum thermometer.

5. PROCEDURE

Label de testcontainers en monsterpotjes(4.1).

Maak de OECD-kunstgrond aan. Door eerst de droge bestanddelen van de OECD-kunstgrond (2.1) goed door elkaar te mengen.

Het toxiciteitsexperiment wordt per soort enchytrae in viervoud uitgevoerd. In iedere testcontainer gaat ongeveer 7 g OECD-kunstgrond met een vochtgehalte van 55 %. De pF van dit medium is 2 - 2,5, dit komt overeen met de veldcapaciteit.

In een mixerkom (4.4) wordt een bepaalde hoeveelheid OECD-kunstgrond afgewogen (4.3) die voldoende is voor het vullen van de testcontainers, een pH monster, een vochtgehalte monster en indien nodig een monster voor analyse.

De te testen toxicant wordt indien het goed oplosbaar is in het toe te voegen demiwater opgelost en aan de droge OECD-kunstgrond toegevoegd. De OECD-kunstgrond wordt op een vochtgehalte van 55% gebracht.

Wanneer het echter een slecht oplosbare toxicant betreft moet deze droog, of eerst gemengd met wat zand, door de OECD-kunstgrond gemengd worden en vervolgens wordt het toe te voegen demiwater door de OECD-kunstgrond gemengd.

De OECD-kunstgrond wordt over de testcontainers verdeeld, waarna de enchytraeën(3) per tiental willekeurig over de testcontainers verdeeld worden. De testcontainers worden gewogen. Doormiddel van weging wordt het vochtgehalte wekelijks aangevuld met demiwater.

De testcontainers met *E. crypticus* krijgen wekelijks een mespuntje gemalen haveremout vlokken (2.4).

In de klimaatkast wordt een minimum/maximum thermometer geplaatst (4.6). Het verloop van de temperatuur gedurende het experiment wordt m.b.v. een minimum en maximum thermometer gemeten en aan het eind van het experiment genoteerd.

Na 4 weken worden uit de testcontainers met de soort *E. crypticus* de juvenielen uit de grond geextraheerd en geteld.

6. BEREKENINGEN

Het aantal juvenielen per enchytrae per week, per testcontainer en per concentratie. En de standaardafwijking. De EC50 kan met het programma EC50.BET in GENSTAT berekend worden. De NOEC kan met het programma TOXSTAT berekend worden.