

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIËNE  
BILTHOVEN

RIVM-719102029  
MW-R94/101

Validatie toxiciteitsgegevens en risicogrenzen bodem:  
voortgangsrapportage 1993.

J. Notenboom\* en L. Posthuma\* (eds.)

april 1994

\* Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Laboratorium  
voor Ecotoxicologie, postbus 1, 3720 BA Bilthoven.

Dit onderzoek is in samenwerking tussen TNO Milieuwetenschappen, Vrije Universiteit  
Amsterdam, en Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne uitgevoerd, in opdracht  
en ten laste van DGM directie Bodem.

## 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          Prof. Dr. C.J. van Leeuwen (DGM/SVS)  
11          Dr. J.H.M. de Bruijn (DGM/SVS)  
12          Dr. G.P. Hekstra (DGM/SVS)  
13          Ing. P.J.W. Blom, Min. Defensie, dienst Gebouwen, Werken, en Terreinen,  
            Directie Limburg  
14          Ir. J.E. Kammenga, Landbouwniversiteit Wageningen  
15          Depôt nederlandse publikaties en nederlandse bibliografie  
16          Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne  
17          Dr. Ir. G. de Mik  
18          Ir. F. Langeweg  
19          Prof. Dr. H. A. M. de Kruijf  
20          Dr. W. Slooff  
21          Drs. L. H. M. Kohsiek  
22          Ir. R. v.d. Berg  
23          Dr. H. Eijsackers  
24          Drs. J. H. Canton  
25          Ir. C. J. Roghair  
26          Dr. J. Struijs  
27 t/m 47   Deelnemers validatieproject  
48 t/m 49   Bibliotheek RIVM  
50          Depôt ECO/LWD  
51          Depôt ECO  
52          Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations, RIVM  
53          Bureau Projecten- en Rapportenregistratie, RIVM  
54          Archief TNO-MW  
55          Bibliotheek TNO-MW  
56 t/m 75   Reserve-exemplaren

## INHOUDSOPGAVE

Verzendlijst	ii
Inhoudsopgave	iii
Dankwoord	v
Summary	vi
Samenvatting	vii
1. Inleiding	1
2. Veldgegevens verontreinigingsgradiënt te Budel	4
3. Micro-organismen: acetaat mineralisatie en <i>Pseudomonas putida</i> toetsen (P. van Beelen & A.K. Fleuren-Kemilä)	9
4. Micro-organismen: glutaminezuur afbraak (J.W. Vonk)	13
5. Effecten van zware metalen op de groei van drie plantensoorten in Budelgrond (N. v.d. Hoeven)	16
6. Effecten van zware metalen op de worm <i>Eisenia andrei</i> in OECD-kunstgrond en Budelgrond (L. Posthuma, H. Boonman & R. Baerselman)	20
7. Effecten van zware metalen op de potwormen <i>Enchytraeus crypticus</i> en <i>E. albidus</i> in OECD-kunstgrond en Budelgrond (J. Notenboom, L. Dirven-van Breemen, A. Kalif & A.J. Folkerts)	32
8. Toetsontwikkeling met de nematode <i>Plectus acuminatus</i> in grond (A.J. Schouten, M. van Esbroek, R. Alkemade & M. Rademaker)	37
9. Arthropoden: effecten van zware metalen in kunstgrond en veldgrond, en de invloed van temperatuur en vocht (E. C. Smit & C.A.M. van Gestel)	41
10. Effecten van metalen op de samenstelling van de nematodenfauna langs een verontreinigingsgradiënt te Budel (A.J. Schouten, M. v. Esbroek, R. Alkemade & P. Kersten)	49

11.	Verslag discussie projectvergadering (28 september 1993) (E. C. Smit)	53
12.	Conclusies en aanbevelingen	57
13.	Referenties	68
Bijlage I	RIVM meetgegevens Budelgronden over 1993	70

**DANKWOORD**

Het Ministerie van Defensie, Dienst Gebouwen, Werken en Terreinen van de Directie Limburg wordt bedankt voor het verlenen van toestemming tot en de ondersteuning bij de bemonstering van gronden in de Budeler- en Weerterbergen. Tevens is dank verschuldigd aan de heren R. van Veen (RIVM-ECO) en H. Vissenberg (RIVM-LBG) en mevr. E. Smit (RIVM-LAC) voor de analytische ondersteuning t.b.v. dit project.

## SUMMARY

Progress made in 1993 of the project Validation Toxicity Data and Risk Levels for Soils (Validation project) is given. This project is executed in collaboration by the TNO Institute of Environmental Sciences; Free University Amsterdam, Department of Ecology and Ecotoxicology; and RIVM, Laboratory of Ecotoxicology, by order of the Dutch Ministry of Housing, Physical Planning, and Environment, Directorate of Soils. In 1993 bioassays with several organisms (bacteria, plants, arthropods, oligochaetes) have been performed in metal (viz., zinc and cadmium) contaminated soils originating from the neighbourhood of a zinc smelter works at Budel. Results are compared with those of experiments performed with the same organisms in standardized (artificial) soils spiked with metals. Moreover, abundance and diversity of nematoda along a gradient of contaminated soils near Budel is studied. A start has been made with the organization of an experimental field, above all for the study of abiotic factors influencing the sensitivity of soil organisms.

All researchers involved in this project contributed to this report. The report gives a general enumeration of results obtained, additionally an evaluation and integration of results is pursued and a strategy is designed for the next phase of the project. Full report of the different research results will be provided in future by the responsible scientists in separate reports or publications.

Some general conclusions are that for some organisms dose related effects could be established in pH adjusted Budel soils and compared with effects determined in (artificial) soils. For some species (oligochaetes, red clover) dose-effect relationships obtained in OECD artificial soils and in modified (homogenized, pH adjusted) Budel soils differed a factor 0 to 4. An important part of the differences between direct effects in laboratory and field is probably related to the interaction between metals in combination, deviation in biological availability, or both. In the context of this project, exposure in different situations is made comparable preferably by relating effects to internal concentrations. Field observations on nematoda clearly demonstrated that through the variation in natural factors (viz., pH) a direct relationship between toxic metal concentration and composition and abundance of nematoda is hard to establish.

## SAMENVATTING

Dit rapport geeft een overzicht van de voortgang in 1993 van het project Validatie Toxiciteitsgegevens en Risicogrenzen Bodem (Validatie-project) dat door TNO-MW; VU, vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie en RIVM, Laboratorium voor Ecotoxicologie wordt uitgevoerd. In 1993 zijn met verschillende organismen (bacteriën, planten, arthropoden, wormachtigen) laboratorium bioassays uitgevoerd in gronden uit de omgeving van Budel die met metalen (m.n. zink en cadmium) zijn belast. De resultaten hiervan zijn vergeleken met die van experimenten uitgevoerd met dezelfde organismen in standaard (kunst)grond waaraan metalen zijn toegevoegd. Daarnaast is de dichtheid en samenstelling van de nematodenfauna langs een vervuilingsgradiënt nabij Budel bestudeerd. Aanzetten zijn gemaakt voor de inrichting van een proefveld waarmee met name de invloed van abiotische factoren op de gevoeligheid van organismen kan worden bestudeerd.

Aan dit rapport hebben alle betrokken onderzoekers bijgedragen. Het rapport geeft een overzicht van de verkregen resultaten van de verschillende deelonderzoeken, daarnaast is aandacht geschonken aan de evaluatie en integratie van resultaten en aan invulling van de vervolgfase van het project. Volledige rapportage van de resultaten van de deelonderzoeken zal in de nabije toekomst door de verschillende onderzoekers in aparte rapporten of publicaties worden verzorgd.

Enkele algemene conclusies zijn dat mits de pH in de Budelgronden onderling vergelijkbaar wordt gemaakt, het voor een aantal toetsorganismen mogelijk is dosis gerelateerde effecten in Budelgronden vast te stellen, en deze te vergelijken met effecten bepaald in (kunst)grond. Voor enkele soorten (wormachtigen, rode klaver) bleken dosis-effectrelaties bepaald in OECD-kunstgrond en in de gemodificeerde (gehomogeniseerd, pH gesteld) Budelgrond een factor 0 - 4 te verschillen. Een belangrijk deel van het verschil in directe effecten tussen lab. en veld is waarschijnlijk zijn toe te schrijven aan combinatie-effecten, verschillen in biologische beschikbaarheid, of een combinatie van beide. Om de mate van blootstelling in verschillende situaties zo goed mogelijk met elkaar te kunnen vergelijken, wordt in het kader van dit onderzoek aanbevolen deze uit te drukken in interne concentratie. Veldwaarnemingen aan nematoden laten duidelijk zien dat door de variabiliteit in natuurlijke bodemfactoren een directe relatie tussen dichtheid en samenstelling van de nematoden, en de gehalten aan toxische metalen moeilijk te leggen is.

## 1. INLEIDING

Het project Validatie Toxiciteitsgegevens en Risicogrenzen Bodem, kortweg Validatie-project, is een samenwerkingsproject tussen het RIVM, TNO en de VU in opdracht van DGM, directie Bodem. Het project is in 1992 gestart mede naar aanleiding van vragen over bodemnormstelling waarmee DGM steeds weer geconfronteerd wordt en die de essentie raken van de gehanteerde ecotoxicologische extrapolatiemethode: treden in veld en laboratorium bij dezelfde concentraties van een stof vergelijkbare effecten op; biedt het Maximaal Toelaatbaar Risico (MTR) inderdaad bescherming aan 95% van de soorten; biedt de C-waarde bescherming aan 50% van de soorten?

Vooraf vanwege de breedte van de vraagstelling is in 1992 een workshop gehouden over de wijze waarop de wetenschappelijke validatie van risicogrenzen voor de bodem zou kunnen worden uitgevoerd en geprioriteerd (Notenboom & Van Beelen, 1992). Hierbij kwam naar voren dat validatie nodig zou zijn van: (1) representativiteit van onder laboratorium-omstandigheden bepaalde toxiciteitsgegevens voor de veldsituatie; (2) representativiteit van m.b.v. extrapolatiemodellen geschatte risicogrenzen; en (3) consequenties voor ecosystemen van overschrijding van de NOEC voor een bepaald percentage soorten. Validatie van deze aspecten moet uiteindelijk leiden tot een verdere onderbouwing van de milieukwaliteitsdoelstellingen, gebaseerd op risicogrenzen. Mede n.a.v. de workshop is besloten het Validatieproject in eerste instantie te richten op de eerste vraag. Centraal hierbij staat dus de vraag: *"reageert een soort in het veld hetzelfde als in het laboratorium bij eenzelfde mate van belasting met een toxische stof?"*. Er zullen ongetwijfeld verschillen zijn. Daarom hoort het vinden van verklaringen voor dergelijke verschillen nadrukkelijk tot de doelstelling. Dit kan mogelijk leiden tot correctiefactoren voor de vertaling van laboratoriumtoetsen naar veldsituaties.

In 1993 is op de drie betrokken instituten het experimentele onderzoek naar de vergelijking tussen veld en laboratorium gestart. Vanwege hun persistentie, relatief makkelijke analyseerbaarheid en de beschikbaarheid van relatief veel laboratorium toxiciteitsgegevens zijn zware metalen geselecteerd als stofgroep waarmee binnen het project gewerkt wordt. Als veldlocatie is Budel gekozen, omdat daar sprake is van een duidelijke vervuiling gradiënt met slechts enkele stoffen (m.n. zink en cadmium). Lab.-veldvergelijkingen worden uitgevoerd met verschillende bodemorganismen, behorende tot verschillende taxonomische en functionele groepen, en waarvoor min of meer gestandaardiseerde laboratoriumtoetsen beschikbaar zijn.



De in de eerste fase van het Validatieproject gestelde onderzoeksvragen zijn gerelateerd aan de vraag of een soort in het veld hetzelfde reageert als in het laboratorium bij een zelfde mate van belasting. Hierin zijn twee aspecten te onderscheiden: (1) is er tussen lab. en veld bij vergelijkbare concentraties ook sprake van een vergelijkbare feitelijke blootstelling, en (2) als de feitelijke blootstelling hetzelfde is, reageren soorten onder lab.- en veldcondities dan op dezelfde manier?

Om met name de eerste van deze twee vragen te kunnen beantwoorden is in eerste instantie een aanpak gekozen waarbij gronden met verschillende mate van metaal-belasting uit Budel naar het laboratorium zijn gehaald (zie Hfst. 3). Hiermee zijn bioassays uitgevoerd met de geselecteerde organismen onder min of meer gestandaardiseerde omstandigheden. De resultaten zijn onderling en met die van standaard (kunst)grond zijn vergeleken (Hfst. 4-9). De vraagstelling raakt de biologische beschikbaarheidsproblematiek, een centraal en complex thema in de ecotoxicologie. Het gaat er hierbij om te bepalen hoe groot de mate van verschil is tussen de gemeten totaalgehalten en de feitelijke blootstelling, en hoe de feitelijke blootstelling kan worden bepaald om vergelijking tussen verschillende situaties mogelijk te maken. Duidelijk is de noodzaak voor samenwerking met projecten gericht op de biologische beschikbaarheid van verontreinigende stoffen, m.n. metalen, in de bodem. Daarnaast is het van belang inzicht te verkrijgen in andere factoren die de gevoeligheid van organismen kunnen beïnvloeden. Daarom zijn, naast bioassays in verontreinigde grond, laboratoriumexperimenten gestart om te kijken in hoeverre temperatuur- en vochtverschillen de gevoeligheid van laboratoriumorganismen beïnvloeden (Hfst. 9).

Verschillen tussen gemeten totaalgehalten en de feitelijke blootstelling kunnen worden onderzocht door dosis-effectrelaties in Budel en standaard (kunst)grond niet alleen te relateren aan het totaalgehalte van de metalen, maar ook aan extraheerbare gehalten, poriewaterconcentraties, en zo mogelijk interne concentraties in de toetsorganismen.

Mede voor de beantwoording van de vraag of soorten in het lab. en veld op dezelfde manier reageren bij vergelijkbare blootstelling is gekozen voor een mesocosmos benadering, door de opzet van een proefveld. In de loop van het jaar heeft gedachtenvorming over precieze aanpak van het proefveldonderzoek plaatsgevonden, zie verder Hfst. 12.

De hierboven geschetste aanpak beperkt zich tot een strikte vergelijking tussen lab. en veld op organismeniveau en heeft betrekking op slechts één onderdeel van de bredere validatievraag. Een aanzet tot studie naar de consequenties voor ecosystemen van overschrijding van risicogrenzen is gemaakt door een analyse te maken van de nematodensamenstelling langs de

vervuilingsgradiënt te Budel (Hfst. 10).

In dit rapport wordt verslag gedaan van de voortgang van het project in 1993. De aanpak wordt toegelicht en de resultaten van de verschillende uitgevoerde onderzoeken beknopt weergegeven. De resultaten geven aanleiding tot het trekken van voorlopige conclusies en vormen de basis voor discussie over verdere invulling van het project. Een aanzet wordt gegeven voor een plan van aanpak voor experimentele invulling van de volgende fase van het project.

## 2. VELDGEGEVENS VERONTREINIGINGSGRADIËNT TE BUDEL

L. Posthuma & J. Notenboom

RIVM, Laboratorium voor Ecotoxicologie

### *Keuze van de veldlokatie*

Budel is als veldlokatie gekozen, omdat dit de enige plek in Nederland is met de combinatie van de volgende voor het validatie-onderzoek gewenste eigenschappen:

- 1) De bodem is over een groot gebied met min of meer vergelijkbare bodemkarakteristieken verontreinigd, d.w.z. dat bij herhaalde bemonstering (indien noodzakelijk) min of meer vergelijkbare resultaten verwacht worden.
- 2) De verontreiniging is "oud" en waarschijnlijk (binnen de tijdsduur van het onderzoek) in (thermodynamisch) evenwicht.
- 3) De vervuiling bestaat uit een (relatief) laag aantal, niet afbreekbare stoffen, die bovendien goed meetbaar zijn (metalen).
- 4) Benedenwinds (in de dominante windrichting) ligt een vrijwel aaneengesloten bosgebied, de Budeler- en Weerterbergen, dat slechts doorsneden wordt door de autoweg Eindhoven-Weert. Momenteel is een groot gedeelte van dit gebied in beheer bij één gebruiker (Ministerie van Defensie).

Andere vervuilde lokaties zijn niet geschikt voor het validatie-onderzoek, omdat ze slechter of moeilijker meetbare toxicanten bevatten (o.a. PAKs), te klein zijn, belast met complexere mengsels van vervuilingen, "jong" en/of bewerkt zijn, of ontoegankelijk zijn.

### *Achtergronden*

De omgeving van Budel-Dorplein in de Brabantse Kempen is verontreinigd door de aanwezigheid van een zinksmelter van de firma Budelco, en door een aantal zinksmelters ten zuiden van de Belgische grens. De Nederlandse smelter was voormalig eigendom van de Kempensche Zinkmaatschappij. In de Belgische Kempen bevinden zich nog enkele smelters met een van oudsher vergelijkbaar smeltprocédé, te weten in Overpelt, Neerpelt en Lommel (Bosmans en Paenhuys, 1980). De smelter te Budel-Dorplein is in 1892 begonnen met smelt-activiteiten (Lemmens & Roos, 1983). In 1973 werd overgegaan op een elektrolytisch procédé, waardoor de

emissie van metalen aanzienlijk afgenomen is. De metaal-emissie is echter niet tot nul gereduceerd. In 1989 bedroeg de jaarproductie ca. 200.000 ton zink en 600 ton cadmium (Budelco, 1989).

Tabel 2.1 In de literatuur aangetroffen metaalgehaltenes (mg/kg) in de bodem in de omgeving van Budel.  
Tussen haakjes de referentiewaarden voor een standaardbodem volgens de Leidraad Bodemsanering

Cd (0,8)	Zn (140)	Pb (85)	Cu (36)	referentie
5,06	948	311	44,5	Posthuma (1990)
2,9-26,5	203	145-1327		Edelman <i>et al.</i> (1985) en Lemmens & Roos (1983)

De smeltactiviteiten hebben geleid tot verhoogde concentraties van diverse metalen in de bodem in de omgeving. Ondanks de aanwezigheid van de andere smelters is voor de omgeving van Budel-Dorplein de Kempensche zinkmaatschappij/Budelco als belangrijkste oorzaak aan te wijzen. Tabel 2.1 geeft een overzicht van de metaalgehaltenes in de omgeving van Budelco die in de literatuur zijn aangetroffen. De meetresultaten die in de tabel zijn samengevat hebben betrekking op verschillende (deels niet gedefinieerde) lokaties en bodemhorizonten in de omgeving van Budel, waardoor ze niet direct te relateren zijn aan de in het kader van het Validatieproject gemeten gehaltenes. Duidelijk is wel, dat de concentraties van cadmium, zink, koper en lood de referentie-waarden voor standaardbodem, volgens de Nederlandse richtlijnen, lokaal kunnen overschrijden (Tabel 2.1). De overschrijding is in de omgeving van de smelter van zodanige omvang, dat er metaaltolerante ecotypen van *Agrostis tenuis* en *Moelinia caerulea* voorkomen (Dueck *et al.* 1984), terwijl er ook sterke aanwijzingen zijn dat er metaaltolerante bodemdieren voorkomen, te weten pissebedden en springstaarten (Donker & Bogert, 1991; Posthuma *et al.*, 1992).

### *Experimentele overwegingen*

De in Budel aanwezige combinatie van eigenschappen maakt het mogelijk om verschillende bemonsteringsstrategieën toe te passen, ook indien dit herhaaldelijk nodig is t.b.v. experimenteel onderzoek. Strategieën kunnen o.a. zijn de bemonstering van een volledige gradiënt, of bemonstering van de "uiteinden" van de aanwezige gradiënt, waarbij door menging in het laboratorium een reeks van verschillende metaalconcentraties verkregen wordt.

In het laboratorium is het gebruikelijk om dosis-effectrelaties te analyseren door de bepaling van

de ecologische prestatie (bijvoorbeeld reproductie) van een organisme bij verschillende blootstellingsconcentraties, in een logaritmisch oplopende concentratiereeks. Middels een kleine range-findingtoets wordt vastgesteld bij welke concentratie van de toxicant de prestatie (vrijwel) 100 procent geremd is. De uiteindelijke toets wordt dan gewoonlijk uitgevoerd met tenminste 6 verschillende concentraties, inclusief een controle, waarbij de hoogste concentratie zodanig gekozen wordt dat deze ernstige remming veroorzaakt. De aanpak van de bemonstering in Budel was analoog aan deze benadering: eerst werd een voorbemonstering uitgevoerd om de kwaliteit van de bodem als kweekmedium voor de te toetsen organismen te bestuderen en om de mate van effect bij de hoogst aangetroffen metaalconcentraties te schatten. Aan de hand van de ervaringen uit het vooronderzoek is een definitieve monstering van bodemmateriaal uitgevoerd (gradiëntbemonstering), waarbij ook de tussenliggende lokaties werden bemonsterd om een volledig beeld te krijgen van de toxische effecten die optreden in Budelgrond met verschillende mate van vervuiling. Het aantal monsterpunten is hoog (11) in vergelijking met een standaard toets (6), omdat aangenomen wordt dat verschillende niet- of matig verontreinigde gronden tot sterke variaties van de prestatie van toetssoorten kunnen leiden.

### *Vooronderzoek*

Het vooronderzoek is gestart met een oriënterende bemonstering op 15 december 1992. Grond werd gemonsterd op drie lokaties, te weten:

- (1) Lokatie "vuil" (kaartcoördinaten 361.25-169.4): dit is een lokatie die tegen het fabrieksterrein aanligt, en nog enigszins begroeid is. De lokatie is "bewerkt" (opgehoogd), hetgeen te herkennen is aan de rijen boompjes (waarvan de stammen tot een diepte van ca. 1 meter in de bodem staan), de serie evenwijdige greppels, en de aanwezigheid van glasresten en verfblikken, e.d.. Op deze lokatie zijn op vier plekken deelmonsters genomen, die op lokatie gemengd zijn. Verwacht werd dat de grond op deze lokatie zwaar vervuild zou zijn.
- (2) Lokatie "pomp" (kaartcoördinaten 361.75-169.2): dit is de dichtstbijzijnde lokatie bij de fabriek die begroeid is met enkele oude dennebomen. Er is een podzol-bodemprofiel aanwezig. De lokatie is genoemd naar een vermoedelijke grondwater interceptieput in de directe nabijheid, met de code "Diepwell 8". Op deze lokatie werd slechts een kleine hoeveelheid grond verzameld.

- (3) Lokatie "schoon" (kaartcoördinaten 371.35-173.4). Deze lokatie ligt op ca. 15 km afstand van de fabriek, benedenwinds in de dominante windrichting; verwacht werd dat deze lokatie metaalconcentraties zou bevatten die in slechts geringe mate de nederlandse achtergrondgehalten overschrijden. Op deze lokatie werden 13 deelmonsters genomen, die ter plekke gemengd zijn.

In alle gevallen werden strooisel en humus verwijderd, en werd de bovenste 10 cm van het moedermateriaal verzameld.

De grond van de voorbemonstering is door de projectdeelnemers gebruikt om de volgende vragen te beantwoorden/bepalingen te doen:

- 1) Is de grond zonder additieven geschikt om de toetsorganismen te kweken, waarbij de te meten toxicologische parameter (overleving, groei, reproductie) bepaald kan worden, en zo nee, welke additieven zijn bij dit grondtype (arme zandgrond) noodzakelijk? Hierbij was het streven naar een minimale additie, dit om onderlinge vergelijking tussen soorten mogelijk te maken.
- 2) Verschilt de gemeten toxicologische parameter na blootstelling aan "schoon", "pomp" en "vuil", en zo ja, komt dit verschil overeen met op basis van literatuurwaarden verwachte prestatieverandering door de metaalgehalten die in "pomp" en "vuil" aanwezig zijn?
- 3) Wat zijn de metaalgehalten in de verschillende grondtypen, en zijn deze gehalten in vergelijking met bekende dosis-effectrelaties voor de verschillende organismen hoog genoeg om eventuele effecten te induceren?

Bijlage I geeft een samenvatting van de meetgegevens van de gronden bemonsterd in Budel.

Naar aanleiding van de resultaten van het vooronderzoek luidde de samenvattende conclusie, dat voor de meeste organismen overleving, groei en/of reproductie in de Budelgrond voldoende is; bij diverse soorten moest de pH gecorrigeerd worden tot het niveau dat voor deze soorten gebruikelijk is in standaard toetsen. Vanwege het gering aantal bemonsterde gronden kon de regelmatig waargenomen prestatievermindering in met name "pomp"-grond nog niet direct toegeschreven worden aan de invloed van de aanwezige metaalgehalten.

### *Gradiëntbemonstering*

Op basis van de waarnemingen uit het vooronderzoek werd een tweede grondbemonstering uitgevoerd. Hierbij werd gestreefd naar het verzamelen van gronden uit het nagenoeg

aaneengesloten bosgebied langs een gradiënt met vergelijkbare bodemkarakteristieken, vanaf de meest belaste lokatie (nr. 2), via een logaritmisch oplopende afstandsreeks, naar een schone lokatie (nr. 11) op ca. 20 km afstand. Ondanks de sterk afwijkende bodemkarakteristiek van lokatie 1 werd deze nogmaals bemonsterd. Door de aanwezigheid van afgesloten terreindelen, wegen, en zandverstuivingen bleek het niet mogelijk om volledig volgens het vastgestelde stramien te monstern. Dit resulteerde in de bemonstering van 11 lokaties, op verschillende afstanden van de smelter, waarbij per lokatie 5 tot 8 verschillende deelmonsters werden genomen. Hierdoor is het niet mogelijk om kaartcoördinaten te geven voor elk van de lokaties. Bij toenemende afstand werden de onderlinge afstanden van de deelmonsterpunten (min of meer liggend op de cirkelomtrek met als centrum de smelter) navenant groter. Dit laatste werd gedaan om de invloeden van toevallige milieu-extremen (bijv. pH), die niet gerelateerd zijn aan de metaalgehalten, te minimaliseren. Monsterpunt 1 komt vrijwel overeen met monsterpunt "vuil" uit het vooronderzoek. De overige monsterpunten zijn niet meegenomen in het vooronderzoek. De gehanteerde techniek was overeenkomstig de voormonstering, te weten de bovenste 10 cm van het moedermateriaal.

Na verzamelen zijn de gronden gedurende 2 weken in een dunne laag (ca. 3 cm) gedroogd op landbouwplastic (temp.: ca. 17 °C, R.H. ca. 60 %). Om de dag is de grond gekeerd, totdat een vochtgehalte van tussen 0,8 en 1,8 % bereikt was. Per monster werd de grond vervolgens gehomogeniseerd in een betonmolen, waarna grove delen verwijderd werden m.b.v. een 4 mm zeef. Daarna zijn alle monsters herbevochtigd tot 2 %, weer gehomogeniseerd, en opgeslagen bij ca 13 °C, R.H. ca. 90 %, tot gebruik.

Aan de aldus behandelde grond zijn diverse metingen verricht (Bijlage I). Zoals te verwachten nemen de totaalgehalten en extraheerbare gehalten van Cd, Cu, Pb en Zn trendmatig af naarmate de afstand tot de fabriek toeneemt, voor Cr en Fe gaat dit niet op. De hoogste metaalgehalten zijn aangetroffen in punt 2. Extraheerbare en totaalgehalten zijn in het algemeen in hoge mate gecorreleerd, alleen voor Pb en Fe is dit niet het geval.

Verder valt op dat de pH (H<sub>2</sub>O) tussen de Budelgronden aanzienlijk kan verschillen, tot bijna 2 eenheden, waarbij de pH dicht bij de fabriek hoger is dan verder van de fabriek. De gehalten NO<sub>3</sub> en NH<sub>4</sub>, en het % koolstof nemen trendmatig heel licht toe met toenemende afstand tot de fabriek.

### 3. MICRO-ORGANISMEN: ACETAAT MINERALISATIE EN *PSEUDOMONAS PUTIDA* TOETSEN

P. van Beelen en A.K. Fleuren-Kemilä  
RIVM, Laboratorium voor Ecotoxicologie

#### *Doelstelling en aanpak*

Doel van de hier beschreven experimenten was om met verschillende technieken het effect van vervuilde Budelgrond op micro-organismen te meten en dit te vergelijken, voor zover mogelijk, met resultaten van toxiciteitsexperimenten uitgevoerd in OECD-kunstgrond en water. Twee methoden zijn gebruikt: de acetaat mineralisatietoets en een microbiële semi-single-species toets.

Met de acetaat mineralisatietoets (Van Beelen & Fleuren-Kemilä, 1993) wordt de activiteit van de autochtone microflora in monsters uit de vervuilingsgradiënt van Budel bepaald. In deze aanpak wordt naar de totale activiteit van een groot aantal verschillende soorten micro-organismen gekeken. Het nadeel van de toets is dat ieder bodemmonster zijn eigen micro-flora heeft die aan de omstandigheden ter plekke is aangepast. Een vergelijking met andere toetsen die gebaseerd zijn op een enkel toetsorganisme (plant of dier) dat in de regel niet aangepast is, wordt daardoor bemoeilijkt.

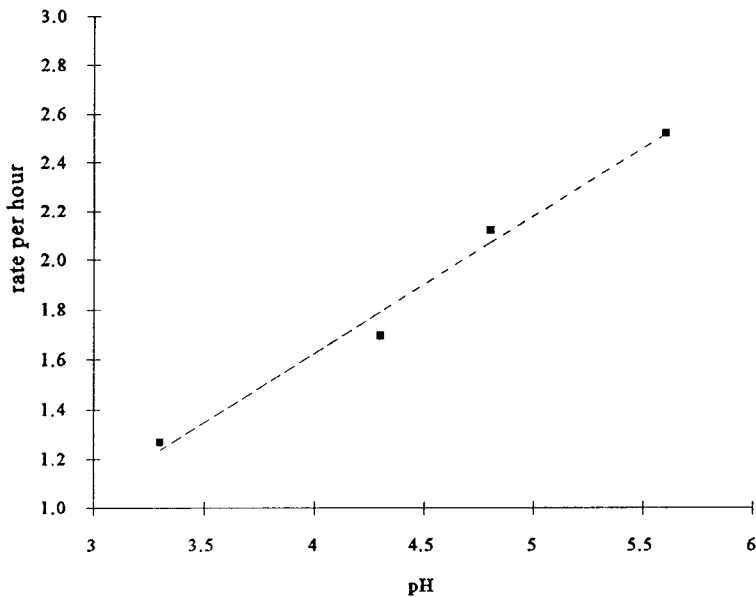
Daarom is in analogie met de klassieke single-species toets een experiment uitgevoerd met een herkenbare bodembacterie, namelijk *Pseudomonas putida*. In deze microbiële semi-single-species toets wordt gekeken naar de overleving van toegevoegde bacteriën in verschillende gronden langs de vervuilingsgradiënt te Budel. De gekozen methodiek is vergelijkbaar met die van dierproeven. Bacteriën ( $1,5 \times 10^6$ ) worden toegevoegd aan 10 g grond. Na incubatie met metaal wordt het aantal overlevende bacteriën bepaald. Dit gebeurt door het tellen van colony forming units (CFU's) op een agarplaat met selectief medium, waarin uitsluitend de gebruikte rifampicine resistente stam *Pseudomonas putida* MT-2 R62 overleeft. Eveneens is een vergelijking gemaakt tussen toetsen uitgevoerd in OECD-kunstgrond en gebufferd water.

#### *Resultaten*

##### Acetaat mineralisatietoets

Wanneer de snelheid van de acetaat mineralisatie door de autochtone microflora wordt uitgezet





Figuur 3.1 Effect van de pH op de acetaat mineralisatie in een zandige bodem (uit: Van Beelen *et al.*, in druk).

tegen de pH van de bodemonsters uit de vervuilingsgradiënt, dan blijkt dat een lage pH de activiteit van de microflora sterk remt. Dat de acetaat mineralisatie in zure bodems langzamer verloopt was al eerder gevonden (Figuur 3.1). Het meest vervuilde monster met  $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$  5,7 en zinkgehalte 313 mg/kg bleek het meest actief. Blijkbaar wordt een eventueel effect van zink volkomen overschaduwd door de remming veroorzaakt door de zuurgraad van de bodem.

#### *Pseudomonas putida* toetsen

Vergelijking van de resultaten verkregen in OECD-kunstgrond met die in water gebeurt door omrekening met de Freundlich sorptie isotherm:

$$C_{\text{grond}} = K_f * C_{\text{water}}^{(1/n)}$$

waarbij:

$C_{\text{grond}}$  = concentratie in de bodem in mg/kg

- $C_{\text{water}}$  = evenwichtsconcentratie in het bodemvocht in mg/l  
 $K_f$  = Freundlich adsorptiecoëfficiënt (sterk afhankelijk van kleigehalte, organisch stofgehalte, metaaloxidegehalte en pH)  
 $1/n$  = constante (gerelateerd aan de mate waarin de adsorptie afhangt van de concentratie)

In OECD-kunstgrond met pH 5,2 geldt voor zink:  $K_f=224$  en  $1/n=0,4$ . Wanneer meer kalk wordt toegevoegd wordt de pH 7,3 de  $K_f=441$  en  $1/n=0,57$ . Dus bij een hogere pH treedt er meer sorptie van de metaalionen op. Met behulp van deze formules kan men de  $EC_{50}$  uitgedrukt in mg Zn/kg omrekenen naar een  $EC_{50}$  in mg/l bodemwater. Zodoende kan een vergelijking worden gemaakt met de resultaten van experimenten waarbij *Pseudomonas putida* in water is getest. Toetsen in water zijn gebufferd met de positief geladen buffer Tris, die geen interactie heeft met het eveneens positief geladen  $Zn^{2+}$  ion. Tabel 3.1 laat de effecten van zink op *Pseudomonas putida* zien in OECD-kunstgrond en in Tris-buffer.

Tabel 3.1 Het effect van zink op de overleving van *Pseudomonas putida* MT-2 R62 in OECD-kunstgrond en in Tris-buffer.

Tijd	pH <sub>(grond)</sub>	$C_{\text{grond}}$ mg Zn/kg		$C_{\text{water}}$ berekend uit $C_{\text{grond}}$ mg/l		Tris-buffer mg Zn/l*	
		$EC_{50}$	$EC_{10}$	$EC_{50}$	$EC_{10}$	$IC_{50}$	$IC_{10}$
2 uur	5.3	1036	90	47	0.1	15	3.5
1 dag	5.2	1755	581	177	11	19	4.4
1 week	5.0	2904	1994	628	2.4	25	6.1
2 uur	7.2	1334	673	7	2.1	0.7	0.2
1 dag	7.3	824	360	3	0.7	0.6	0.1
1 week	7.2	1222	596	6	1.7	0.7	0.2

\* Resultaten experimenten in Tris-buffer herberekend naar pH-waarden vergelijkbaar met die van de kunstgrond.

De kolom  $C_{\text{gronc}}$  laat zien dat zink in zure grond een vergelijkbare toxiciteit voor *Pseudomonas putida* bezit als in neutrale grond. In Tris-buffer is zink bij lage pH echter veel minder giftig dan bij neutrale pH. Er lijken dus twee tegenovergestelde krachten aan het werk. Bij hoge pH is er meer zink aan de bodem geadsorbeerd en is er dus minder in de waterfase aanwezig. Deze lagere concentratie zink is echter veel toxischer waardoor de totale  $EC_{50}$  in de bodem toch iets lager uitkomt.

De resultaten van een overlevingsexperiment met *Pseudomonas putida* in drie grondmonsters langs de vervuiling gradiënt te Budel staan in Tabel 3.2. Het is duidelijk dat het meest zure monster met de laagste pH de grootste sterfte te zien geeft. Op grond van de hoge EC<sub>10</sub> waarden in Tabel 3.1 is geen direct effect van 337 mg Zn/kg uit de meest vervuilde bodem te verwachten. De sterfte in het schone monster zou veroorzaakt kunnen worden door de lage pH. De terugvangst van 666% na 1 week wordt verklaard door groei.

Tabel 3.2 De invloed van de pH en extraheerbaar zinkgehalte op de overleving van *Pseudomonas putida* in Budel "schoon", "pomp" en "vuil" (a en b zijn replica's).

	Zn mg/kg	pH	% CFU 's teruggevonden			
			1 dag		1 week	
			(a)	(b)	(a)	(b)
"schoon"	5.6	3.9	20	93	0	7
"pomp"	164	4.7	27	33	113	666
"vuil"	338	4.7	127	133	87	127

### Conclusies en aanbevelingen

De gemeten zinkgehaltenes tot 300 mg/kg in Budel zijn te laag om duidelijke directe effecten op de onderzochte micro-organismen te veroorzaken. De pH van de bodem in Budel heeft wel een direct effect op micro-organismen. Ver van de fabriek is de bodem weliswaar schoon maar ook zuurder en zijn zowel de acetaat mineralisatie als de overleving van *Pseudomonas putida* duidelijk gereduceerd. Bij een lage pH is er weliswaar een kleiner percentage van het totale zink in het poriewater aanwezig, maar het toxisch effect van deze lage concentratie is verhoudingsgewijs groot. Bij een verhoging van de pH van een bodem neemt het toxische effect van het aanwezige zink op de micro-organismen niet vanzelfsprekenderwijs af.

#### 4. MICRO-ORGANISMEN: GLUTAMINEZUUR AFBRAAK

J.W.. Vonk

TNO Milieuwetenschappen

##### *Doelstelling en aanpak*

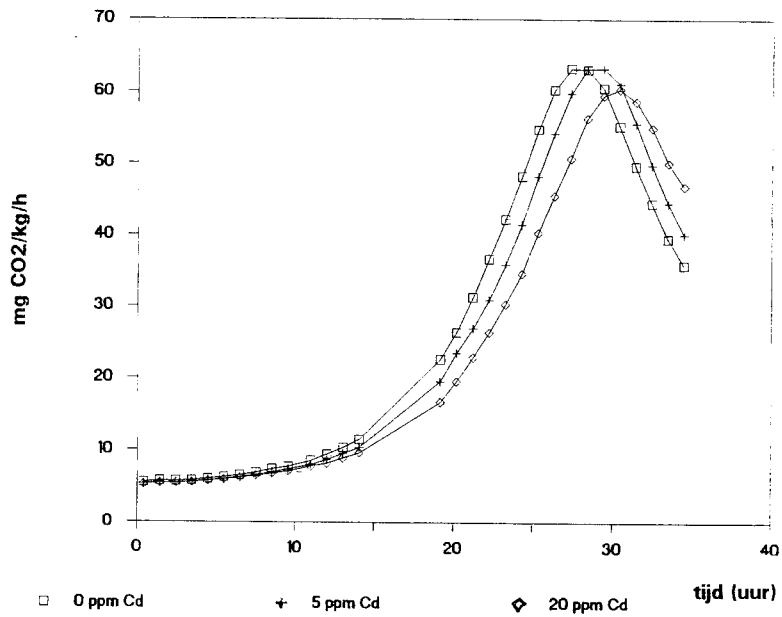
In het vorige hoofdstuk werd onder andere verslag gedaan van onderzoek naar de toxiciteit voor één bacteriesoort van zware metalen aanwezig in grond langs de vervuiling gradiënt te Budel. Aangezien vele soorten micro-organismen voorkomen in grond is het eveneens wenselijk ook een microbiële parameter te bestuderen met een bredere reikwijdte. De keuze valt dan op een microbiële bodemproces. Aangezien de meeste micro-organismen betrokken zijn bij het mineralisatieproces werd dit als toetscriterium gekozen. Andere processen, zoals nitrificatie, zijn in de onderhavige bodems met lage pH niet goed te bestuderen, omdat deze processen te langzaam verlopen.

Als toetsparameter is hier de mineralisatie van glutaminezuur gekozen. Het principe van deze toets is door Haanstra & Doelman (1984) ontwikkeld en door TNO-MW verder uitgewerkt (Vonk & Matla, 1993). Door het toevoegen van natriumglutamaat aan grond en het meten van de daarna optredende CO<sub>2</sub> ontwikkeling als functie van de tijd kan de respons van de aanwezige bodemmicro-organismen worden vastgesteld. Deze respons verandert indien toxische stoffen in de bodem aanwezig zijn. Dit manifesteert zich door een vertraging in de glutamaat-verademing.

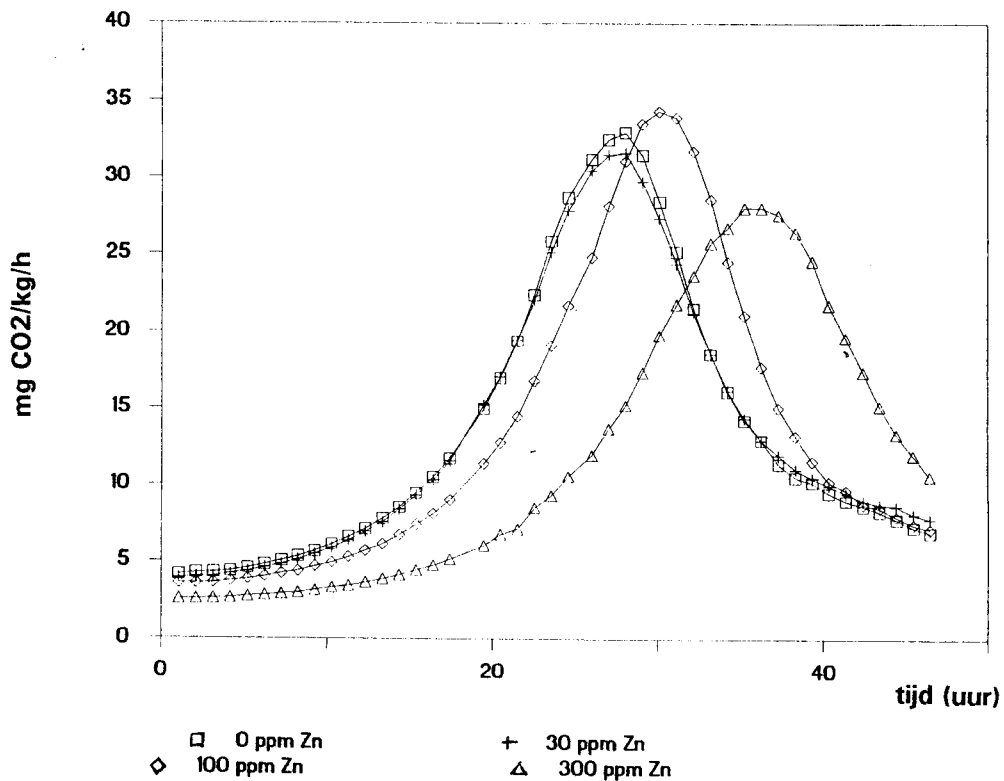
##### *Resultaten*

De toxiciteit van cadmium(chloride) en zink(chloride) is onderzocht in een humeuze zandgrond pH 5,5, org. stof 4%. Van deze grond is bekend dat de aanwezige micro-organismen glutamaat goed kunnen mineraliseren. De resultaten worden weergegeven in Figuren 4.1 en 4.2. De NOEC voor cadmium in deze grond bedraagt 10-20 mg Cd/kg en de NOEC voor zink is 100 mg Zn/kg. De verschillen tussen 5 mg Cd/kg en de blanco bleken niet significant.

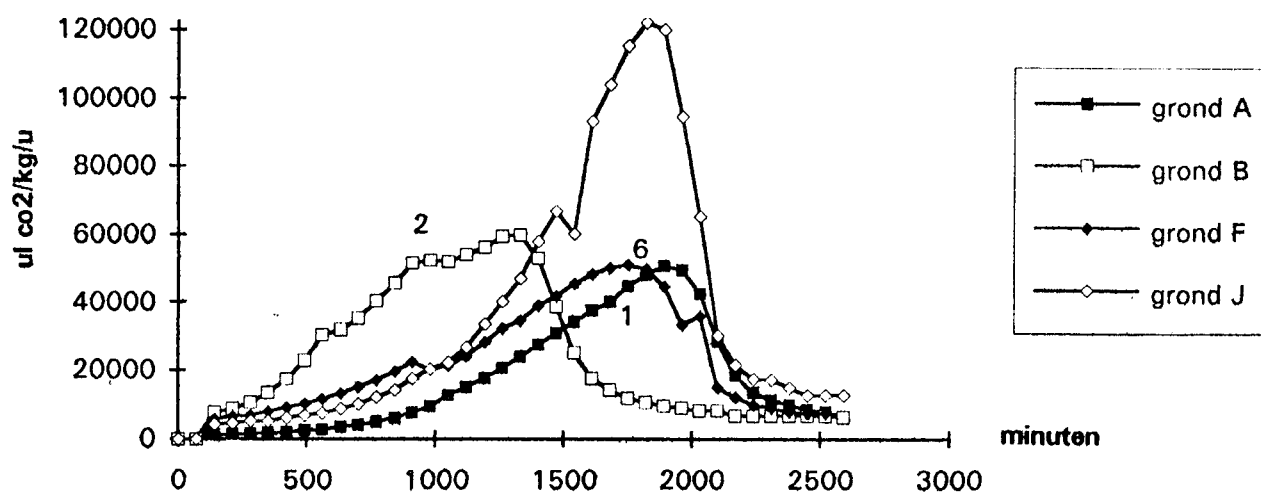
Teneinde een indruk te verkrijgen van de bruikbaarheid van gronden verzameld uit de omgeving van Budel, werd van de gradiëntbemonstering een 2-tal vervuilde (lokatie 1 en 2)



Figuur 4.1. Effect van cadmium op de CO<sub>2</sub>-ontwikkeling uit glutamaat in een humeuze zandgrond.



Figuur 4.2 Effect van zink op de CO<sub>2</sub>-ontwikkeling uit glutamaat in een humeuze zandgrond.



Figuur 4.3. Ontwikkeling van CO<sub>2</sub> uit glutamaat in vier Budelgronden (A en B: hoog zinkgehalte).

en een 2-tal schone gronden (lokatie 6 en 9) onderzocht na 3 dagen voorincubatie bij 60% maximale watercapaciteit van de droge grond.

Uit Figuur 4.3 blijkt dat in deze gronden het glutamaat goed wordt afgebroken. Er is echter geen correlatie tussen afbraaksnelheid en de verontreinigingsgraad. Dit was ook niet te verwachten, omdat de respons sterk samenhangt met andere factoren (zuurgraad, org. stofgehalte, totale microbiële biomassa). In ieder geval kan geconcludeerd worden dat de gronden 1 en 2, die veel beschikbaar zink bevatten, blijkbaar niet "dood" zijn.

De volgende stap zal zijn het effect van toegevoegd zink te bepalen aan gronden 1, 2 en 11, teneinde de NOEC voor het effect van toegevoegd zink op de glutamaat-mineralisatie in deze gronden vast te stellen.

## 5. EFFECTEN VAN ZWARE METALEN OP DE GROEI VAN DRIE PLANTEN SOORTEN IN BUDELGROND

N. van de Hoeven

TNO Milieuwetenschappen

### *Doelstelling*

Voor het vaststellen van effecten van stoffen op planten is door de OECD een Guideline opgesteld. Deze Guideline (OECD 208) is ook toepasbaar voor het toetsen van planten op verontreiniging in de bodem, met name als een vergelijking met een goede referentie mogelijk is. Het ligt dus voor de hand de respons van planten op verontreiniging in gronden uit de omgeving van Budel te bestuderen.

### *Aanpak*

Uit de OECD-Guideline zijn drie plantensoorten zijn geselecteerd die het meest representatief zijn voor wilde planten. *Lolium perenne* (Engels raaigras), *Vicia sativa* (Voederwikke) en *Trifolium pratense* (Rode klaver). In een later stadium zullen ook proeven worden uitgevoerd met *Sinapis alba* (Gele Mosterd).

Van de drie planten zijn voor zover bekend geen toxiciteitsgegevens uit "standaard" toetsen beschikbaar. Wel zijn gegevens voorhanden over de toxiciteit van cadmium voor Haver (*Avena sativa*), Sla (*Lactuca sativa*) en Tomaat (*Lycopersicon esculentum*) in een grond volgens de OECD Guideline, en in een humeuze zandgrond (zie Tabel 5.1). EC<sub>50</sub>-waarden van cadmium voor radijs en haver genoemd in de bijlage van het C-(toetsings)waarden rapport (Denneman & van Gestel, 1990) variëren tussen 27 en 461 mg/kg (gecorrigeerd naar zogenaamde minimale bodem, 2% o.m., 5% lutum variërend tussen 22 en 375 mg/kg).

### *Resultaten*

Toetsen zijn uitgevoerd in Budel "schoon" en "vuil" waarbij 1% koemest is toegevoegd. Proeven zijn uitgevoerd bij natuurlijke pH (4,2 voor Budel "schoon" en 5,2 voor Budel "vuil") en bij pH gesteld op 5,2 en 6,2 (5,2 is de natuurlijke pH voor Budel "vuil"). Bij natuurlijke pH blijkt *L. perenne* beter op de vervuilde grond te groeien. Bij *V. sativa* blijft de ontwikkeling

Tabel 5.1 Gegevens over de toxiciteit van cadmium (toegevoegd als CdCl<sub>2</sub>) voor planten (uit: Adema & Henzen, 1986).

(mg/kg)	landbouwgrond (OECD 208)		humeuze zandgrond	
	pH = 7,5		pH = 5,1	
	EC <sub>50</sub>	NOEC	EC <sub>50</sub>	NOEC
Haver	159	10	97	10
Tomaat	171	32	16	<3,2
Sla	33	3,2	136	32

van de wortels achter op de vervuilde grond. Bij *T. pratense* zijn er zowel effecten op wortels als op spruiten. Bij vergelijking van groei in grond met dezelfde (gecorrigeerde) pH blijkt de wortelgroei van *L. perenne* en *V. sativa* op vuile grond iets achter te blijven. Op de spruit is voor deze twee soorten geen of een positief effect waar te nemen. De groei van zowel de wortels als als de spruiten van *T. pratense* is minder in Budel "vuil" dan in Budel "schoon". Alle drie de plantensoorten groeien beter bij pH 6,2 dan bij pH 5,2.

Tevens zijn toetsen uitgevoerd in Budel "schoon" waaraan zink, cadmium, lood of koper is toegevoegd (Tabel 5.2 en 5.3). Hieruit blijkt dat *T. pratense* de gevoeligste plant voor zink en cadmium is.

Tabel 5.2 Resultaten toxiciteitsproeven (EC<sub>50 (groei)</sub> in mg/kg droge grond, na 24 tot 25 dagen) met planten en zink en cadmium toegevoegd aan Budel "schoon"

Metaal (mg/kg)	<i>Vicia sativa</i>		<i>Trifolium pratense</i>	
	spruit	wortel	spruit	wortel
Zink	176	109	131	68
Cadmium	>100	43	38	33

Met *T. pratense* zijn de gronden van de gradiëntbemonstering bij Budel verder onderzocht. De gronden werden met CaCO<sub>3</sub> op een pH van 5,2-5,5 gebracht. In Fig. 5.1 wordt de groei (gewicht van de groene delen) als functie van de afstand tot de smelterij weergegeven. Hieruit blijkt duidelijk dat de grond van lokaties 1 en 2 de groei sterk remt. Ook de grond van lokatie

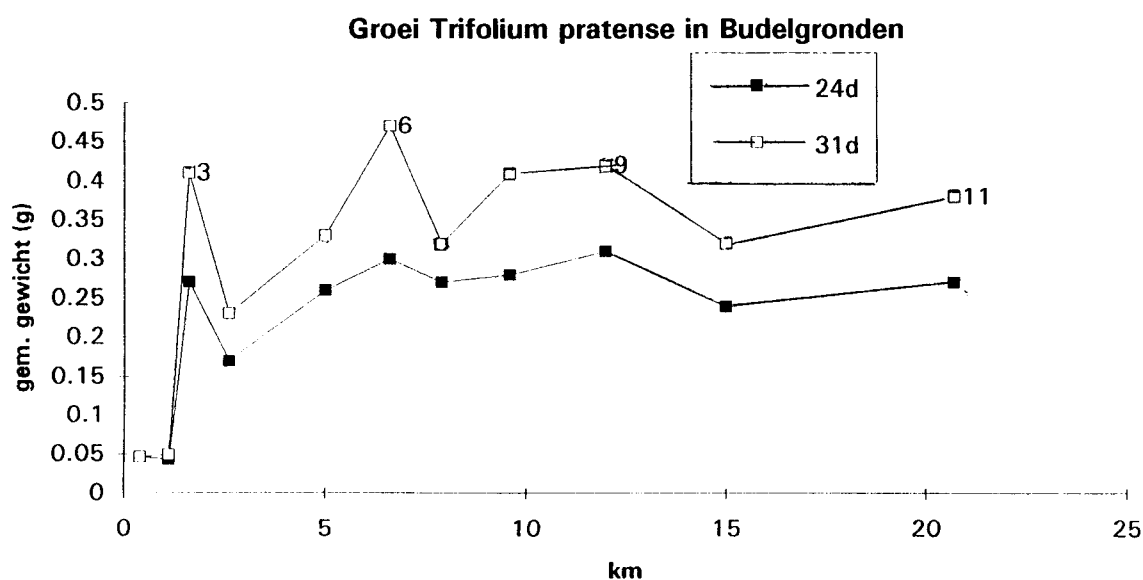


Tabel 5.3 NOEC<sub>(groei)</sub> (mg/kg droge grond) voor de verschillende metalen toegevoegd aan Budel "schoon" (NOEC is de hoogst geteste concentratie waarbij het gewicht minder dan 20% lager dan in de controle is)

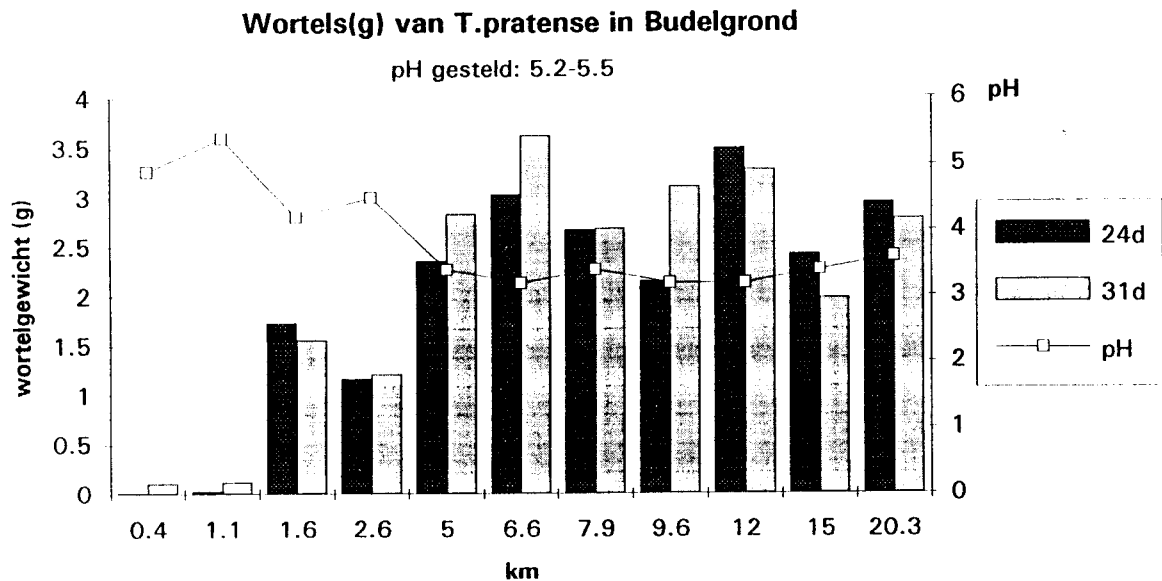
Metaal (mg/kg)	<i>Vicia sativa</i>		<i>Trifolium pratense</i>	
	spruit	wortel	spruit	wortel
Zink	100	32	32	32
Cadmium	32	10	10	10
Koper	≥100	≥100	≥100	≥100
Lood	≥1000	100	100	100

4 remt, zij het in mindere mate, de groei van *T. pratense*. De rest van de variaties valt binnen de spreiding van de resultaten, en wordt mogelijk door andere bodemfactoren (nutriënten) veroorzaakt. Na afloop van de proef bleken de van oorsprong zure gronden de gecorrigeerde pH-waarden doorbroken te hebben tot pH 4,3-4,6.

Het gewicht van de wortels volgde ongeveer dezelfde trend als het gewicht van de spruit (Fig. 5.2). Hierbij bleek grond van lokaties 3 en 4 (naast 1 en 2) eveneens remmend te werken op de wortelgroei.



Figuur 5.1. Groei van de groene delen (spruit) van *T. pratense* in Budelgronden (nr. 1-11) na 24 en 31 dagen.



Figuur 5.2. Gewicht van de wortels van *T. pratense* na 24 en 31 dagen in Budelgronden en de oorspronkelijke pH-waarden (gemeten bij TNO) in deze gronden.

### Conclusie

De respons van de groei van *T. pratense* laat zich heel goed correleren met de in de grond gevonden waarden voor  $\text{CaCl}_2$ -extraheerbaar zink. Voor lokaties 1 en 2 ligt de aangetroffen (extraheerbare) zink-concentratie ruim boven de  $\text{EC}_{50}$ (25 dagen)waarde voor de spruit en zelfs aanzienlijk (faktor 4) boven de  $\text{EC}_{50}$ -waarde voor wortels van *T. pratense*. Voor lokaties 3 en 4 wordt een zinkconcentratie aangetroffen die iets onder de  $\text{EC}_{50}$ -waarde van de spruit ligt maar gelijk is aan de wortel  $\text{EC}_{50}$ -waarde.

In grond van lokatie 3 wordt de remming van de spruit door zink kennelijk teniet gedaan door gunstige groeicondities. In de gronden 6 t/m 11 daalt de pH gedurende het experiment tot waarden tussen de 4,3 en 4,7 na 24 dagen en tussen 4,3 en 4,8 na 31 dagen. Deze relatief lage pH waarden zouden de groei van *Trifolium pratense* enigzins kunnen remmen, en daarmee het effect van de verminderde zink concentratie te niet kunnen doen.

Cadmium waarvan het gehalte in de Budelgronden lager is dan de NOEC-waarden voor *V. sativa* en *T. pratense* speelt waarschijnlijk slechts een geringe fytotoxicologische rol.

## 6. EFFECTEN VAN ZWARE METALEN OP DE WORM *EISENIA ANDREI* IN OECD-KUNSTGROND EN BUDELGROND

L. Posthuma, H. Boonman en R. Baerselman  
RIVM, Laboratorium voor Ecotoxicologie

### *Doelstelling en aanpak*

In dit hoofdstuk wordt een aantal proeven beschreven met de compostworm *Eisenia andrei*, waarbij het protocol afgeleid is van Van Gestel (1991). Hoofddoel was het vaststellen van een dosis-effectrelatie in grond langs de verontreinigingsgradiënt te Budel. Hiertoe is de reproductie van de wormen bepaald in de gronden van de gradiëntbemonstering bij de gekozen voorbehandeling. De resultaten hiervan zijn vergeleken met de reproductie in OECD- kunstgrond. Abiotische condities zijn zo mogelijk vergelijkbaar gehouden, o.a. door de uitvoering van de proeven onder geconditioneerde omstandigheden. Eventuele verschillen tussen de laboratoriumtoets in OECD-kunstgrond en de toets in veldgrond zijn daardoor geheel toe te schrijven aan verschillen tussen beide substraten (inclusief voorbehandelingen). Tenslotte werd een metaalopname experiment uitgevoerd in zowel Budelgrond als OECD-kunstgrond onder laboratoriumcondities, om patronen van metaalopname onderling te kunnen vergelijken. De resultaten zijn bovendien vergeleken met beschikbare gegevens over de toxiciteit van metalen in combinatie.

De compostworm *E. andrei* wordt veel gebruikt voor de ecotoxicologische beoordeling van stoffen in de bodem. Het bestaan en het gebruik van (min of meer) gestandaardiseerde methodieken maakt deze soort geschikt voor onderzoek binnen het validatieproject, m.n. voor het onderzoek naar overeenkomsten en verschillen tussen effecten in laboratoriumtoetsen en het veld. Het dier is verder makkelijk te kweken en heeft een relatief korte generatietijd ten opzichte van andere wormensoorten.

In dit hoofdstuk zijn de resultaten van verschillende experimenten samengevat:

- 1) De voorexperimenten, met als doel de bepaling van de minimale bewerking die nodig is om de Budelgrond geschikt te maken voor de lab.-veldvergelijking met *E. andrei* zoals bedoeld onder (2).
- 2) Het reproductie-experiment, met als doel het vaststellen van de mate van verschil tussen

reproductie van *E. andrei* in OECD-kunstgrond en Budelgrond.

- 3) Het accumulatie-experiment, met als doel de opnamepatronen te vergelijken van een xenobiotisch metaal (Cd) door *E. andrei* uit OECD-kunstgrond, en uit Budelgrond bij vergelijkbare pH en cadmium totaal-concentratie.

De experimenten zijn uitgevoerd in een klimaatkamer (ca. 20 °C, continue belichting 400-800 lux). Tenzij anders vermeld zijn 10 wormen per pot gebruikt, en is de behandeling in duplo uitgevoerd. Voorconditionering is, indien van toepassing, uitgevoerd met de schoonst beschikbare grond van vergelijkbare kwaliteit, d.w.z. blootstelling in OECD-kunstgrond werd voorafgegaan door voorconditionering in dezelfde grond, en blootstelling in Budelgrond werd voorafgegaan door voorconditionering in Budel "schoon" of grond van lokatie 11 (gradiëntbemonstering).

## *Methoden*

### Voorexperimenten

De overleving van *E. andrei* is bepaald na 1 en 2 weken in Budel "schoon" (10, 15 of 20 % vocht (w/w)) en in Budel "pomp" (15 % vocht (w/w)), zonder verdere additieven (geen mest). De proef werd uitgevoerd met vier behandelingsgroepen, die verschilden wat betreft pH, nl. een onbehandelde grond, waarin zich een grondspecifieke pH instelt, en verder de pH's 5, 5,5, en 6. Deze proef werd in tweede instantie bij natuurlijke pH en pH 5,5, bij een vochtgehalte van 20 % (w/w), in viervoud herhaald. Groei, reproductie, aantal vruchtbare cocons, en juvenielen zijn bepaald bij pH 5, 5,5 en 6, bij 20 % vocht, waarbij mest is toegevoegd als voedsel.

### Reproductie-experiment

De bepaling van effecten op de reproductie door metalen in Budelgrond is uitgevoerd in 10 grondtypen uit de gradiëntmonstering aangevuld met Budel "pomp" uit het vooronderzoek. Tevens is de reproductie bepaald in schone OECD-kunstgrond. De resultaten zijn vergeleken met gepubliceerde vergelijkbare waarden bepaald in OECD-kunstgrond (pH ca. 5,5). Twee behandelingen zijn toegepast: (1) blootstelling bij de pH die van nature voorkomt in de Budelgronden, en (2) blootstelling bij een pH van 5,5, die gesteld is m.b.v. calcium-carbonaat. Het vochtgehalte is in deze proef gesteld op 20 % (w/w), tenzij anders vermeld (ten tijde van het inzetten van de proef was de pF-karakteristiek van de Budelgronden nog niet bekend; de proeven in OECD-kunstgrond worden altijd gedaan bij ca. pF = 2, hetgeen overeenkomt met de

veldcapaciteit). Alle wormen voor het experiment zijn afkomstig uit één kweekcontainer; beide behandelingen en de OECD-controle zijn synchroon uitgevoerd.

### Accumulatie-experiment

De accumulatie van cadmium in de wormen is bepaald in OECD-kunstgrond en in Budelgrond van lokatie 2. De natuurlijke pH van deze Budelgrond is zonder toevoeging van calciumcarbonaat vergelijkbaar met de pH van de OECD-kunstgrond in een standaard proef. De Budelgrond bevat een totaal cadmium gehalte van 3,92 mg/kg, terwijl in de OECD-kunstgrond een nominale concentratie van 4 mg/kg is aangebracht (als CdCl<sub>2</sub>). De totale blootstellingsduur was 3 weken. Wormenmonsters zijn genomen na 0, 1, 2, 3, 6, 9, 13, 16 en 21 dagen. Na spoelen, 24 uur darmleging op filtreerpapier, en nogmaals spoelen, zijn de dieren ingevroren, gevriesdroogd en tot poeder gehomogeniseerd. Het poeder is gedestruëerd, waarna het totaal cadmiumgehalte (mg/kg drooggewicht) met behulp van AAS is bepaald (duplo per monsterdatum per behandeling).

### Databewerkingen

De resultaten van het reproductie-experiment vormden de basis voor de analyse van diverse behandelings-effectrelaties, waaronder een afstands-effectrelatie, en diverse dosis-effectrelaties. De X-waarden voor de diverse analyses bleken niet evenredig over de X-as verdeeld te zijn, zoals dat om statistische redenen gebruikelijk is bij gecontroleerde dosis-effectstudies. Dit probleem werd opgelost door de X-as (op logaritmische schaal) voor elk van de onderzochte relaties op te delen in klassen. Analoog aan een gecontroleerde proef levert dit bijvoorbeeld de volgende concentratie-klassen op: (1) controle-3,2; (2) 3,2-10; (3) 10-32; etc.. De dosis-effectrelatie werd vervolgens bepaald aan de hand van de gemiddelde X-waarde en de gemiddelde prestatie (Y-waarde) per klasse.

Een statistisch logistisch model (Haanstra *et al.*, 1985 ) is vervolgens gefit waarmee de dosis-effectrelaties beschreven worden. Dit gebeurt volgens de formule:

$$y = \frac{c}{1 + \exp^{-b(x-m)}}$$

waarbij:

y = prestatie: coconproductie

x = ln (concentratie)

b = schatting van de helling bij de  $EC_{50}$

m = schatting van de ln ( $EC_{50}$ )

c = schatting prestatie bij de controle

De volgende behandelings-effectrelaties zijn geanalyseerd:

- (1) Een afstands-effectrelatie, resulterend in een  $EA_{50}$  (Effect-Afstand tot emissiebron voor 50 % reductie van de coconproductie). Deze relatie wordt berekend zonder aannames vooraf. De metaalconcentraties van de afzonderlijke metalen in het  $EA_{50}$  punt zijn daarna geschat door lineaire interpolatie van de relatie tussen ln (concentratie) en afstand, voor elk van de metalen afzonderlijk. De aanname voor de interpretatie van deze gegevens in relatie tot reproductie in metaalbelaste OECD-kunstgrond is, dat de concentratie-afstands relatie (bij benadering) lineair is op logaritmische schaal. Vergelijking met laboratoriumgegevens is echter problematisch, omdat de berekende combinatie van metaalconcentraties in de  $EA_{50}$  grond niet in OECD-kunstgrond getest is.
- (2) Bepaling van de dosis-effectrelatie voor de som van de metaalconcentraties geschaald naar relatieve giftigheid op basis van Toxische Eenheden (TE). Dit resulteerde in een  $EC_{50}$  uitgedrukt in Toxische Eenheden. De relatieve toxiciteit van elk metaal is uitgedrukt als percentage van de  $EC_{50}$  die afkomstig is uit een standaard test in OECD-kunstgrond. De  $EC_{50}$  wordt gedefinieerd als 1 TE, TE's kunnen vervolgens worden opgeteld, omdat de eenheid dimensieloos is. Als wordt aangenomen dat de metalen een concentratie-additieve werking vertonen, dan zou bij gelijke metaalbeschikbaarheid de  $EC_{50(Budel)}$  gelijk moeten zijn aan de  $EC_{50(OECD)}$ , mits uitgedrukt als  $\sum TE$ . Verschillen tussen beide  $EC_{50}$  schattingen duiden op non-additiviteit, verschil in beschikbaarheid, of beide.
- (3) Bepaling van de dosis-effectrelatie waarbij alleen het zink als toxicant beschouwd wordt. Dit levert een  $EC_{50}$  op uitgedrukt in totaal-bodemconcentratie zink. Een evaluatie van de potentiële relatieve bijdrage van de metalen cadmium, zink, lood en koper aan de effecten in grond 2 laat zien dat zink mogelijk voor meer dan 70 % verantwoordelijk is (zie Tabel 6.1).
- (4) Tenslotte is een dosis-effectrelatie bepaald voor  $CaCl_2$ -extraheerbaar zink, waarbij de  $EC_{50}$

uitgedrukt is als extraheerbare concentratie. Hierbij is de vergelijking gemaakt met de overeenkomstige data voor effecten van zink in OECD-kunstgrond.

Tabel 6.1 Totaal-metaalgehalten in Budelgrond (lokatie 2) in relatie tot EC<sub>50</sub> schattingen van coconproductie in OECD-kunstgrond (pH ca. 5.5).

metaal	EC <sub>50</sub> (mg/kg)	Budel 1,1 km (mg/kg)	bijdrage toxiciteit
Zn	418	2787	4,28 (72%)
Cu	194	250	1,29 (22%)
Pb	1572	424	0,27 (5%)
Cd	132	4	0,03 (1%)

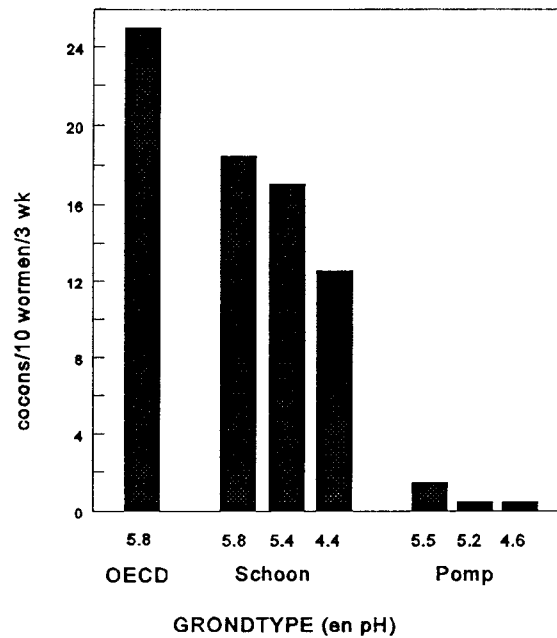
## Resultaten

### Voorexperimenten

De overleving van de wormen in Budel "vuil", "pomp" en "schoon" met aangepaste pH (5,5) gedurende 2 weken blijkt in alle gevallen 100 %, en is daarmee vergelijkbaar met OECD-kunstgrond. Slechts bij natuurlijke pH treedt sterfte op in de gronden "pomp" en "vuil" (respectievelijk 5 % en 28 % na 2 weken). Acute effecten op de wormen in de Budelgrond zijn derhalve gering en onvoldoende voor het kunnen opstellen van een dosis-effectrelatie op mortaliteit.

De groei van de wormen in de gronden van het vooronderzoek is variabel. In "schoon" is de versgewichtstoename gedurende drie weken 8-15 %, terwijl in "pomp" de groei duidelijk lager is: -64 tot +5 %. In "vuil" blijkt de groei 25-33 % te bedragen. In alle grondtypen neemt de groei bij hogere pH toe. De aanwezigheid van metalen lijkt remmend te werken op de groei. Echter, groei blijkt een zeer variabele maat te zijn, en is derhalve ongeschikt als parameter voor lab.-veldvergelijking.

De coconproductie is zowel afhankelijk van het type grond (OECD of Budel), de pH (hoog of laag) en de afstand tot de fabriek (schoon of verontreinigd) (Fig. 6.1). De maximale remming van de coconproductie bedraagt meer dan 50 %, zodat bij een gradiëntmonstering de EA<sub>50</sub> geïnterpoleerd kan worden uit de gegevens. Dit betekent dat, zowel bij natuurlijke pH als bij de naar boven toe bijgestelde pH's, de reproductie het laagst is in grond die de hoogste metaalconcentratie bevat.



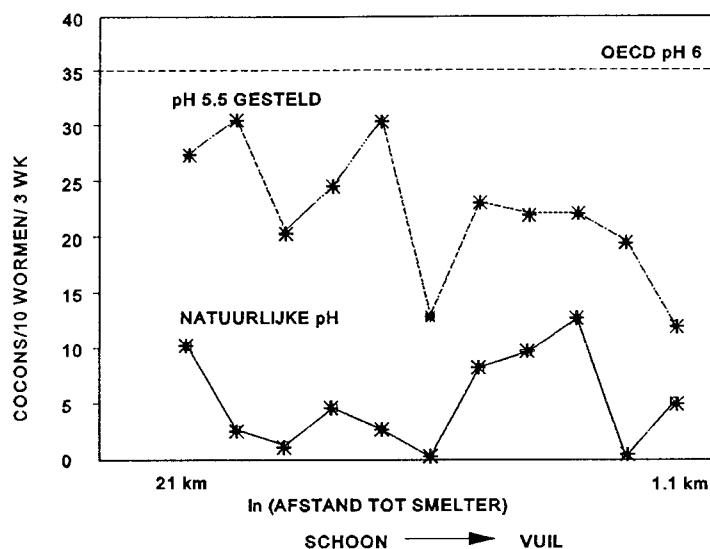
Figuur 6.1. Coconproductie van *Eisenia andrei* in OECD-kunstgrond en Budel 'schoon' en 'pomp'.

### Reproductie-experiment

De coconproductie van de wormen in Budelgronden is afhankelijk van de pH en van de afstand tot de fabriek (Fig. 6.2). De coconproductie is in beide behandelingsgroepen variabel. Ondanks pH-bijstelling naar een voor *E. andrei* gunstige waarde van 5,5 zijn er blijkbaar grote verschillen tussen relatief dicht bij elkaar liggende gronden, bijv. in gronden 7 en 6 zijn bij pH 5,5, respectievelijk 30 en 13 cocons geproduceerd. Kennelijk zijn naast pH en metaalgehalte andere factoren van invloed op de coconproductie, en dragen deze bij aan "ruis" over de afstand-effectrelatie.

Bij de pH-waarden die zich van nature instellen in de kweekpotten is de reproductie in alle grondtypen lager dan bij de op 5,5 gecorrigeerde pH. De actuele pH-waarden van de grondtypen varieerden, deze variatie was lager in de groep met pH 5,5. De vochtcondities zijn in alle grondtypen ingesteld op ca. 20 % (w/w), m.u.v. het OECD-kunstgrond met ca. 50 % (w/w). De toegevoegde hoeveelheid water heeft, naar later bleek, in alle grondtypen geleid tot een vochtgehalte boven de veldcapaciteit (pF=2) welke wordt nagestreefd in standaard proeven in OECD-kunstgrond. De grootste afwijking van veldcapaciteit is opgetreden in Budelgronden 2 en 3, en de OECD-kunstgrond met 15-20 % teveel vocht..



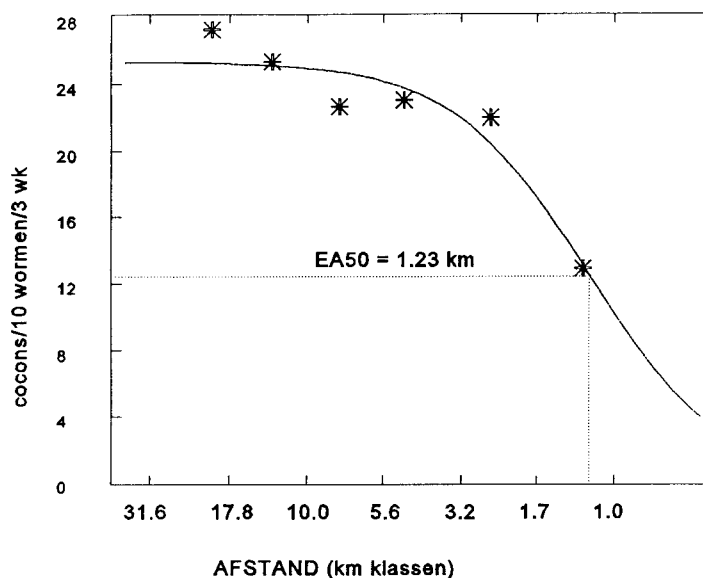


Figuur 6.2. Afstand-effectrelatie (ruwe data) voor coconproductie bij *Eisenia andrei* in de Budelgronden bij natuurlijke pH en pH=5,5.

De reproductie van de wormen in Budelgrond bij pH 5,5 (Fig. 6.2) kan samengevat worden met een Afstands-Effectrelatie volgens het logistische responsmodel. De modelparameter  $EA_{50}$  geeft in dit geval de afstand tot de fabriek waar de grondkwaliteit een remming van de coconproductie van 50% veroorzaakt. Deze afstand is geschat op 1,23 km (95 % betrouwbaarheidsinterval 0,73-2,06 km) (Fig. 6.3). De metaalconcentraties (totaal en  $CaCl_2$  extraheerbare fractie) in het  $EA_{50}$  punt (Tabel 6.2) zijn geïnterpoleerd uit de relatie tussen afstand tot de fabriek en de natuurlijke logaritme van de metaalconcentratie. In dit punt is voor géén van de afzonderlijke metalen de  $EC_{50}$ , uitgedrukt in totaalgehalte in OECD- kunstgrond, overschreden. Het 95 % betrouwbaarheidsinterval van de  $EA_{50}$  schatting is vrij ruim en voorzichtige interpretatie is daarom geboden.

In de bovenstaande berekeningen zijn geen aannames gedaan, behoudens voor elk afzonderlijk metaal een lineair verband tussen  $\ln(\text{metaalconcentratie})$  en afstand tot de fabriek. Voor berekening van effect-parameters op concentratie-basis (bijv.  $EC_{50}$ ) zijn meer aannames noodzakelijk. In geval van de dosis-effectrelatie voor de som van aanwezige metalen moet aangenomen worden dat metaalconcentraties uitgedrukt als fracties van hun  $EC_{50}$ 's in OECD-kunstgrond kunnen worden opgeteld. Na optelling van deze zgn. toxische eenheden (TE) en indeling in vervuilingklassen kunnen de parameters van de dosis-effectrelatie geschat worden.

De toxiciteit van zware metalen in Budelgrond is, afgemeten aan de schatter voor de  $EC_{50}$ ,

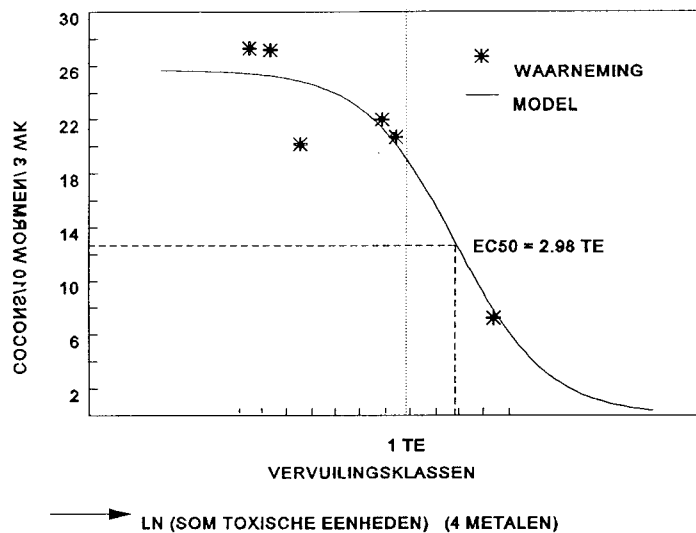


Figuur 6.3. Afstand-effectrelatie voor coconproductie bij *Eisenia andrei* in Budelgronden (zie tekst).

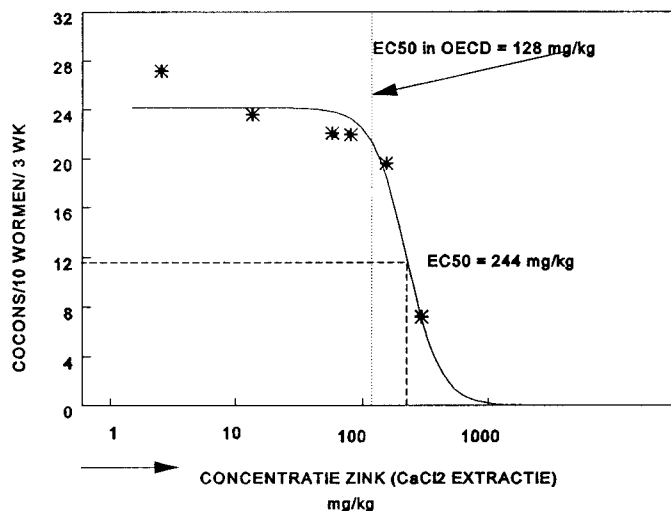
lager dan verwacht mag worden uit de waarnemingen in OECD-kunstgrond (Fig. 6.4). Er blijkt een ca. drie maal zo hoge som-metaalconcentratie nodig dan in OECD-kunstgrond om hetzelfde effect te bereiken. Het betrouwbaarheidsinterval is breed (0,72 - 12,33), hetgeen zou kunnen betekenen dat er in werkelijkheid geen verschillen bestaan tussen effecten in OECD-kunstgrond en Budelgrond. De concentratie die in OECD-kunstgrond een remming van 50 % veroorzaakt (1 TE) blijkt geen enkel effect teweeg te brengen in Budelgrond (Fig. 6.4). Dit duidt op een verschil dat echter statistisch niet onderbouwd kan worden. De waarschijnlijke oorzaak van dit statistische probleem is de variabiliteit van de Budelgrond. Dit probleem kan slechts opgelost worden door uitgebreide replicatie.

Tabel 6.2 Metaalgehalten in Budelgrond waar de coconproductie van *Eisenia andrei* met 50 % geremd is (zie tekst).

metaal	totaalgehalte (mg/kg)	CaCl <sub>2</sub> extraheerbaar (mg/kg)
Zn	231.5	83.9
Cu	30.5	n.d.
Pb	136	1.6
Cd	1.3	0.5



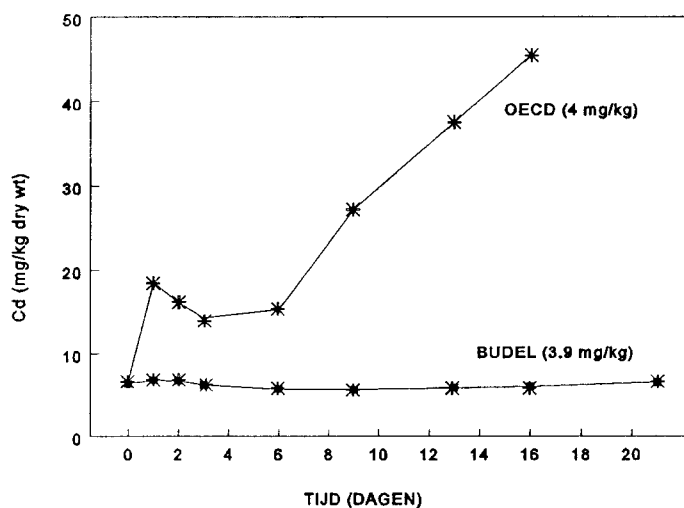
Figuur 6.4. Dosis-effectrelatie van de combinatie van Zn, Cu, Pb en Cd voor coconproductie van *Eisenia andrei* in Budelgrond (pH 5.5) (concentraties opgeteld als TE's).



Figuur 6.5. Dosis-effectrelatie voor coconproductie van *Eisenia andrei* in Budelgrond (CaCl<sub>2</sub>-extraheerbaar Zn).

De dosis-effectrelatie voor zink is opgesteld door aan te nemen dat zink het meest bijdraagt aan de toxische effecten in Budelgrond. De parameterschatting voor de EC<sub>50</sub> van zink (totaalconcentratie) was 2,8 maal zo hoog als de vergelijkbare EC<sub>50</sub> in OECD-kunstgrond (methode analoog aan Fig. 6.4). Eenzelfde procedure is gevolgd voor de bepaling van de EC<sub>50</sub> t.o.v. CaCl<sub>2</sub> extraheerbaar zink. De EC<sub>50</sub> schatting bleek te verschillen van de vergelijkbare schatting voor OECD-kunstgrond (Fig. 6.5). Hoewel ook in dit geval de 95 %

betrouwbaarheidsintervallen vrij breed zijn, duiden de verschillende schatters op mogelijke verschillen in (bio)beschikbaarheid als grondslag voor het optreden van lab.-veldverschillen. Dit aspect is verder uitgewerkt middels een accumulatie-experiment.



Figuur 6.6. Accumulatiepatronen van cadmium in *E. andrei* in Budelgrond en OECD-kunstgrond bij vergelijkbare pH en achtergrondconcentratie.

### Accumulatie-experiment

De relatief lage toxiciteit van metalen in Budelgrond in vergelijking met OECD-kunstgrond kan op drie manieren verklaard worden, te weten verlaagde (bio)beschikbaarheid, verminderde toxiciteit door combinatiewerking, of beide.

Het patroon van cadmiumaccumulatie verschilde aanzienlijk tussen Budelgrond en OECD-kunstgrond bij vergelijkbare pH en achtergrondconcentratie (totaalgehalte) cadmium (Fig. 6.6). De cadmiumopname uit OECD-kunstgrond is veel hoger dan uit Budelgrond. Voor de overige metalen zijn (nog) geen bepalingen gedaan. Daarom kan nog niet geconcludeerd worden dat de beschikbaarheid van cadmium lager is in Budel door de lokale bodemeigenschappen en metaalspeciëatie, immers, het aanwezige zink kan de cadmiumopname ook sterk verlaagd hebben (Fig. 6.4).

### Combinatietoxiciteit in OECD-kunstgrond

Mogo (1993) en Weltje (1993) hebben aangetoond dat equitoxische binaire mengsels van

metalen in OECD-kunstgrond minder toxisch kunnen zijn voor de coconproductie van *E. andrei* dan op grond van de afzonderlijke stoffen verwacht zou worden (Tabel 6.3). De remming van de coconproductie met 50% wordt bereikt bij concentraties, uitgedrukt in Toxische Eenheden, die hoger zijn dan de verwachte concentratie van 1 TE. Combinatiewerkingen kunnen een rol hebben gespeeld bij het ontstaan van het de verminderde effecten van metalen in OECD-kunstgrond en Budelgrond.

Tabel 6.3 Combinatietoxiciteit van binaire metaalmengsels voor coconproductie van *Eisenia andrei* in OECD-kunstgrond.

combinatie	TE bij 50 % remming
Cd/Zn	2.20
Cu/[ n	2.35
Cu/Cd	1.58

### Conclusies

De experimenten met *E. andrei* hebben laten zien dat laboratoriumonderzoek met deze soort kan worden uitgevoerd in Budelgronden met verschillende mate van zware metaal belasting. Bovendien kan in Budel een gradiënt bemonsterd worden, waarbij de effecten die toegeschreven kunnen worden aan de metalen (of aan metalen gerelateerde factoren) voldoende zijn om een betrouwbare dosis-effectrelatie te beschrijven. Naast deze positieve punten zijn er ook enkele nadelen verbonden aan het onderzoek met *E. andrei* in Budelgrond. Eén van de belangrijkste nadelen is dat de modificatie van de pH een noodzakelijk deel uitmaakt van de voorbehandeling. Onder natuurlijke omstandigheden lijkt de pH een grotere variatiebron voor coconproductie dan de metalen. Waarschijnlijk is de lage pH, in combinatie met het type bodem (arme zandgrond), de oorzaak dat regenwormen vermoedelijk afwezig zijn of slechts in zeer lage dichtheden in het onderzochte gebied voorkomen. Verhoging van de pH versterkt echter de binding van de metalen in de bodem, waardoor de toxische effecten van de metalen in de huidige proef in Budelgrond bij pH 5,5 tot een onderschatting leiden van de toxiciteit onder natuurlijke omstandigheden.

Bij vergelijking tussen Budelgrond en OECD-kunstgrond is naar voren gekomen dat met name twee factoren een rol spelen bij het ontstaan van verschillen in effecten op de wormen, te weten

(bio)beschikbaarheid of combinatiewerking. Uit de waarnemingen kan echter niet opgemaakt worden in welke mate beide factoren verantwoordelijk zijn voor optredende verschillen.

Verder onderzoek moet zich, naar aanleiding van deze conclusies, richten op deze beide factoren. Wat betreft (bio)beschikbaarheid van metalen kan in principe gewerkt worden met *E. andrei* in Budelgrond met natuurlijke pH. Hierdoor kan het opnamepatroon dat ten grondslag ligt aan de toxische effecten bestudeerd worden. Bestudering van toxische effecten kan echter, gezien het dominante pH effect op reproductie, alleen bij of in de buurt van het pH optimum plaatsvinden. Voor (bio)beschikbaarheidsmetingen is de dynamiek van opname en uitscheiding (Fig. 6.6), alsmede de "interne concentratie" waarbij de effecten op gaan treden van groot belang. Zo mogelijk zullen dan ook de interne concentraties van de metalen in het vervolg bepaald worden, zowel bij experimenten in OECD-kunstgrond als in Budelgrond.

Een belangrijke vraag is vervolgens, of er een lineair verband bestaat tussen interne concentratie en de mate van effect, of dat de relatie afhankelijk is van andere stress-factoren. Voor de bijdrage van combinatie-effecten is laboratoriumonderzoek gaande dat zich allereerst richt op het optreden van combinatiewerkingen in OECD-kunstgrond. Bij de opzet van de combinatietoxiciteitsexperimenten dient erop gelet te worden dat de relatie met het validatie-onderzoek gemaakt kan worden.

## 7. EFFECTEN VAN ZWARE METALEN OP DE POTWORMEN *ENCHYTRAEUS CRYPTICUS* EN *E. ALBIDUS* IN OECD-KUNSTGROND EN BUDELGROND

J. Notenboom, L. Dirven-van Breemen, A. Kalif & A.J. Folkerts,  
RIVM, Laboratorium voor Ecotoxicologie

### *Doelstelling en aanpak*

Reproductietoetsen in analogie met de regenwormtoets zijn beschikbaar voor twee soorten potwormen (Enchytraeidae). Parameters in deze toetsen zijn voor *Enchytraeus albidus* het aantal geproduceerde juvenielen en cocons, en voor *E. crypticus* het aantal juvenielen. Experimenten zijn uitgevoerd in OECD-kunstgrond en in Budelgrond met de bedoeling laboratorium toetsresultaten in beide grondtypen met elkaar te vergelijken. De experimenten lijken deels op die welke met *Eisenia andrei* (Hfst. 6) zijn uitgevoerd en dienen tevens om te zien in hoeverre de resultaten met *E. andrei* ook voor andere wormachtigen opgaan.

In dit hoofdstuk zijn de resultaten van deze experimenten samengevat:

- 1) De voorexperimenten, met als doel te bekijken of de bewerking van de Budelgrond t.b.v. reproductie-experimenten met *E. andrei* ook geschikt is voor het uitvoeren van reproductie-experimenten met beide *Enchytraeus* soorten.
- 2) Het reproductie-experiment, met als doel het vaststellen van de mate van verschil tussen reproductie van de *Enchytraeus* soorten in OECD-kunstgrond en Budelgrond bij een brede range van zware metaalconcentraties.

### *Methode*

#### Algemeen

De experimenten zijn uitgevoerd in een klimaatkast (ca. 20 °C, donker). Tenzij anders vermeld zijn 10 wormen gebruikt per testcontainer van 15 ml gevuld met 7 g grond, en is de behandeling in viervoud uitgevoerd. *E. albidus* is afkomstig uit een kweek in potten gevuld met OECD-kunstgrond en *E. crypticus* uit een kweek op agarplaten. Die dieren worden uit de kweekmedia genomen, voorzichtig gewassen in een watergevulde petrischaal, en op de grond in de testcontainers geplaatst.

### Reproductie-experimenten

De bepaling van effecten op reproductie door metalen in Budelgrond is uitgevoerd in 11 gronden van de gradiëntmonstering. Tevens is de reproductie bepaald in schoon OECD-kunstgrond. De resultaten zijn vergeleken met beschikbare vergelijkbare waarden bepaald in OECD-kunstgrond (pH ca. 5,5). Twee behandelingen zijn toegepast: (1) blootstelling bij de pH die van nature voorkomt in Budelgrond, en (2) blootstelling bij een pH van 5,5, ingesteld m.b.v. calciumcarbonaat. Het vochtgehalte is in deze proef gesteld op 20 % (w/w), tenzij anders vermeld (ten tijde van het inzetten van de proef was de pF-karakteristiek van de Budelgronden nog niet bekend; bij OECD-kunstgrond worden de proeven altijd gedaan bij ca. pF = 2, hetgeen overeenkomt met de veldcapaciteit). Alle wormen voor het experiment zijn afkomstig uit één kweekcontainer; beide behandelingen en de controle in OECD-kunstgrond zijn synchroon uitgevoerd.

De volgende behandelings-effectrelaties zijn geanalyseerd:

- (1) Een afstands-effectrelatie, resulterend in een  $EA_{50}$  (voor de juvenielenproductie van *E. crypticus*; zie ook Hfst. 6). De metaalconcentraties van de afzonderlijke metalen in het  $EA_{50}$  punt zijn geschat door lineaire interpolatie van de relatie tussen  $\ln$  (concentratie) en afstand, voor elk van de afzonderlijke metalen.
- (2) Bepaling van de dosis-effectrelatie, waarbij alleen het zink als toxicant beschouwd wordt. Dit levert een  $EC_{50}$  op die kan worden uitgedrukt in totaalconcentratie en extraheerbaar gehalte zink. In deze analyse wordt ervan uitgegaan dat evenals bij *E. andreii* het zink de grootste bijdrage geeft aan de toxiciteit van de metalen in Budelgrond.

### *Resultaten*

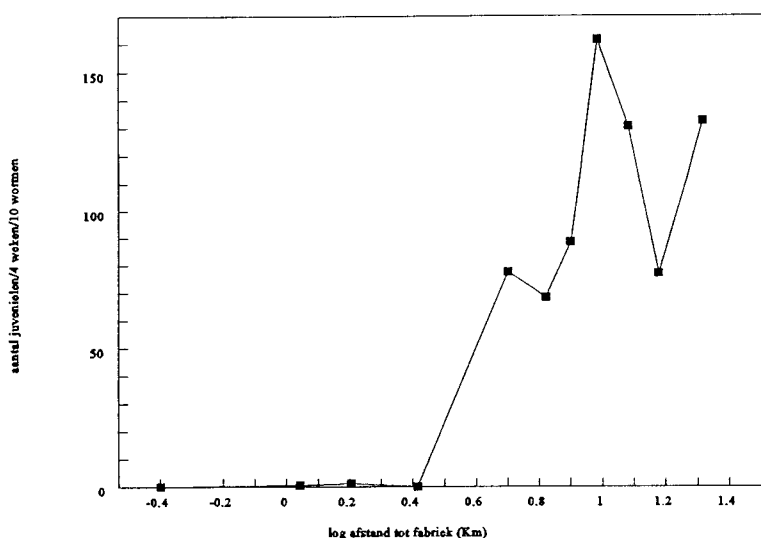
#### Pilotexperiment

In eerste instantie is gekeken naar overleving en reproductie van beide *Enchytraeus* soorten in Budelgrond. Bij natuurlijke pH bleek veel sterfte op te treden in Budel "schoon": na 4 weken vertoonde geen van beide soorten reproductie en van *E. albidus* overleefde slechts 55%.

#### Reproductie in Budelgrond

De reproductie van beide *Enchytraeus* soorten is onderzocht in de Budelgronden van de gradiëntbemonstering met een op 5,5 aangepaste pH. De reproductie van *E. albidus* was in alle





Figuur 7.1. De reproductie van *E. crypticus* in Budelgrond.

gronden gering, bij *E. crypticus* werd een duidelijke dosis-effectrelatie gevonden (Figuur 7.1).

De afstand tot de fabriek waarbij 50% reductie in het aantal geproduceerde juvenielen optreedt ( $EA_{50}$ ) is voor *E. crypticus* 5,0 km (95 % betrouwbaarheidsinterval 3,2-7,8). Het  $EA_{50}$  punt valt nagenoeg samen met het monsterpunt 5 (5 km) waarvan de metaalconcentraties (totaal en  $CaCl_2$  extraheerbare fractie) in Tabel 7.1 staan. Er zijn nog onvoldoende toxiciteitsgegevens voor *E. crypticus* beschikbaar om deze waarden te kunnen vergelijken met toetsresultaten in OECD-kunstgrond. Wel valt op dat het zinktotaalgehalte lager is dan de  $EC_{50}$  voor zink bepaald in kunstgrond (de  $EC_{50}$  hierin is ca. 219 mg/kg zink totaal). Het 95 % betrouwbaarheidsinterval van de  $EA_{50}$  schatting is vrij ruim en voorzichtige interpretatie is daarom geboden.

De  $EC_{50}$  schattingen voor *E. crypticus* in Budelgrond gerelateerd aan het totaal- en extraheerbaar gehalte zink staan in Tabel 7.2. Tevens geeft deze tabel ter vergelijking de  $EC_{50}$  voor totaal gehalte zink in OECD-kunstgrond.

### Conclusies

Vergelijking tussen de effecten zoals die optreden in Budelgrond en OECD-kunstgrond is alleen mogelijk voor *E. crypticus*. De andere soort *E. albidus* leent zich niet voor vergelijking omdat deze soort in de Budelgrond slecht overleeft en niet reproduceert. Dit kan komen doordat deze soort een hoger pH optimum heeft (Dirven-van Breemen et al., 1994) of doordat andere bodemeigenschappen remmend werken..

Tabel 7.1 Metaalgehalten in Budelgrond waar modelberekeningen aangeven dat het aantal geproduceerde juvenielen met 50% geremd is in *Enchytraeus crypticus*

Metaal	Totaalgehalte (mg/kg)	CaCl <sub>2</sub> extraheerbaar (mg/kg)
Zn	32	14,8
Cu	10	<0,1
Pb	40	2,0
Cd	0.4	0,25

Tabel 7.2 De EC<sub>50</sub> voor *Enchytraeus crypticus* in Budelgrond en OECD-kunstgrond gerelateerd aan totaal en extraheerbaar zink.

zinkgehalte (mg/kg)	EC <sub>50</sub> (95% betrouwbaarheidsinterval)
totaal (Budel)	43 (15-127)
CaCl <sub>2</sub> extraheerbaar (Budel)	17 (16-18)
totaal (OECD-kunstgrond) <sup>1</sup>	219 (251 en 186)

<sup>1</sup> gemiddelde over twee experimenten

De reproductie van *E. crypticus* neemt toe met toenemende afstand tot de fabriek. Het EA<sub>50</sub> punt is voor *E. crypticus* groter dan voor *E. andrei*. Dit betekent dat *E. crypticus* op grotere afstand van de fabriek nog last van de metalen lijkt te hebben dan *E. andrei*. Het is dus met *E. crypticus* goed mogelijk een dosis-effectrelatie in Budelgrond te vergelijken met een dergelijke relatie opgesteld aan de hand van standaard laboratoriumtoetsen.

De EC<sub>50</sub> gerelateerd aan het totaalgehalte zink in de Budelgrond is opvallend genoeg lager dan dat gevonden is in toetsen in OECD-kunstgrond. Dit is tegengesteld aan wat gevonden is met *E. andrei*. Blijkbaar zijn er andere factoren aanwezig die in belangrijke mate de effecten op de reproductie in Budelgrond bepalen. Het kan zijn dat deze soort relatief meer last heeft van de invloed van de andere metalen dan *E. andrei*. Een range-finding experiment met zink toegevoegd aan schone Budelgrond (punt 11) geeft aanwijzing voor een EC<sub>50</sub> voor *E. crypticus* groter dan 100 mg/kg. Dit duidt eveneens op de aanwezigheid van andere stress-factoren. Verder onderzoek aan deze soort dient erop gericht te zijn te achterhalen welke factoren dit precies zijn.

Momenteel is een goede vergelijking van de resultaten met *E. crypticus* met die van *E. andrei* nog niet mogelijk, omdat hiertoe nog te veel gegevens voor *E. crypticus* ontbreken. Om een vergelijking mogelijk te maken is het nodig inzicht te hebben in de toxiciteit van de individuele

metalen voor *E. crypticus*, zodat ook voor deze soort een dosis-effect relatie gerelateerd aan TE's van de belangrijkste aanwezige metalen kan worden opgesteld. Verder ontbreken dosis-effect-studies in OECD-kunstgrond voor de verschillende metalen, waarbij metaalconcentraties zijn uitgedrukt in totaal, extraheerbaar of poriewaterconcentratie. Mogelijk kunnen in de nabije toekomst ook accumulatie-experimenten met *E. crypticus* in Budelgrond en OECD-kunstgrond worden uitgevoerd.

## 8. TOETSONTWIKKELING MET DE NEMATODE *PLECTUS ACUMINATUS* IN GROND.

A.J. Schouten, M. van Esbroek, R. Alkemade & M. Rademaker.  
RIVM, Laboratorium voor Bodem en Grondwateronderzoek.

### *Doelstelling*

Voor het maken van een vergelijking tussen effecten van contaminanten op nematoden in laboratorium en veld zijn toetsen nodig. Dergelijke toetsen zijn voor nematoden amper beschikbaar. In aansluiting op het werk van J. Kammenga (LUW, Vakgroep Nematologie) is gekeken naar mogelijkheden om met nematoden een bioassay uit te voeren in grond. Als toetsorganisme is *Plectus acuminatus* gekozen, waarvan een laboratoriumkweek in agar beschikbaar is.

### *Methode*

#### Nematodenkweek

Een nematodenkweek van *Plectus acuminatus*, afkomstig uit een klonenmengsel van J. Kammenga, is opgezet. De door hem ontwikkelde kweekmethode in multidishes is aangehouden. Voor elke kweek is één vrouwtje per putje ingezet en in een klimaatkast in het donker bij 20°C geplaatst. De agarsuspensie is met standaard poriewater (SPW) (Schouten & van der Brugge, 1989) gemaakt en op pH 6,0 gebracht. Als voedselbron voor deze bacterievore nematode is een suspensie van *Acinetobacter* ( $2 \cdot 10^9$  bact./ml) aan de agar toegevoegd. Massakweken zijn aangehouden in petrischalen door eieren en juvenielen uit de multidishes over te enten op agarsuspensies.

#### Toxiciteitstoets

De Budelgronden uit het vooronderzoek zijn gebruikt om te onderzoeken of gekweekte nematoden in natuurlijke grond kunnen overleven. Er is een vergelijking gemaakt tussen Budel "schoon" en Budel "vuil". Per potje zijn 200 nematoden toegevoegd aan 140 gram grond. Na 10 dagen zijn de potjes m.b.v. de Oostenbrinkmethode geëxtraheerd, waarna de nematoden zijn geteld, gefixeerd en gedetermineerd. Determineren was noodzakelijk om *Plectus acuminatus* te

onderscheiden van genera die van nature in de grond voorkomen.

Een tweede experiment is opgezet met drie gronden van de gradiëntbemonstering: vuil (2), middelvuil (6) en schoon (11). De gronden zijn op 20% vocht gebracht en verder op twee manieren behandeld, een reeks is onbekalkt en een andere reeks is bekalkt door met  $\text{CaCO}_3$  de pH op 5,5 te stellen. Bekalken is gedaan om een eventueel pH-effect uit te sluiten. Iedere behandeling is in tienvoud ingezet met 10 gram grond in plastic potjes. Aan ieder potje werden 100 nematoden toegevoegd. Na 7 dagen werden de overlevende nematoden geëxtraheerd via de direct-filter methode. Na tellen en fixeren zijn de nematoden gedetermineerd op aanwezigheid van *Plectus acuminatus*.

Om het overlevingspercentage in de schone grond te optimaliseren werd een derde experiment uitgevoerd, waarbij een aantal methodische aspecten zijn onderzocht, zoals: bekalken, beënten, voedsel en extractiemethode.

## *Resultaten en discussie*

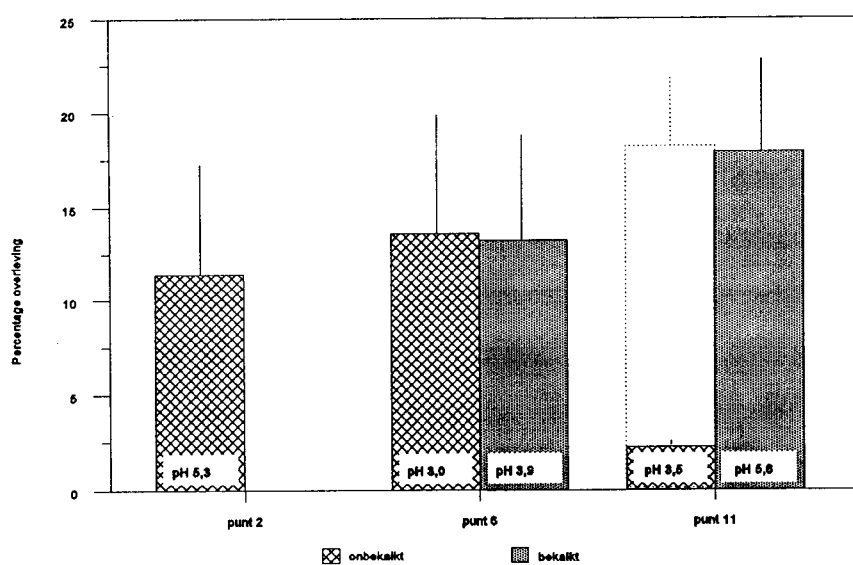
### Nematodenkweek

Reeds na drie weken vertoonden de kweken in de multidishes bij een temperatuur van 20°C ruimtegebrek. Omdat adulten na deze korte tijd individueel werden overgezet naar een nieuwe agardruppel, kon er nooit een stabiele leeftijdsopbouw ontstaan die nodig is voor de experimenten. Aangezien het niet mogelijk was om grote hoeveelheden nematoden in een multidish te kweken, werden delen van de oude agardruppels (met eieren en juvenielen) in zijn geheel overgezet op agar in petrischalen. Deze kweken bleken goed bruikbaar doordat ze niet zo snel uitdroogden en er weinig groeiremming door voedsel- of ruimtegebrek optrad.

### Toxiciteitstoets

In het enkelvoudig uitgevoerde voorexperiment werden van de 200 toegevoegde nematoden in Budel "schoon" 58 en in Budel "vuil" 22 exemplaren teruggevonden. Ook werden in beide gronden nematoden uit de natuurlijke fauna gevonden; deze hebben kennelijk de voorbehandeling van de grond (zie Hfst. 2) overleefd in anhydrobiotische toestand. Hierbij zijn *Rhabditidae*, typische kolonisten (Bongers, 1990), alleen in de vuile grond teruggevonden. Verder is in de vuile grond vooral *Aphelenchoides* sp. aangetroffen en in de schone grond vooral nematoden van het geslacht *Filenchus*.

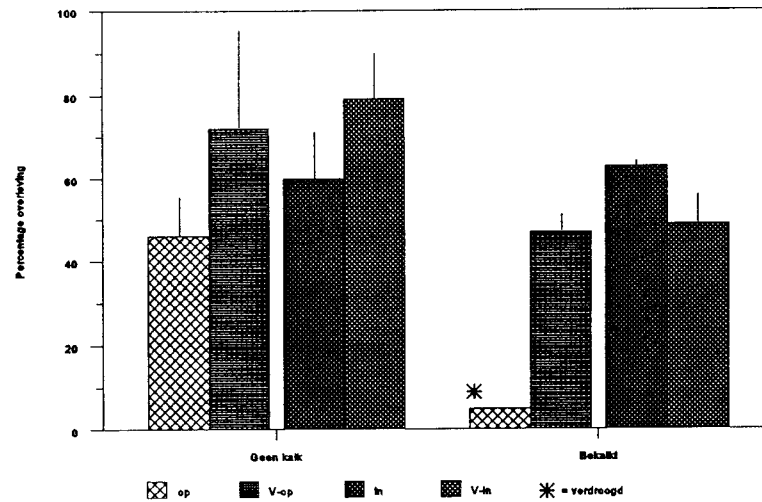
De resultaten van de tweede bioassay staan weergegeven in Figuur 8.1. Omdat vooral de middelvuile en de schone grond een lage pH vertoonden is aan deze gronden kalk toegevoegd om de pH op 5,5 te stellen. Het is echter bij dit experiment niet gelukt om de pH van de middelvuile grond (punt 6) van 3 op 5,5 te brengen. Alleen bij punt 11 lijkt het er in eerste instantie op dat de bekalking effect heeft gehad op de overleving. De toegevoegde nematoden waren afkomstig uit een kweek met pH 6 en mogelijk kan de overgang naar een lagere pH effect hebben gehad op het overlevingspercentage. Een soortgelijk effect zou dan echter ook verwacht worden bij punt 6, waar de pH in beide proefgroepen laag gebleven is.



Figuur 8.1. Gemiddeld overlevingspercentage van 100 nematoden na 7 dagen in drie Budelgronden (bekalkt of onbekalkt).

Uit een klein methodisch experiment met vergelijkbare behandelingen, dat tegelijkertijd is uitgevoerd, zijn resultaten beschikbaar die veel beter aan de verwachting voldoen, zie de stippellijn in Figuur 8.1. Als we aannemen dat deze suggestie correct is dan heeft de natuurlijke pH van de grond uit Budel geen effect op de overleving van de gekweekte nematoden. De resultaten lijken een trend aan te geven, waarbij meer nematoden worden teruggevonden naarmate de grond schoner wordt.

In dit experiment was de achtergrondsterfte veel te hoog voor een toxiciteitstoets. Daarom is een derde experiment uitgevoerd waarin een aantal mogelijkheden vergeleken zijn om het overlevingspercentage te optimaliseren. Tevens is het effect van bekalking nog eens bestudeerd. De resultaten zijn samengevat in Figuur 8.2. Hierin is te zien, dat er geen positief effect van



Figuur 8.2. Gemiddeld overlevingspercentage ( $n=3+sd$ ) van 100 nematoden na 7 dagen in 10 gram schone grond (bekalkt of onbekalkt), waarbij verschillende methodische aspecten zijn vergeleken (bekalken, beënten, voedsel). (op=op de grond gepipetteerd; V-op=met voedsel, op de grond gepipetteerd; in=in de grond gepipetteerd; V-in=met voedsel, in de grond gepipetteerd).

bekalking op de overleving van de nematoden lijkt te zijn.

Allen de verschillen tussen de onbekalkte behandelingen in dit experiment zijn getoetst m.b.v. een variantieanalyse. Hieruit blijkt dat er geen significante effecten aantoonbaar zijn van de wijze waarop de gronden met de nematoden zijn geënt. Beënting samen met voedsel heeft het grootste effect op het % overleving ( $F_{1,10}=5,09$ ;  $p=0,06$ ). Met de onderzochte behandelingen is inmiddels voldoende inzicht verkregen om de sterfte in toetssystemen tot een aanvaardbaar niveau terug te brengen.

### Conclusies

Om toxiciteitstoetsen en bioassays uit te voeren zijn grote hoeveelheden nematoden nodig met een stabiele leeftijdsopbouw. Dit blijkt heel goed mogelijk door populaties te kweken op agar in petrischalen. De nematoden overleven in de Budelgrond waarbij de overleving in vuile Budelgrond geringer lijkt dan in schone grond. De hoge sterfte bij de blanco's is door de resultaten van het tweede experiment grotendeels opgelost. Met dit onderzoek is een basis gelegd voor het uitvoeren van bioassays in Budelgrond op vergelijkbare wijze als uitgevoerd met de andere organismen, naast de reeds bestaande toetsen.

## 9. ARTHROPODEN: EFFECTEN VAN ZWARE METALEN IN KUNSTGROND EN VELDGROND, EN DE INVLOED VAN TEMPERATUUR EN VOCHT

E. C. Smit & C.A.M. van Gestel

Vrije Universiteit Amsterdam, Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie

### *Doelstelling en aanpak*

In de vergelijking tussen laboratorium en veld speelt o.a. de variatie in abiotische omstandigheden een rol, voorts worden dieren in het veld meestal blootgesteld aan combinaties van stoffen. Het onderzoek richt zich op deze aspecten met name voor arthropoden of geleedpotigen. Het effect van temperatuur en vochtgehalte op de gevoeligheid van *Folsomia candida* (Collembola) voor cadmium is onderzocht. De toxiciteit van de combinatie zink en cadmium is eveneens voor *F. candida* bestudeerd, ook in relatie tot de interne concentratie. Om een vergelijking tussen laboratorium en veld te kunnen maken zijn ook experimenten uitgevoerd waarbij gekeken is naar de overleving van *F. candida* in verschillende natuurlijke gronden.

### *Invloed van de temperatuur op de toxiciteit van cadmium voor Folsomia candida*

Een experiment is uitgevoerd in kunstgrond (10% turf, 20% kaolien klei, 70% zand, pH  $6,0 \pm 0,5$ ), met de springstaart *F. candida*. De springstaarten werden blootgesteld aan cadmium (4 concentraties en een controle) bij 13, 16, 19 en 22 °C. Wekelijks werd een deel van het experiment afgebroken, waarbij overleving, groei en aantal geproduceerde juvenielen werden bepaald. Tevens werd in de volwassen dieren het gehalte aan cadmium gemeten.

Helaas werd verzuimd het vochtgehalte van de grond tijdens de experimenten op peil te houden. Daardoor daalde het vochtgehalte in de tijd, en deze daling was sterker naarmate de temperatuur hoger was.

De  $LC_{50}$  nam toe bij afname van de temperatuur. De groei lijkt daarentegen juist gevoeliger bij lagere temperatuur. De  $EC_{50}$  voor de groei van de populatie (het aantal juvenielen) bleek niet afhankelijk van de temperatuur. Ook het cadmiumgehalte in de dieren vertoonde geen relatie met de temperatuur.

Geconcludeerd moet worden dat de resultaten niet eenduidig zijn, maar dat er wel een effect lijkt te zijn van de temperatuur. Omdat het vochtgehalte tijdens de proef is gedaald, is een



interactie tussen temperatuur en vochtgehalte niet uit te sluiten.

In december 1993 is een experiment gestart waarin wordt onderzocht wat de invloed is van de temperatuur op de kinetiek van zink en cadmium bij *F. candida*. Omdat er nog nauwelijks gegevens beschikbaar zijn over opname en excretie van zink door *F. candida*, is ervoor gekozen de dieren in eerste instantie via het voer bloot te stellen. Afhankelijk van de resultaten van dit onderzoek, zal later een kinetiekstudie in (kunst)grond worden uitgevoerd.

*Invloed van het bodemvochtgehalte op de toxiciteit van cadmium voor Folsomia candida.*

In een experiment in kunstgrond (zie boven), met de springstaart *F. candida*, werden de springstaarten blootgesteld aan cadmium (6 concentraties en een controle) bij vier verschillende vochtgehalten. Na 2, 4 en 6 weken werd een deel van het experiment afgebroken, om overleving, groei en aantal geproduceerde juvenielen te bepalen. Tevens werd in de volwassen dieren het gehalte aan cadmium gemeten.

Tabel 9.1 EC<sub>50</sub>-waarden voor het effect van cadmium op de groei van *Folsomia candida* in kunstgrond bij verschillende vochtgehalten.

vochtgehalte (% van het drooggewicht)	EC <sub>50</sub> (95% betrouwbaarheidsinterval) in µg/g droge grond		
	2 weken	4 weken	6 weken
25	87 (28-270)	279 (213-365)	514 (268-988)
35	138 (49-386)	434 (291-649)	434 (341-553)
45	353 (198-628)	322 (187-552)	226 (149-343)
55	303 (188-490)	145 (102-206)	300 (299-393)

Tabel 9.1 geeft de gemeten EC<sub>50</sub>-waarden voor het effect op de groei, Tabel 9.2 die voor het effect op de reproductie, terwijl in Tabel 9.3 de LC<sub>50</sub>-waarden voor de overleving van *F. candida* zijn weergegeven. Groei en overleving blijken niet te worden beïnvloed door het vochtgehalte, populatiegrootte wel. Een variantie-analyse (two-way ANOVA) toonde aan dat er sprake is van een significante interactie tussen cadmiumconcentratie en vochtgehalte voor wat betreft het effect op het versgewicht (4 en 6 weken) en drooggewicht (2, 4 en 6 weken). Voor de parameters reproductie en populatiegrootte blijkt er geen interactie tussen cadmium-

Tabel 9.2 EC<sub>50</sub>-waarden voor het effect van cadmium op de reproductie (4 weken) en populatiegrootte (6 weken) van *Folsomia candida* in kunstgrond bij verschillende vochtgehalten.

vochtgehalte (% van het drooggewicht)	4 weken	6 weken
25	77.8 (53.5-112.8)	64.8 (42.4-98.9)
35	49.4 (49.2-49.6)	68.0 (37.6-123.1)
45	46.1 (46.0-46.3)	76.5 (60.5-96.7)
55	69.7 (69.5-69.8)	81.6 (69.9-95.2)

Tabel 9.3 LC<sub>50</sub>-waarden voor het effect van cadmium op de overleving van *Folsomia candida* in kunstgrond bij verschillende vochtgehalten.

vochtgehalte (% van het drooggewicht)	2 weken	4 weken
25	> 2560	1423 (891-2272)
35	1340 (994-1806)	141 (76-261)
45	824 (591-1150)	814 (495-1338)
55	1216 (894-1656)	387 (297-504)

concentratie en vochtgehalte. De interne cadmiumgehalten nemen toe bij toenemende concentratie in de grond, maar een evenwichtssituatie wordt niet in alle gevallen bereikt. Vanwege een grote variatie in de gemeten interne concentraties, is het niet mogelijk een uitspraak te doen over correlaties tussen deze cadmiumconcentraties en het vochtgehalte van de grond.

Geconcludeerd kan worden dat het vochtgehalte de gevoeligheid van *F. candida* voor cadmium beïnvloedt. Het is echter niet duidelijk hoe en in welke mate dit gebeurt.

#### *Toxiciteit van cadmium en zink, alleen of in combinaties, voor Folsomia candida*

Een onderzoek werd uitgevoerd naar de combinatietoxiciteit van cadmium en zink voor *F. candida* in kunstgrond. Er werden toetsen uitgevoerd met cadmium en zink afzonderlijk, en met combinaties van beide metalen in equitoxische mengsels. Daarnaast werden ook enkele experimenten uitgevoerd met niet-equitoxische mengsels. Na 2, 4 en 6 weken werd een deel van de experimenten afgebroken, en werden overleving, groei en populatiegroei bepaald. Tevens werden dieren geanalyseerd om de gehalten aan cadmium en zink in het lichaam te kunnen

vaststellen.

De EC<sub>50</sub>-waarden voor het effect van cadmium en zink en de combinatie van cadmium en zink op de groei en populatiegroei van *F. candida* staan vermeld in Tabel 9.4.

Tabel 9.4 EC<sub>50</sub>-waarden met 95% betrouwbaarheidsinterval voor het effect van cadmium en zink, alleen of in combinatie, op de groei en populatiegroei van *Folsomia candida* in kunstgrond.

parameter	tijd (weken)	EC <sub>50</sub> in µg/g droge grond		EC <sub>50</sub> in TE
		cadmium	zink	
groei	2	275 (210-349)	1127 (778-1725)	0.80 (0.65-0.96)
	4	217 (176-269)	1202 (854-1690)	1.48 (1.36-1.60)
	6	264 (212-331)	1468 (1341-1606)	1.58 (1.43-1.60)
populatiegroei	4	37.4 (37.3-37.5)	625 (527-743)	0.76 (0.76-0.77)
	6	50.9 (40.9-63.4)	682 (546-854)	1.10 (1.09-1.10)

Na twee weken is de combinatiewerking van CdCl<sub>2</sub> en ZnCl<sub>2</sub> meer dan additief voor wat betreft de invloed op het drooggewicht (EC<sub>50</sub> = 0,80 TE). Na 4 en 6 weken blootstelling duiden de EC<sub>50</sub>-waarden voor individuele groei echter op een minder dan additieve werking van beide stoffen. Voor wat betreft populatiegroei na 6 weken blootstelling lijken de gegevens te wijzen op een additieve werking van CdCl<sub>2</sub> en ZnCl<sub>2</sub>. Voor een correcte berekening van de EC<sub>50</sub> uitgedrukt als TE, is het noodzakelijk dat de dosis-effectrelaties die voor ZnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> en combinaties van beide stoffen zijn bepaald gelijkvormig zijn. Dit was echter alleen het geval voor de individuele groei na 2 weken. De resultaten van de overige TE-berekeningen moeten daarom worden beschouwd als een indicatie voor de mate van additieve werking.

Uit de resultaten van de grondanalyses blijkt dat de hoeveelheid wateroplosbaar cadmium groter wordt door de toevoeging van zink. Dat zink in staat is andere ionen te verdringen van hun bindingsplaatsen, blijkt ook uit een daling van de pH bij toenemende zinkgehalten.

De interne concentraties cadmium in de dieren zijn vergelijkbaar met de waarden gevonden door Crommentuijn *et al.* (1993). Er is echter na 6 weken blootstelling nog geen evenwichtsconcentratie bereikt. De bepaling van zink in *F. candida* blijkt erg gevoelig te zijn, waardoor de spreiding in de gemeten concentraties aanzienlijk is. Bij de dieren die aan de laagste concentratie zijn blootgesteld, ligt de interne concentratie in dezelfde orde van grootte als de achtergrondniveau's die in eerder onderzoek bij *Orchesella cincta* zijn gemeten (Posthuma, 1990).

*Relatie tussen cadmiumtoxiciteit en interne concentratie in Folsomia candida.*

Door Crommentuijn *et al.* (1993) is een studie uitgevoerd naar de toxiciteit van cadmium voor *F. candida* in kunstgrond (zie boven). In dit experiment werden effecten op overleving, groei en populatiegroei vastgesteld, en werden bovendien gehalten aan cadmium in de dieren gemeten. De toets duurde 9 weken. Uit enkele andere toetsen bleek dat *F. candida* bij blootstelling via het voer (gist) erg ongevoelig is voor cadmium ( $LC_{50} > 10.000 \mu\text{g/g}$  voer).

Om een vergelijking te kunnen maken tussen beide blootstellingsroutes werden twee experimenten uitgevoerd, waarbij *F. candida* via het voer werd blootgesteld aan cadmium. In een experiment werden juvenielen gedurende 9 weken blootgesteld en werden effecten op de groei gemeten; daarnaast werd wekelijks een deel van de dieren bemonsterd en geanalyseerd op gehalte aan cadmium in het lichaam. In het andere experiment werden juvenielen aan dezelfde cadmiumconcentraties blootgesteld en werd het effect op de grootte en levensvatbaarheid van het eerste legsel bepaald.

Tabel 9.5 geeft de resultaten van dit experiment weer en tevens een vergelijking met de resultaten van Crommentuijn *et al.* (1993). Uit deze tabel kan worden afgeleid, dat er een groot verschil is in externe effectconcentraties: er moet ca. 10 maal meer cadmium aan voer van *F. candida* worden toegediend dan aan grond om eenzelfde mate van effect te krijgen. Er is echter geen verschil in de snelheid waarmee het cadmium wordt opgenomen;

Tabel 9.5 Effect van cadmium op groei en reproductie van *Folsomia candida* bij blootstelling via voer en via kunstgrond.

parameter	voer (gist)	grond
eerste effect op groei (LOEC)	3000 $\mu\text{g/g}$ dw.	326 $\mu\text{g/g}$ dw.
EC <sub>50</sub> groei (35/36 dagen)	3180 $\mu\text{g/g}$ dw. (2732-3712)	807 $\mu\text{g/g}$ dw. (733-888)
tijd nodig om accumulatie-evenwicht te bereiken	15-22 dagen	ca. 20 dagen
laagste interne concentratie met effect op reproductie	219 $\mu\text{g/g}$ bw.	191 $\mu\text{g/g}$ bw.

onafhankelijk van de blootstellingsroute wordt na ca. 20 dagen evenwicht bereikt. Opvallend is dat beide blootstellingsroutes tot vrijwel dezelfde interne effect-concentratie leiden: bij ca. 200  $\mu\text{g/g}$  cadmium in het dier worden effecten op de reproductie waargenomen.

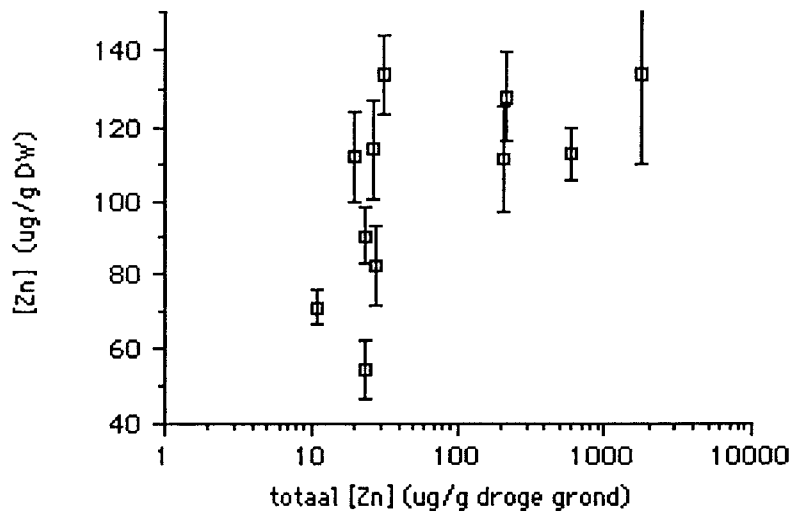
Geconcludeerd kan worden dat de interne concentratie aan cadmium in *F. candida*

onafhankelijk is van de blootstellingsroute en een goede indicator is voor het optreden van effecten.

### *Experimenten met *Folsomia candida* in natuurlijke grond en Budelgrond.*

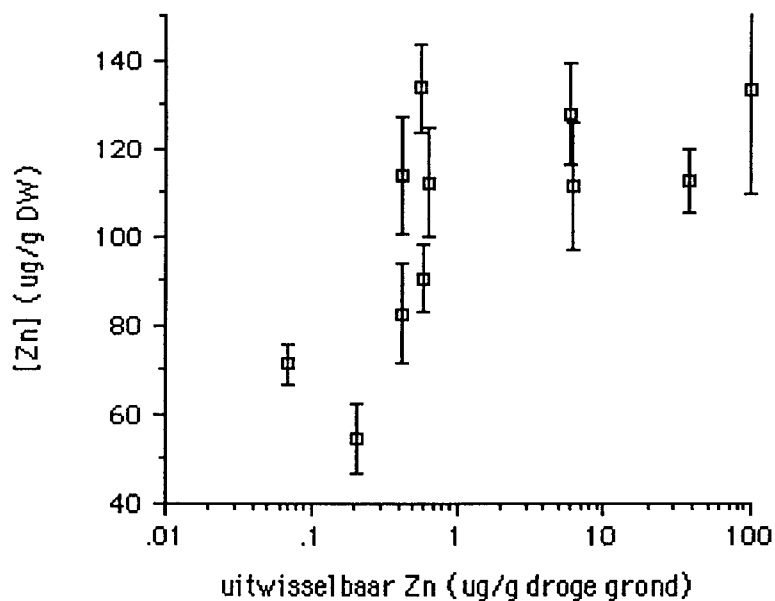
De toxiciteitstoetsen met *F. candida* worden normaliter uitgevoerd in kunstgrond en er is nog weinig ervaring met de toepassing van deze standaardtoets in natuurlijke grond. Daarom is een aantal experimenten uitgevoerd met verschillende natuurlijke, schone gronden. Hieruit is gebleken dat de pH van grote invloed is op de overleving van *F. candida*. Bij een  $\text{pH} \geq 7$  is er geen overleving en vindt er evenmin reproductie plaats. Naast de pH heeft ook de structuur van de grond invloed. In Kooyenburggrond ( $\text{pH} = 4,8$ ) wordt alleen overleving en reproductie gevonden als de pH op 6,0 wordt gebracht en het vochtgehalte laag wordt gehouden. Een vochtgehalte van 50 % van de WHC (het vochtgehalte dat voor kunstgrond wordt gebruikt) levert een te compact substraat. Een andere grond, met  $\text{pH} = 6$  en een "luchtige" structuur, gaf geen problemen.

Van bovengenoemde ervaringen is gebruik gemaakt bij het uitvoeren van een experiment in de Budelgronden van de gradiëntbemonstering. De pH is op een waarde van 5,5-6,2 gebracht, het vochtgehalte op 40 % van de WHC. Uit de resultaten blijkt dat na 2 weken blootstelling nog geen grote verschillen in overleving zijn opgetreden. Na 4 weken blootstelling vertoont de overleving in de lokaties 4 t/m 11 een grote spreiding. In de lokaties 1, 2 en 3 is de spreiding minder en is de overleving hoger. De reproductie is bepaald na 4 en 6 weken blootstelling. Hier werd evenmin een nadelig effect waargenomen in de lokaties 1, 2 en 3, het aantal juvenielen is zeker niet kleiner dan in de andere behandelingen. Er is na 2, 4 en 6 weken geen correlatie tussen afstand tot de fabriek en vers- en drooggewicht. Uit de resultaten van de analyses van de afzonderlijke dieren blijkt dat er wel een relatie is tussen de interne zinkconcentratie van de dieren na 4 weken en de concentratie zink in de grond (Figuur 9.1 t/m 9.3). De gehalten in de dieren die blootgesteld zijn aan grond van lokatie 1 t/m 5 liggen echter dicht bij elkaar. Bovendien vertonen de dieren binnen de blootstellingsgroepen een behoorlijke spreiding.

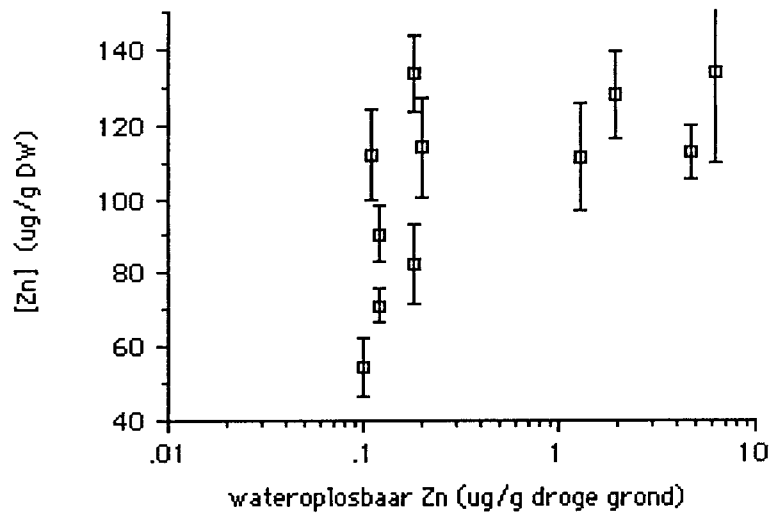


Figuur 9.1. Interne concentratie van zink in *Folsomia candida* als functie van de totale concentratie zink in Budelgronden, na 4 weken blootstelling.

Geconcludeerd kan worden dat de Budelgrond niet geschikt is om de effecten van een bestaande verontreiniging te evalueren. De samenstelling van de schone grond is waarschijnlijk niet optimaal voor *F. candida*. De eventuele effecten van zware metalen kunnen daarom niet worden onderscheiden van de negatieve invloed van andere bodemfactoren.



Figuur 9.2. Interne concentraties van zink in *Folsomia candida* als functie van de uitwisselbare zinkfractie in Budelgronden, na 4 weken blootstelling.



Figuur 9.3. Interne concentratie van zink in *Folsomia candida* als functie van de wateroplosbare zinkfractie in Budelgronden, na 4 weken blootstelling.

#### *Experimenten met Orchesella cincta*

Om de blootstelling van dieren via het voer te bestuderen, was in eerste instantie gekozen voor de pissebed *Porcellio scaber* als toetsorganisme. Omdat *P. scaber* grote hoeveelheden cadmium kan accumuleren zonder noemenswaardige effecten te ondervinden, is ervoor gekozen verder te werken met de springstaart *O. cincta*. Het gebruik van *O. cincta* heeft als voordeel dat het dier verwant is met *F. candida*, maar hoofdzakelijk via een andere route wordt blootgesteld. Dit maakt een vergelijking van interne effectconcentraties interessant. Bovendien komt *O. cincta*, in tegenstelling tot *F. candida*, wél voor in Budel. Omdat er voor *O. cincta* nog geen standaard toets beschikbaar is, is validatie echter nog niet aan de orde. Voorlopig blijft de aandacht daarom gericht op het valideren van de toets met *F. candida*.

## 10. EFFECTEN VAN METALEN OP DE SAMENSTELLING VAN DE NEMATODEN-FAUNA LANGS EEN VERONTREINIGINGSGRADIËNT TE BUDEL.

A.J. Schouten, M. van Esbroek, R. Alkemade & P. Kersten.

RIVM, Laboratorium voor Bodem en Grondwateronderzoek.

### *Doelstelling en achtergrond*

Nematodenonderzoek ter validatie van risicogrenzen heeft langs twee wegen plaats gevonden: experimenteel laboratoriumonderzoek en veldonderzoek. Dit hoofdstuk handelt over het veldonderzoek aan de verontreinigingsgradiënt te Budel. De samenstelling van de nematodenfauna langs deze gradiënt is onderzocht, waarbij de schone grond aan het einde van de gradiënt als referentie fungeerde.

Nematoden zijn geschikte bodemorganismen voor dit type onderzoek, omdat zij door een permeabele cuticula in direct contact staan met het capillaire bodemwater. Van bepaalde soorten is aangetoond, dat ze gevoelig zijn voor milieuvreemde stoffen en verstoringen. Bovendien vormen nematoden de meest dominante groep van de meercellige dieren in de bodem. Zij komen algemeen in hoge dichtheden in de bodem voor en zijn in Nederland in zo'n 800 verschillende soorten te onderscheiden. De nematodenfauna is vrij gemakkelijk te bemonsteren, in ieder seizoen (Bongers, 1988).

### *Materiaal en methoden*

De veldbemonstering is uitgevoerd op 11 maart 1993 in Budel op verschillende afstanden van de zinksmelterij door monsters te nemen van de minerale bodem op 11 lokaties langs de gradiënt (zie Hfst. 2). In dit onderzoek is punt 1 niet in beschouwing genomen, omdat een laag grond met plastic en stenen op de bodem was gestort. Door op de isoconcentratielijnen, grond van de bovenste 10 cm te verzamelen, werden grote hoeveelheden materiaal per bemonsteringspunt verkregen. Hieruit werd een mengmonster van 500 gram gemaakt (Kersten, 1993). De nematodenfauna werd uit twee maal 150 gram grond van elk monsterpunt geëxtraheerd volgens de Oostenbrinkmethode. De nematodendichtheid werd bepaald en na fixatie werd de soortensamenstelling vastgesteld.

Met behulp van lineaire regressie analyse, Principal Component Analysis (PCA) en correlatie

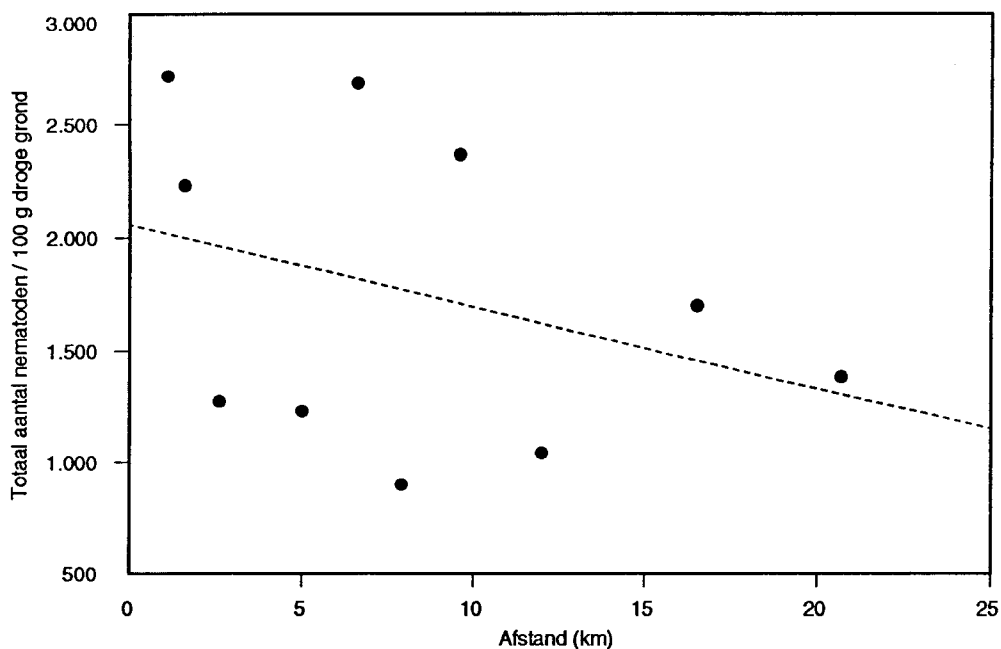


analyse werd gezocht naar relaties tussen de nematodenfauna en metaalgehalten.

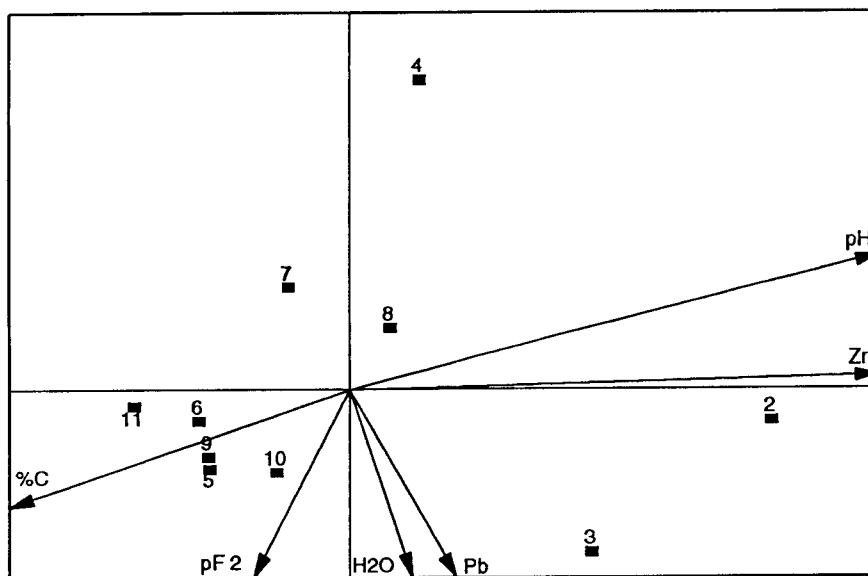
### *Resultaten en discussie*

De totaalgehalten van de metalen koper, cadmium, en lood zijn zeer sterk gecorreleerd met het gehalte aan zink. De extraheerbare fracties van koper en zink zijn gecorreleerd met de totaal gehalten, dit geldt niet voor lood. Dit geeft de mogelijkheid om extraheerbaar lood en de overige extraheerbare fracties als twee onafhankelijke factoren te bekijken.

Uit de bodemanalyses (Hfst. 2) blijkt ook dat er aanzienlijke pH-verschillen zijn tussen de gronden, waarbij de meest vuile gronden een hogere pH hebben dan de schone gronden. Het is niet duidelijk of de hogere pH van de gronden in de nabijheid van de fabriek veroorzaakt is door bekalking (bijvoorbeeld om effecten van metalen tegen te gaan) of een gevolg is van depositie van basische verbindingen die samen met de metalen zijn uitgestoten. Zowel voor de bodemchemische aspecten, als voor de beschrijving van biologische effecten is dit een lastige bijkomstigheid.



Figuur 10.1. Totale aantallen nematoden per 100 gram droge grond uitgezet tegen de afstand tot de zinksmelterij (km) (regressielijn niet significant).



Figuur 10.2. PCA-ordinatiediagram van alle nematodensoorten. Posities van de Budelgronden berekend op basis van soortensamenstelling. Omgevingsvariabelen zijn met pijlen aangegeven.

In Figuur 10.1 is het totale aantal nematoden per 100 gram droge grond uitgezet tegen de afstand tot de fabriek. In tegenstelling tot de verwachting, dat de nematodenaantallen zouden toenemen met het groter worden van de afstand, lijkt er eerder een afname te zijn, maar deze trend is niet significant. Met een PCA is getracht een relatie te vinden tussen de metaalconcentraties en het voorkomen van de ca. 36 nematodensoorten (Figuur 10.2). Het lijkt erop dat de nematodenfauna in de eerste plaats samenhangt met pH of extraheerbaar Zn (as 1), terwijl de tweede as vrijwel samenvalt met extraheerbaar Pb en vochtgehalte. De effecten van zware metalen kunnen daardoor niet onafhankelijk van bodemeigenschappen worden bepaald. De lokaties 2 en 3 (dichtst bij de fabriek) wijken af qua soortensamenstelling, ze liggen tevens duidelijk in de richting van toenemende zinkconcentraties en pH.

Van een aantal van de meest voorkomende nematodensoorten is een correlatie tussen de abundantie en extraheerbaar zink en lood berekend. De resultaten zijn samengevat in Tabel 10.1. Slechts bij één soort (*Wilsonema spec.*) kon een significant negatief verband met zink worden aangetoond.

### Conclusie

De afwijkende soortensamenstelling van de twee meest vervuilde lokaties t.o.v. de andere lokaties geeft aan, dat de nematodenfauna een bruikbaar instrument is om effecten weer te geven. Echter, door de relatie tussen hogere pH en metaalgehalten, zijn deze effecten niet

Tabel 10.1 Correlatie coëfficiënten tussen log aantallen van nematodengenera en extraheerbare gehalten Zn en Pb (mg/kg).  
(\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ).

Soort	zink	lood
<i>Acrobeloides</i> sp.	0.05	0.64*
<i>Aphelenchoides</i> sp.	-0.43	0.34
<i>Cervidellus</i> sp.	0.65*	-0.01
<i>Filenchus</i> sp. (lang)	-0.25	0.82**
<i>Filenchus</i> sp. (stomp)	-0.04	0.49
<i>Plectus</i> sp.	-0.42	0.30
<i>Wilsonema</i> sp.	-0.89**	-0/14

aantoonbaar veroorzaakt door zware metalen. De monsterpunten kunnen immers ook afwijken omdat daar de pH hoger is. Daarnaast wordt de beschikbaarheid van metalen door de pH beïnvloed, of kan een gezamenlijk effect de oorzaak zijn.

Een vergelijking tussen effectniveau's, zoals te verwachten op basis van laboratorium-onderzoek, met aanwezigheid en abundantie van nematoden langs een verontreinigings in het veld, wordt gecompliceerd doordat toxische effecten van zware metalen niet los gezien kunnen worden van bodemfysische en -chemische factoren.

## 11. VERSLAG DISCUSSIE PROJECTVERGADERING (28 SEPTEMBER 1993)

E.C. Smit

Vrije Universiteit Amsterdam, Vakgroep Oecologie en Oecotoxicologie

### *Inleiding*

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op de discussies die zijn gevoerd naar aanleiding van de resultaten van de verschillende deelonderzoeken. De discussie spitste zich toe op de volgende vragen:

1. Hoe kan de invloed van pH(-verschillen) worden verminderd ?
2. Op welke manier past het nematodenonderzoek in het totale project ?
3. Hoe wordt het proefveldonderzoek zodanig ingericht dat het past in de verbinding van laboratorium naar veld ?

### *Invloed van pH*

Bij de toetsen met o.a. *Pseudomonas putida* is de pH van grote invloed op de gevonden resultaten. In grond wordt de toxiciteit van zink bepaald door de resultante van twee evenwichten: sorptie aan de bacteriewand en sorptie aan de gronddeeltjes. De complexiteit van deze interacties blijkt uit het feit dat de verschillen in toxiciteit niet verklaard kunnen worden met behulp van de concentraties in het bodemvocht. De invloed van sorptie aan de bacteriewand was al gebleken uit de resultaten van de experimenten met  $ZnCl_2$  in Tris-buffer: de  $IC_{50}$  bij pH=7 was lager dan bij pH=5. De overleving van *P. putida* blijkt ook rechtstreeks te worden beïnvloed door de pH. In schone Budelgrond werd geen overleving gevonden, terwijl in vuile Budelgrond met hogere pH een toename van het aantal bacteriën werd geconstateerd.

De overleving van de nematode *Plectus acuminatus* in een labtoets met Budelgrond is niet afhankelijk van de pH, maar de totale overleving is erg laag. Voor de resultaten van het beschrijvende veldonderzoek aan nematoden geldt echter dat de pH, samen met andere omgevingsfactoren de variatie in soortensamenstelling voor 77 % kan verklaren. Eventuele effecten van metalen kunnen dan ook niet worden losgekoppeld van een pH-effect.

De vraag is of het beter zou zijn de toetsen uit te voeren onder omstandigheden die voor het betreffende organisme optimaal zijn. Het is echter waarschijnlijk dat er altijd verschillen zullen zijn

in de optima, niet alleen voor wat betreft de pH, maar ook voor andere bodemkarakteristieken. Daarom lijkt het vooralsnog beter om die pH te kiezen die voor de meeste organismen min of meer optimaal is, pH=5,5 à 6. In geval voor een organisme bekend is wat de (negatieve) invloed van de pH is, kan er voor eventuele verschillen gecorrigeerd worden.

#### *Aansluiting van het nematodenonderzoek*

Tot nog toe is voor de nematoden een andere benadering gekozen dan voor de andere organismen, namelijk beschrijvend veldonderzoek in Budel. Hierboven is al aangegeven dat effecten van zware metalen in het veld meeilijk aantoonbaar zijn. Om aan te sluiten bij de (standaard) laboratoriumtoetsen die met de andere organismen kunnen worden uitgevoerd, zijn drie strategieën denkbaar:

- (1) Met de nematoden de aandacht te richten op het ontwikkelen en uitvoeren van laboratoriumtoetsen in grond. Met een dergelijke toets zou de invloed van onder andere de pH beter kunnen worden onderzocht. Bij de vakgroep Nematologie van de LUW (J. Kammenga) is zo'n toets in ontwikkeling. Gezien de grote (tijds)investeringen die nodig zijn om dergelijke toetsen te ontwikkelen, lijkt deze optie voor het Validatieproject vooralsnog niet wenselijk.
- (2) Uitwijken naar een andere metaalverontreinigde veldlocatie waar het pH-probleem geen, of een ondergeschikte, rol speelt. De veldwaarnemingen voor de nematoden zullen dan beter door metaalgehalten kunnen worden verklaard en de kans is groter dat ook voor de andere organismen een duidelijkere koppeling tussen lab.- en veldwaarnemingen gevonden wordt. Dit betekent wel dat voor alle organismen toetsen met een nieuwe gradiënt moeten worden uitgevoerd. Dit is op zichzelf geen bezwaar, de resultaten van Budel kunnen dan in een breder kader worden geplaatst. Het feit dat voor de analyses van de grond minimaal een half jaar moet worden gerekend, is wel problematisch. Naast deze praktische bedenkingen is het goed voorstelbaar en zelfs zeer waarschijnlijk dat op een andere locatie andere bodemfactoren de effecten van metalen zullen beïnvloeden. Niettemin kan, voorlopig nog slechts op papier, worden uitgekeken naar geschikte lokaties. Wanneer een gradiënt wordt gevonden, kan een beperkt vooronderzoek worden uitgevoerd.
- (3) Vooralsnog de meest haalbare mogelijkheid is te proberen het proefveld te gebruiken als tussenstation. De grond die wordt gebruikt om een concentratiereeks te maken, zal, mits

niet te rigoureuus behandeld, geschikt zijn voor nematodenmonsterring. De monsterring kan worden uitgevoerd zonder de andere opstellingen te verstoren. Op deze manier kan de ontwikkeling van de nematodenpopulatie in de tijd en in verschillende belaste situaties worden gevolgd, onder omstandigheden die ook gelden voor de andere organismen.

### *Inrichting proefveld*

Voor de inrichting van het proefveld is het belangrijk te weten welke vragen ten grondslag liggen aan dit deel van het project. De centrale vraag waar het validatieproject zich op richt luidt: "*Zijn organismen in het veld even gevoelig als in het lab, bij een gelijke blootstelling aan zware metalen?*". Voor het beantwoorden van deze vraag zijn twee benaderingen mogelijk.

In de eerste benadering wordt geprobeerd het begrip "gelijke blootstelling" duidelijk te krijgen. Hier draait het om de verschillen in biologische beschikbaarheid die bestaan tussen kunstmatige en natuurlijke substraten en tussen oude en nieuwe vervuilingen. Wanneer deze invalshoek wordt gekozen, zou het denkbaar zijn het proefveld in te richten met verschillende natuurlijke gronden, waarvan enkele kunstmatig worden vervuild. Hier wordt echter impliciet aangenomen dat de interne effectconcentratie van een organisme in het lab gelijk is aan die van hetzelfde organisme buiten.

De tweede benadering richt zich op dit probleem, en daarmee op het begrip "even gevoelig" uit de hoofdvraag. Anders gezegd wordt hier de vraag gesteld: is de interne effectconcentratie van een organisme bij blootstelling in het lab. gelijk aan die bij blootstelling onder veldcondities. Om een antwoord te vinden op deze vraag, kan het proefveld worden gebruikt om een dosis-effectrelatie op te stellen onder buiten-omstandigheden. Om de link met de natuurlijke situatie te leggen, wordt gebruik gemaakt van een natuurlijk substraat, dat wat betreft de bodemkundige eigenschappen zoveel mogelijk lijkt op grond uit Budel.

De meeste deelnemers geven de voorkeur aan de tweede benadering, die vooralsnog minder risico's lijkt in te houden dan de eerste. Er wordt dan ook besloten in het proefveld een concentratiereeks aan te brengen, waarbij als substraat een natuurlijke grond wordt gebruikt die een pH van ongeveer 6 heeft en wat betreft andere bodemeigenschappen (organisch stofgehalte, kleigehalte) op de Budelgrond lijkt.

Voor de aan te brengen verontreiniging bestaat de keuze tussen zink en cadmium. Cadmium heeft als voordeel dat het een niet-gereguleerd metaal is: voor veel organismen is er een goede

relatie tussen de gehalten in de bodem en de interne concentratie. Voor zink zal deze relatie minder eenvoudig zijn vast te stellen. Bovendien is de analyse van cadmium eenvoudiger dan die van zink. In Budel is zink echter dominant aanwezig en effecten zijn dan ook voor een groot deel toe te schrijven aan zink. Daarom is besloten in het proefveld met zink te werken, ondanks bovengenoemde nadelen. Verdere details over de inrichting van het proefveld zullen eind 1993/begin 1994 worden uitgewerkt.

## 12. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

### *Conclusies*

#### Typen van onderzoek

De in het kader van het Validatieproject uitgevoerde experimenten kunnen geordend worden naar de mate van complexiteit ofwel de mate waarin experimentele controle mogelijk is (Tabel 12.1). De karakteristieken en mogelijkheden van de verschillende complexiteits-niveaus kunnen sterk verschillen. In gestandaardiseerde laboratoriumtoetsen zijn de mogelijkheden voor experimentele controle het grootst, bij veldwaarnemingen zijn deze het laagst.

Tabel 12.1 De verschillende typen van onderzoek gerangschikt naar toenemende mate van complexiteit en afnemende mogelijkheid voor experimentele controle.

- 
1. Laboratoriumtoets (min of meer gestandaardiseerd)
  2. Laboratoriumtoets uitgevoerd in natuurlijke grond met bestaande of toegevoegde verontreiniging
  3. Standaardtoetsen uitgevoerd onder veldcondities
  4. Proefveldexperiment
  5. Veldexperiment
  6. Veldwaarnemingen
- 

Bij het afnemen van mogelijkheden tot experimentele controle (van niveau 1 tot 6 in Tabel 12.1) neemt het aantal biotische en abiotische variabelen dat bijdraagt aan de eventuele verschillen tussen de typen van onderzoek toe. Daarmee verandert het karakter van de vraagstelling, de gebruikte technieken, en de gegenereerde gegevens. Dit houdt in dat bij volledig gestandaardiseerde proeven (1) met name experimentele manipulaties uitgevoerd kunnen worden om het effect van één factor (bijvoorbeeld: pH) op de toxiciteit van een metaal te onderzoeken. Zo mogelijk worden gevonden effecten ook nog theoretisch verklaard, waardoor de invloed van omgevingsfactoren op de toxiciteit (min of meer) voorspeld kan worden. Aan het andere eind van het spectrum staan multivariate technieken ter beschikking om de lokatiespecifieke patronen in de verzamelde gegevens te analyseren. Dit heeft vrijwel altijd een exploratief en beschrijvend karakter, bijv. "...bij de gegeven dataset, *en bij de gemeten parameters*, kan de waargenomen variatie in de soortensamenstelling in het veld gecorreleerd worden aan de parameters pH en Zn....". Correlaties en daarmee verwante parameters hoeven geen oorzakelijk verband aan te



duiden, zij kunnen echter wel bijdragen oorzakelijke om verbanden op het spoor te komen.

Het streven naar een volledige verklaring van de verschillen (en overeenkomsten) tussen laboratoriumtoetsen en optredende effecten in het veld leidt tot gedetailleerd onderzoek naar de effecten van allerlei (a)biotische parameters op de toxiciteit. Het resultaat van dit experimentele onderzoek zal uiteindelijk mogelijkheden bieden om het relatieve belang van de verschillende parameters aan te geven en de belangrijkste mee te wegen in de risicoschatting. Dit betreft uitsluitend de fase waarin toxiciteitsgegevens omgerekend worden naar een standaard bodem, analoog aan de huidige procedures met de bodemcorrectiefactoren "organische stof" en "lutum".

Na deze berekeningen volgt echter nog immer de vraag naar de betekenis van de gecorrigeerde getallen voor de risico's voor soorten en ecosystemen die op verontreinigde lokaties voorkomen. Veldwaarnemingen (6) zijn noodzakelijk om deze stap uiteindelijk te kunnen maken: waarnemingen in het veld zijn immers waarnemingen aan de volledig geïntegreerde respons van levensgemeenschappen op blootstelling aan toxische stoffen en op overige stress-factoren. Deze stap raakt aan de vragen uit de volgende fase van het Validatieproject, betreffende de representativiteit van m.b.v. extrapolatiemodellen geschatte risicogrenzen en de consequenties voor het oecosysteem van overschrijding van de NOEC voor een bepaald percentage soorten. Bij de toepassing van methode 6 (Hfst. 10) bleek bijvoorbeeld, dat extraheerbaar Zn *tesamen met* de pH (van de gemeten parameters) de belangrijkste determinanten waren voor de waargenomen soortenverdeling van nematoden in de omgeving van Budel.

De conclusie uit het voorgaande is, dat voor een volledige studie naar de validatie van risicogrenzen en toxiciteitsgegevens beide typen onderzoek noodzakelijk zijn. De tussenliggende typen van onderzoek (waaronder het gecontroleerde onderzoek in een proefveld, en de standaard toets onder buitencondities) zijn noodzakelijk om de interpretatie van de veldwaarnemingen uit laboratoriumgegevens mogelijk te maken.

#### Stand van zaken per type onderzoek

Met de gekozen soorten zijn op de onderzoeksniveaus (1) en (2) (Tabel 12.1) inmiddels experimenten uitgevoerd, of voorgenomen. Laboratoriumtoetsen met een min of meer gestandaardiseerde opzet zijn inmiddels met het grootste gedeelte van de beschikbare toetssoorten uitgevoerd (of in uitvoering), met de metalen zink en cadmium (apart of in combinatie). Opvallend aan de resultaten is dat de bijdrage van cadmium aan de waargenomen effecten gering geacht

wordt, o.a. bij planten, bacteriën, potwormen en compostwormen. Dit wordt afgeleid uit de vergelijking van beschikbare toxiciteitsgegevens voor cadmium met de in Budelgrond maximaal aangetroffen concentraties. De bijdrage van zink aan de waargenomen toxische effecten wordt, op basis van eenzelfde redenering, het grootst geacht. Desondanks is het niet uit te sluiten dat de combinatie van zink met de andere metalen uiteindelijk de optredende effecten het best kan verklaren. Dit blijkt met name uit resultaten verkregen met de compostworm, waarbij diverse binaire metaalmengsels minder dan concentratie-additief werkzaam waren, en waarbij Budelgrond minder reproductieremming veroorzaakte dan verwacht werd op grond van de totaalgehalten aan metalen. De combinatie-effecten bij de springstaart, waarbij zowel additiviteit als non-additiviteit optrad, kunnen nog niet op vergelijkbare wijze vergeleken worden met de effecten optredend in Budelgrond.

Verschillende toetsen zijn uitgevoerd waarbij de centrale vraag: "*Zijn organismen in het veld even gevoelig als in het laboratorium, bij een gelijke blootstelling?*" opgesplitst is in:

- Deelvragen naar het optreden van verschillen die ontstaan door:

- a. Combinatiewerkingen. Onderzoek, waarbij specifiek naar concentratie-additiviteit gekeken wordt, is in voortgang bij *Folsomia candida*, *Eisenia andrei*, *Enchytraeus* sp. en *Trifolium pratense*, waarbij geconcludeerd werd dat combinatiewerkingen op kunnen treden. In algemene zin kunnen combinatie-effecten dus (deels) verantwoordelijk zijn voor lab-veld verschillen.
- b. Abiotische factoren. Onderzoek is in voortgang bij *Folsomia candida*, wat betreft de factoren temperatuur en vochtigheid, waarbij geconcludeerd werd dat deze factoren de gevoeligheid kunnen beïnvloeden, mogelijk via interne concentraties (zie d).

- Deelvragen gericht op het vaststellen van de relatie tussen:

- c. Experimentele factoren/bodemkenmerken en de biobeschikbaarheid van metalen.
- d. Interne concentratie (in het organisme) en de toxiciteit, eventueel onder invloed van abiotische factoren (meervoudige stress).

De deelvragen c en d maken deel uit van de meeste experimenten. In de meeste uitgevoerde experimenten komt "biobeschikbaarheid" naar voren als belangrijke parameter die de verschillen tussen lab.- en veldtoxiciteit van metalen grotendeels verklaart. Biobeschikbaarheid van metalen raakt aan fundamentele milieuchemische en milieutoxicologische vragen waaraan ook in ander

verband aandacht wordt besteed (projecten: "Evenwichtspartitie", "Bodemcorrectiefactoren").

Binnen de huidige opzet wordt gewerkt met verschillende bodemorganismen, die elk gekenmerkt worden door een eigen opnameroute voor metalen. Verwacht wordt dat de dominante opnameroute via het bodemvocht loopt bij planten, bacteriën, wormachtigen, nematoden en mogelijk springstaarten. De opname-route via het voer is hiermee binnen de huidige opzet onderbelicht. De oorzaak moet gezocht worden in het feit dat de meeste toetsen ontwikkeld zijn voor (kunst)grond waaraan de te onderzoeken stoffen worden toegevoegd, en waarbij onbelast voer wordt gebruikt. De mogelijkheden om de verhouding tussen lab.- en veldtoxiciteit te bestuderen in relatie tot de verschillende opnameroutes van contaminanten in de bodem zijn hierdoor momenteel beperkt.

De achterliggende gedachte bij het onderzoek naar de relatie tussen interne concentratie en toxiciteit is dat het uitwendige totaalgehalte een slechte leidraad naar effecten is, dat verschillende extraheerbare fracties een chemische benadering geven van het biobeschikbare deel van het totaalgehalte, maar dat de beste leidraad gevormd wordt door de interne concentratie. Dit principe blijkt het beste uit de resultaten met *F. candida*, waar een bepaald effect bereikt kon worden bij sterk verschillende externe concentraties en verschillende opname routes, maar waarbij de interne concentraties min of meer gelijk waren.

Experimenten, waarin afgeweken wordt van het standaard protocol door hetzij de toets buiten uit te voeren, hetzij de toets met natuurlijk substraat uit te voeren, zijn voor een groot gedeelte gebaseerd op de analyse van dosis-responsrelaties. De meeste toetsen zijn uitgevoerd met natuurlijke gronden van de Budelgradiënt, waarbij voor sommige soorten de kweekbaarheidstoetsing nog in voortgang is.

Dosis-responsrelaties worden opgesteld door de prestatiegraad van een soort te meten in een serie gronden, met zoveel mogelijk concentraties aan verontreinigde stoffen waardoor observaties aan de extremen "geen-effect" en "totale remming" worden nagestreefd. Door deze aanpak kunnen dosis-effectrelaties gebaseerd op veldgronden vergeleken worden met laboratorium dosis-effect relaties. Eveneens komt aansluiting bij de risicoschattingsmethodiek (invoerwaarden: NOEC's) tot stand doordat ook waarnemingen op het niveau van de NOEC in de opzet worden betrokken.

Een bemonsteringstechnisch probleem bij deze z.g.n. "dynamische aanpak" is dat soorten verschillende  $EC_{50}$ 's hebben. Omdat de beste fit van het gebruikte logistische model verkregen

Tabel 12.2 Overzicht stand van zaken per type van onderzoek.

Type onderz.	<i>acetataat-mineralisatie</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>glutaminezuur-afbraak</i>	<i>Eisentia andrei</i>	<i>Enchitraeus sp.</i>	Planten	<i>Plecticus acuminatus</i>	Nematoden	<i>Folsomia candida</i>
1.	Zn en Cd toxiciteit verschillende gronden	Zn en Cd toxiciteit in tris-buffer en OECD-medium	Zn en Cd toxiciteit in standaard grond	Zn, Cd, en Zn+Cd toxiciteit OECD-medium	Zn en Cd toxiciteit in OECD-medium	phytotoxiciteitsgegevens Cd en Zn niet beschikbaar voor de geselecteerde soorten	Cd en Zn toxiciteit bekend	Zn, Cd, en Zn+Cd	reproductie exp. in kunstgrond
2.	Budelgrond vooronderzoek	Budelgrond vooronderzoek	reproductie experiment Budelgradient	reproductie experiment <i>E. crypticus</i> Budelgradient	reproductie experiment <i>E. crypticus</i> Budelgradient	groeiexperiment <i>V. sativa</i> en <i>L. perenne</i> Budelgradient; bestaande en toegevoegde verontreiniging	vooronderzoek overlevings-, groei- en reproductie- experiment in Budelgrond	overlevings-, groei- en reproductie- experiment in Budelgrond	
6.								abundantie/ diversiteit langs Budel- gradient	

wordt als er meerdere waarnemingen met een partieel effect zijn, is het probleem dat er dus veel punten rondom al die verschillende  $EC_{50}$ 's bemonsterd moeten worden. Geïllustreerd aan de  $EA_{50}$  van potwormen en compostwormen wordt dit duidelijk, doordat in het eerste geval relatief vaak rondom de afstand van 5 km gemonsterd moet worden, terwijl in het tweede geval deze afstand ca. 1 km bedraagt. Een tweede technisch probleem is de variabiliteit van bodemfactoren. Deze hebben een sterke invloed op de prestatie van alle soorten in de verschillende gronden. Dit wordt het meest duidelijk aan de hand van de variatie in het "schone" deel van de gradiënt. Deze variabiliteit is, bij de huidige aanpak, technisch-wetenschappelijk slechts te ondervangen door replicatie of wellicht door het kiezen van een andere vervuilde lokatie.

De zuurgraad van de bodem kwam in de meeste onderzoeken naar voren als de bepalende factor voor overleving en reproductie van de verschillende organismen in de Budelgrond. Blijkbaar was de "stress" ten gevolge van de lage pH op zich te groot voor de meeste soorten. Modificaties van de Budelgrond bleken noodzakelijk om de prestaties in "schone" Budelgrond voldoende hoog te krijgen om een "afstand-effect" relatie te kunnen bestuderen. Deze modificaties bestonden in de praktijk met name uit bekalking, herbevochtiging en bemesting (verandering percentage organische stof). Deze handelingen zullen in het algemeen invloed uitoefenen op de binding van de metalen aan de bodemmatrix, en daarmee op de toxiciteit. Daarnaast is het niet uitgesloten, dat de bodemmatrix invloed uitoefent op de organismen zelf, waardoor de relatie tussen interne concentratie en toxische effecten beïnvloed wordt. Onder sub-optimale omstandigheden kan het organisme gevoeliger worden voor metalen, waardoor de effecten beginnen op te treden bij verschillende interne concentraties. Een sterke aanwijzing hiervoor is de complexe interactie tussen binding aan de bodemmatrix en aan bacteriën, die beide zuurgraadafhankelijk zijn, waardoor de uiteindelijke toxiciteit niet te voorspellen bleek te zijn (Hfst. 3).

Het aanbrengen van veranderingen moet in het algemeen geminimaliseerd worden in het licht van de vergelijking tussen laboratoriumtoetsen (type 1) en veldwaarnemingen (type 6). Het lijkt echter uitzonderlijk om een lokatie te vinden die voldoet aan alle gestelde eisen (zie Hfst. 2), te weten bereikbaarheid, toestemming voor monsterring, graduele verontreiniging met één of enkele stoffen, etc., maar waarin ook standaard toetsorganismen kweekbaar zijn. In het algemeen zal er tenminste bijgevoerd moeten worden om de prestatie in "schone

grond" vergelijkbaar te maken met die in de standaard toets, waardoor er ten allen tijde sprake zal blijven van modificatie. Een alternatieve lokatie zou een pH van ca. 5,5 tot 7 moeten hebben, om de milieuchemisch belangrijke pH-modificatie te vermijden. Momenteel is een dergelijke lokatie niet bekend.

Veldwaarnemingen (type 6), waarmee de resultante van de meervoudige stress op een groep soorten geanalyseerd kan worden, zijn tot op heden slechts toegepast met nematoden. Opvallend is dat de resultaten een sterke overeenstemming hebben met de overige onderzoeken, te weten dat de pH een dominante factor is, die slecht te scheiden is van de effecten van metalen. Wordt echter de pH gecorrigeerd, dan blijkt bij de experimenteel geteste soorten (planten, wormachtigen) een "afstands-effect" relatie te ontstaan, die sterk duidt op een toxische invloed van metalen. De overige bodemfactoren worden immers geacht niet systematisch te veranderen met toenemende afstand tot de fabriek.

Het uitgevoerde onderzoek naar de coherentie tussen de laboratorium- en veldresultaten bevindt zich momenteel op het niveau van de herkenning van de factoren die het vóórkomen en de prestatie van soorten beïnvloeden, maar de combinatie van lab.- en veldwerk is nog niet compleet toegepast binnen één soortengroep. Het uitvoeren van veldwaarnemingen aan een soortengroep, gecombineerd met het bepalen van interne en externe concentraties in relatie tot diverse bodemfactoren zowel bij lab.- als bij veldproeven, is wenselijk om nadere/toekomstige veldwaarnemingen goed te kunnen interpreteren. Het probleem doet zich echter voor dat voor de soorten, die goed hanteerbaar zijn in het laboratoriumonderzoek, relevante veldwaarnemingen moeilijk realiseerbaar lijken te zijn.

Naast de bovengenoemde deelvragen (a-d) waar aandacht voor wordt besteed, bestaan er nog andere factoren die een rol kunnen spelen bij het ontstaan van verschillen tussen toxiciteit in het laboratorium en in het veld. De factoren zijn, bij beperking tot de populaties van een soort: gedragsverschillen, verschillen in populatie-opbouw, fysiologische verschillen tussen levensstadia, genetische verschillen tussen laboratoriumstammen en veldpopulaties, verschillen in bestudeerde levensgeschiedenis parameters in relatie tot het belang voor het voortbestaan van de populatie. Indien de validatie zich daarnaast zou uitstrekken van standaard laboratoriumsoorten naar andere soorten, dan komen ook de aspecten: fylogenetische verwantschap, interspecifieke gevoeligheidsverschillen, en verschillen in de ecologie, functie en plaats in het voedselweb naar voren. Deze overwegingen worden met

name belangrijk indien de laboratoriumtoetssoorten een beperkte veldrelevantie hebben.

### Synthese

Voor een aantal toetsorganismen is het mogelijk gebleken dosis gerelateerde effecten in Budelgronden te vergelijken met effecten bepaald in (kunst)grond. Het is op deze manier mogelijk een "veld" dosis-effectrelatie te vergelijken met een "lab" dosis-effectrelatie, waarbij de dosis op verschillende manieren kan worden uitgedrukt (afstand tot fabriek, totaal gehalte, extraheerbaar gehalte etc.). Dit neemt niet weg dat er betere lokaties denkbaar zijn. Het is n.l. niet mogelijk in Budel zowel veldwaarnemingen als experimenteel onderzoek aan dezelfde groep van bodemorganismen uit te voeren.

Een tweede conclusie is dat, voor een aantal van de gebruikte soorten (compostworm, potworm, rode klaver), dosis-effectrelaties bepaald in OECD-kunstgrond en in gemodificeerde Budelgrond een factor 0 - 4 lijken te verschillen. In vergelijking met beleidsmatig toegepaste correctiefactoren is de orde van grootte van dit verschil relatief klein.

Om effectniveau's in verschillende situaties zo goed mogelijk met elkaar te kunnen vergelijken is het aan te bevelen deze uit te drukken in interne concentratie.

Uit het onderzoek met *Eisenia andrei* komt duidelijk naar voren dat de verschillen tussen lab. en veld waarschijnlijk zijn toe te schrijven aan combinatie-effecten, verschillen in biobeschikbaarheid, of een combinatie van beide. Het is aannemelijk dat dit ook voor andere soorten geldt waarbij de relatieve bijdrage van de verschillende metalen aan de toxiciteit echter voor elke soort kan verschillen.

Bovengenoemde conclusies, en de bevindingen waarop ze gebaseerd zijn, hebben ertoe geleid dat de inrichting van het proefveld aan de V.U. in het kader van dit project gerealiseerd zal worden met een bodemtype dat vergelijkbaar is met de Budelgrond (arme zandgrond). Bij de inrichting van dit proefveld wordt kunstmatig een zinkgradiënt aangebracht. Met dit proefveld kunnen experimentele niveau's 3 en 4 (Tabel 12.1) worden gerealiseerd en kunnen populatie-ontwikkelingen van geschikte soorten(groepen) op lange termijn bestudeerd worden. Een voor de hand liggende keuze hierbij is, om dit met name te realiseren met de endogene nematodenfauna van de gemonsterde (schone) grond. Dit betekent dat de voorbereiding (voor zover mogelijk) nematoden-vriendelijk moet

gebeuren. Voor de overige soorten zullen de individuen toegevoegd moeten worden. Ook hierin is dus het onderscheid "natuurlijk" en "experimentele manipulatie" terug te vinden, waarbij met het proefveld-onderzoek beoogd wordt om het verband tussen beiden te leggen.

Anderzijds kunnen in het proefveldonderzoek vragen beantwoord worden die betrekking hebben op deelvraag (d), naar de relatie tussen interne concentratie en effecten, bij de meervoudige stress die met name veroorzaakt wordt door het klimaat (temperatuur en vocht). Bovendien kan het effect van "veroudering" van de verontreiniging (d.w.z. veranderende binding en speciatie in de tijd) op de toxiciteit van metalen bestudeerd worden.

### *Aanbevelingen*

#### Typen van onderzoek

1. Verwacht wordt dat voor de meeste soorten de uitvoering van de experimentele methodes 1 t/m 4 verder ter hand zal worden genomen. De methodes 5 en 6 hebben in praktische zin minder aandacht gekregen. Herhaalde veldwaarnemingen aan nematoden, nieuwe veldwaarnemingen aan andere soorten(groepen), en literatuuronderzoek kunnen bredere invulling geven aan de deelvragen die betrekking hebben op het effect van metalen op populaties en levensgemeenschappen in hun natuurlijke interacties.

In praktische zin is het ook wenselijk om de abundantie en soortensamenstelling van vegetatie en fauna langs vervuilingsgradiënten te bestuderen, met name in Budel. Dit om uiteindelijk te kunnen concluderen of laboratoriumgegevens al dan niet een goede leidraad zijn om effecten in het veld te voorspellen.

2. Om de vergelijking van verschillende experimentele niveaus mogelijk te maken is het noodzakelijk om bij alle typen experimenten de variabelen te bepalen die voor een soort van belang (zouden kunnen) zijn. Hierbij moet met name gedacht worden aan de interne concentratie, en de relatie met de factoren die van invloed zijn op de biologische beschikbaarheid.



3. Bij het ontwerpen van experimenten is het noodzakelijk om niet alleen rekening te houden met het relatieve belang van parameters die biologische beschikbaarheid bepalen, maar ook met de bruikbaarheid in de praktijk als eventuele potentiële bodemcorrectiefactor.

#### Variaties op standaard laboratoriumtoetsen.

4. Combinatietoxiciteitsonderzoek voor het compartiment bodem is nog nauwelijks beschikbaar in de literatuur. Gezien het optreden van combinatiewerkingen is het zinvol om tenminste de richting en orde van grootte van de combinatie-effecten vast te stellen, naast de studie van de oorzaken van de verschijnselen. Optimale aansluiting bij combinatietoxiciteitsonderzoek in de bodem, in zoverre dat in andere kaders plaatsvindt, moet worden nagestreefd.
5. Studies naar de effecten van meervoudige stress verdienen sterke aandacht, om vast te stellen of de interne concentratie een goede leidraad is voor toxische effecten, en zo nee, om vast te stellen in welke orde van grootte afwijkingen op kunnen treden.
6. Bij variaties op de standaard bodemecotoxicologische toetsen, eventueel uitgevoerd onder veldcondities, wordt in principe de nadruk gelegd op de biotische aspecten van biobeschikbaarheid. Milieuchemische aspecten spelen echter ook een belangrijke rol. Een sterkere milieuchemische inbreng in het Validatieproject dient daarom te worden nagestreefd.
7. Naast de milieuchemische effecten van pH aanpassing voor het uitvoeren van proeven moet ook rekening gehouden worden met de (onvoorspelbare) balans tussen organisme en bodemvocht, en met de effecten van de pH op de oecologische prestaties van de soort.
8. Bij veldmonstering van grond voor semi-laboratorium experimenten moet rekening gehouden worden met de relatieve gevoeligheid van de soort om te bepalen waar de grootste dichtheid van monsterpunten zich moet bevinden.

9. Bij veldmonstering moet door replicatie ook rekening gehouden worden met variabiliteit in bodemkenmerken.
  
10. Van alle factoren die van invloed kunnen zijn op het verschil tussen toxiciteit in laboratoriumcondities en in het veld is het zinvol om tenminste *de orde van grootte van het eventuele verschil* aan te duiden (met name van belang voor de nog niet bestudeerde aspecten zoals genoemd in de conclusies).
  
11. Het is zinvol om meer soorten met een dominante blootstellingsroute via het voer in het onderzoek te betrekken.

## REFERENTIES

- Adema, D.M.M. & L. Henzen, 1986. De invloed van tien milieugevaarlijke stoffen op de groei van drie soorten hogere planten. TNO rapport R 86/181a
- Bongers, T., 1988. De nematoden van Nederland. Uitgave KNNV. Uitgeverij Pirola, Schoorl.
- Bongers, T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83: 14-19.
- Bosmans, H. & J. Paenhuys, 1980. The distribution of heavy metals in the soils of the Kempen. *Pedologie (Ghent)* 30 (2): 191-222.
- Crommentuijn, T., J. Brils & N. M. van Straalen, 1993. Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate. *Ecotox. Environ. Saf.* 26: 216-227.
- Denneman, C.A.J. & C.A.M. van Gestel, 1990. Bodemverontreiniging en bodemecosystemen: voorstel voor C-(toetsings)waarden op basis van ecotoxicologische risico's. RIVM rapport 725201001.
- Dirven-van Breemen, L., R. Baerselman & J. Notenboom, 1994. Onderzoek naar de geschiktheid van de potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *E. crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in bodemecotoxicologisch onderzoek. RIVM rapport 719102025.
- Donker, M.H. & C.G. Bogert, 1991. Adaptations to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 100C: 143-146.
- Dueck, T.A., W.H.O. Ernst & F. Pasman, 1984. Heavy metal immision and genetic constitution of plant populations in the vicinity of two metal emission sources. *Angew. Botanik* 58: 47-59.
- Edelman, Th., W. Ma & J.J.M. Kuijpers, 1985. Verontreiniging van de bodem met de zware metalen cadmium, lood en zink in de omgeving van een zinksmelterij in de Brabantse Kempen. *Land en Water Nu. Bijlage Milieutechniek.* 25 (1): 12-14.
- Haanstra, L. & P. Doelman, 1984. Glutamic acid decomposition as a sensitive measure of heavy metal pollution in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 595-600.
- Haanstra, L., P. Doelman & J.M. Oude Voshaar, 1985. The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxological research. *Plant and Soil* 84: 293-297.
- Kersten, P., 1993. Effecten van metalen op de samenstelling van de nematodenfauna langs een metaalgradiënt te Budel. Stageverslag afd. Terrestrische Ecologie, Laboratorium voor Bodem

- en Grondwater, RIVM.
- Lemmens, L. & R. Roos, 1993. De Kempen zeer ernstig vergiftigd. *Natuur en Milieu* 9: 12-17.
- Mogo, F., 1993. Combination toxicity of heavy metals for earthworms (*Eisenia andrei*). M. Sc. thesis E.E. 101, IHE Delft / afd. Bodemecotoxicologie, Laboratorium voor Ecotoxicologie, RIVM.
- Notenboom, J. & P. van Beelen, 1992. Validatie van risicogrenzen voor de bodem. Verslag van een workshop gericht op de opzet van een onderzoekprogramma. RIVM-rapport 719102020.
- Posthuma, L., 1990. Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites. *J. Appl. Ecol.* 27: 609-622.
- Posthuma, L., R.G. Hogervorst & N.M. van Straalen, 1992. Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations of *Orchesella cincta* (L.) (Collembola). *Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.* 22: 146-156.
- Rademaker, M., 1993. Validatie van risicogrenzen voor de bodem. I. Methodiek ontwikkeling en eerste acute toets met nematoden (*Plectus acuminatus*) in grond. Stageverslag afd. Terrestrische Ecologie, Laboratorium voor Bodem en Grondwater, RIVM.
- Schouten, A.J. & I.R. van der Brugge, 1989. Acute toxiciteit van aluminium en H<sup>+</sup>ionen concentratie voor bodemnematoden uit een zuur en kalkrijk dennenbos. I. Ontwikkeling en toepassing van een toets in waterig medium. RIVM, Bilthoven, rapport nr. 718603001.
- Van Beelen, P. & A.J. Fleuren-Kemilä, 1993. Toxic effects of pentachlorophenol and other pollutants on the mineralization of acetate in several soils. *Ecotox. Environ. Saf.* 25: 10-17.
- Van Beelen, P., A.K. Fleuren-Kemilä & C.H.A.M. van Mil, in druk. Stimulatory and toxic effects of acid, pentachlorophenol or zinc on the mineralization of acetate in acid or calcareous soils and subsoils. *J. Environ. Sci & Health*.
- Van Gestel, C.A.M., 1991. Earthworms in ecotoxicology. Proefschrift Rijksuniversiteit Utrecht.
- Vonk, J.W. & Y.A. Matla, 1993. A test for effects of chemicals on glutamate mineralisation in soil. TNO Institute of Environmental Sciences. Report no. IMW-R 93/097.
- Weltje, L., 1993. Combinatietoxiciteit van zware metalen bij de regenworm *Eisenia andrei*. Stageverslag afd. Bodemecotoxicologie, Laboratorium voor Ecotoxicologie, RIVM.

## Bijlage I

Validatie Project 1993 BET/ECOFIVM			Meetgegevens van Budelgronden over 1993						Laatste update 13 april 1994			
Validatie Project 1993 BET/ECOFIVM											analyse datum 170393	
Pilot'92		Vochtgehaltes %		grondvoorbereiding		grondamenstelling en Oorspronkelijke zuurgraad			Veldcapaciteit(massa% droge stof)			
nr.	afstand km	Observed	Gedroogd	Toegevoegd H2O ml/krat	organische stof %	Lutum %	pH (H2O)	pH (KCL)	pF0	pF2		
vuil 1	0.4	1.0	1.00	geen				4.4			22	
pomp 2	1.2	6.2	1.00	geen	4.1	1.79	4.7	4.1			23	
schoon 3	15.0	5.6	1.00	geen				3.2			16	
OECD	ref.grond				13.4	4.44	5.9	5.6	66		36	
Gradient'93											analyse datum 170393	
Pilot'92		Vochtgehaltes %		grondvoorbereiding voor 2% vocht		grondamenstelling en Oorspronkelijke zuurgraad			Veldcapaciteit(massa% droge stof)			
nr.	afstand km	Observed	Gedroogd	Toegevoegd H2O ml/krat	organische stof %	Lutum %	pH (H2O)	pH (KCL)	pF0	pF2		
vuil 1	0.4	14.5	0.95	450	1.9	1.99	5.6	4.7	29	12		
2	1.1	11.3	1.85	70	3.6	1.43	5.7	4.9	34	20		
3	1.6	9.7	0.85	480	2.8	1.25	4.8	4.0	7	4		
4	2.6	5.8	0.78	600	2.4	1.24	5.0	4.3	18	5		
5	5.0	16.0	1.06	430	3.6	1.26	3.8	3.1	34	11		
6	6.6	14.2	1.21	290	6.4	1.48	3.7	2.9	43	20		
7	7.9	17.4	1.26	330	4.5	1.27	3.8	3.2	35	12		
8	9.6	14.0	1.31	300	4.3	1.31	3.7	2.9	36	10		
9	12.0	14.3	0.99	430	5.5	1.26	3.8	2.9	38	18		
10	15.0	13.5	1.30	350	4.7	1.55	3.8	3.3	35	13		
schoon A	20.7	11.3	1.12	520	3.5	1.15	3.0	3.4	32	11		
schoon B	20.7		1.22	510								
Validatie Project 1993 BET/ECOFIVM											analyse datum Pilot vuil 150393	
Extraheerbare metaalgehalten in mg / kg drooggewicht Calciumchloride (0.01 M) extractie (N=2)											analyse datum overigen 230693	
nr.	afstand km	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NH4	NO3	NO2	
vuil 1	0.4		3.51		5.5		57.3	337.6				
pomp 2	1.2		1.01	<0.1	0.2	9.3	3.5	164.0	7.0	12.9	0.03	
schoon 3	15.0		0.25	<0.1	<0.1	17.7	<0.5	5.6	6.2	1.7	0.04	
OECD	ref.grond		<0.05	<0.1	<0.1		<0.5	0.3	17.3	1.1	0.00	
Gradient'93											analyse datum Pilot vuil 150393	
Extraheerbare metaalgehalten in mg / kg drooggewicht Calciumchloride (0.01 M) extractie (N=2)											analyse datum overigen 230693	
nr.	afstand km	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NH4	NO3	NO2	
vuil 1	0.4		1.02	<0.1	0.6	1.4	2.0	224.9	3.8	3.9	0.01	
2	1.1		0.84	<0.1	1.0	1.2	0.5	312.8	5.6	3.4	0.03	
3	1.6		0.41	<0.1	0.7	35.5	3.8	61.2	8.4	2.6	0.04	
4	2.6		0.30	<0.1	0.1	3.5	0.5	80.3	6.2	2.7	0.01	
5	5.0		0.25	<0.1	<0.1	38.1	2.0	14.8	9.8	2.0	0.04	
6	6.6		0.20	<0.1	<0.1	77.2	3.1	10.2	11.9	2.2	0.06	
7	7.9		0.26	<0.1	<0.1	48.3	<0.5	10.7	8.8	1.2	0.05	
8	9.6		0.15	<0.1	<0.1	74.0	2.5	12.0	10.4	1.8	0.06	
9	12.0		0.25	<0.1	<0.1	34.5	0.5	11.7	14.5	1.9	0.04	
10	15.0		0.15	<0.1	<0.1	62.9	0.5	14.2	7.4	7.4	0.07	
schoon11	20.7		0.08	<0.1	<0.1	53.8	0.5	2.3	10.1	1.8	0.05	
Validatie Project 1993 BET/ECOFIVM											analyse datum Pilot vuil 150393	
Totale metaalgehalten in mg / kg drooggewicht Koningswater destructie (N=1)											analyse datum overigen 230693	
nr.	afstand km	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	N % Totaal	C % Totaal	H % Totaal	
vuil 1	0.4	192	3.4		24		154	337				
pomp 2	1.2	94	3.8	2	32	2217	175	347	0.11	2.83	0.29	
schoon 3	15.0	<50	0.3	1	1	735	10	8	0.05	2.25	0.24	
OECD	ref.grond		<0.1	6	6		21	7				
Gradient'93											analyse datum Pilot vuil 150393	
Totale metaalgehalten in mg / kg drooggewicht Koningswater destructie (N=1)											analyse datum overigen 230693	
nr.	afstand km	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	N % Totaal	C % Totaal	H % Totaal	
vuil 1	0.4	300	3.0	8	68	6550	325	598	0.04	1.11	0.16	
2	1.1	539	3.9	16	250	15686	424	1787	0.11	2.39	0.29	
3	1.6	304	0.9	41	29	6130	148	207	0.07	1.72	0.20	
4	2.6	288	0.8	7	17	4740	91	219	0.06	1.44	0.16	
5	5.0	<50	0.4	3	10	1960	40	32	0.07	2.33	0.25	
6	6.6	74	0.3	12	5	2935	61	28	0.12	3.63	0.39	
7	7.9	25	0.4	4	4	1920	20	23	0.08	3.12	0.32	
8	9.6	100	0.2	3	3	2820	45	27	0.10	2.92	0.32	
9	12.0	<50	0.4	4	2	1530	25	20	0.12	4.30	0.44	
10	15.0	100	0.3	2	2	3360	10	23	0.07	2.46	0.25	
schoon11	20.7	<50	0.1	6	2	2043	19	11	0.07	2.41	0.26	
Validatie Project 1993 BET/ECOFIVM											analyse datum Pilot vuil 150393	
Detectiegrenzen (mg/kg) Calciumchloride extractie											analyse datum overigen 230693	
		Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NH4	NO3	NO2	
			0.05	0.1	0.1	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.01	
Detectiegrenzen (mg/kg) Koningswater destructie											analyse datum overigen 230693	
		Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	N % Totaal	C % Totaal	H % Totaal	
		50	0.1	1	1	2	5	5	0.01	0.01	0.01	