

Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering

**Methodebeschrijvingen voor enkele bioassays en
veldstudies**

nota nr. 93.027

Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering

**Methodebeschrijvingen voor enkele bioassays en
veldstudies**

Nota nr. 93.027 (aangepaste versie juni 2002)

Auteurs: J.L. Maas
C. van de Guchte
F.C.M. Kerkum

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	4
Voorwoord	8
Samenvatting	10
1 Inleiding	12
2 Bioassays	14
2.1 Inleiding.	14
2.2 Bemonsteringslocaties	14
2.3 Referentiesedimenten.	14
2.4 Monstername.	16
2.5 Behandeling monsters.	16
2.5.1 Voorbehandeling sediment.	16
2.5.2 Bereiding sediment-watersysteem.	17
2.5.3 Bereiding elutriaat.	17
2.5.4 Bereiding poriewater.	17
2.5.5 Bewaren van behandelde monsters.	18
2.6 Meetmethoden.	18
2.6.1 Fysisch-chemische en chemische analyses aan sedimenten.	18
2.6.2 Randvoorwaarden in testsystemen.	18
2.6.3 <i>Chironomus riparius</i> , in sediment (eipakket; 28 dagen).	19
2.6.4 <i>Daphnia magna</i> , in poriewater (ca. 14 dagen).	20
2.6.5 <i>Photobacterium phosphoreum</i> in poriewater (5,15 of 30 min).	21
2.7 Verwerking gegevens en statistische toetsing.	22
2.7.1 Chemische analyses.	22
2.7.2 <i>Chironomus riparius</i> in sediment-water.	22
2.7.3 <i>Daphnia magna</i> in poriewater.	22
2.7.4 <i>Photobacterium phosphoreum</i> in poriewater.	23
2.8 Kwaliteitsbewaking.	24
2.9 Rapportage.	25
2.10 Interpretatie van de gegevens.	27
2.10.1 Klasseïndeling sediment.	27
2.10.2 Criteria voor de bioassays.	27
2.10.3 Verklaarbaarheid effecten op <i>D. magna</i> , <i>C. riparius</i> en <i>V. fischeri</i>	

3. Bioaccumulatietesten (in het laboratorium)

- 3.1 Inleiding
- 3.2 Materiaal
 - 3.2.1 Bereiding sediment-water systeem
 - 3.2.2 Testorganismen
- 3.3 Methode
 - 3.3.1 Bioaccumulatie-experimenten
 - 3.3.2 Chemische analyses in organismen
 - 3.3.3 Overige chemische analyses
- 3.4 Bioaccumulatie theorie
 - 3.4.1 Bioaccumulatie organische microverontreinigingen
 - 3.4.2 Bioaccumulatie zware metalen
- 3.5 Interpretatie van bioaccumulatiegegevens
 - 3.5.1 Klasseindeling sedimenten

4. Veldinventarisaties

- 4.1 Inleiding
- 4.2 Bemonsteringslocaties
- 4.3 Referentiegebieden
- 4.4 Monstername
- 4.5 Karakterisering van watersysteem en sediment
- 4.6 Meetmethoden
 - 4.6.1 Fysisch-chemische en chemische analyses aan sedimenten
 - 4.6.2 Bepalen van het vochtgehalte
 - 4.6.3 Dichtheid Chironomidae
 - 4.6.4 Kaakafwijkingen chironomiden
- 4.7 Verwerking gegevens en statistische toetsing
 - 4.7.1. Chemische analyses
 - 4.7.2 Bepalen van de constante K_s
 - 4.7.3 Dichtheid Chironomidae
 - 4.7.4 Kaakafwijkingen chironomiden
- 4.8. Kwaliteitsbewaking
- 4.9 Rapportage
- 4.10 Interpretatie van de gegevens
 - 4.10.1 Geschiktheid substraat voor Chironomus sp.
 - 4.10.2 Klasseindeling sediment
 - 4.10.3 Criteria voor veldinventarisatie

5. Referenties

BIJLAGEN

Voorwoord

Deze nota is een richtlijn voor het uitvoeren van bioassays en veldinventarisaties, welke een onderdeel vormen van de TRIADE-benadering ten behoeve van het vaststellen van de verontreinigingsgraad van waterbodems.

De nota bevat laboratorium methodieken voor het beoordelen van de toxiciteit van waterbodems voor aquatische organismen. Tevens is een methodiek beschreven, waarmee de biologische beschikbaarheid van stoffen uit de sedimenten bepaald kan worden. Naast deze laboratoriummethoden is een richtlijn gegeven voor het uitvoeren van veldinventarisaties.

Ook is in deze nota aandacht gegeven aan de interpretatie van de gegevens, om tot een klasseïndeling van de verontreinigingsgraad van de sedimenten te komen. Hiervoor zijn voor alle te meten parameters klassegrenzen aangegeven.

Deze methodebeschrijving is enigszins aangepast ten opzichte van de huidige in omloop zijnde nota 93.027. De belangrijkste veranderingen zijn:

- de randvoorwaarden voor de test organismen zijn aangepast aan de huidige kennis
- de interpretatie van bioaccumulatiegegevens
- de verwijzingen naar normstelling naar de huidige geldende documenten.

Deze versie wordt binnenkort nog geupdate. Deze update en volgende versies daarvan zullen verder op internet verschijnen.

RIZA, juni 2002
Hannie Maas
Postbus 17
8200 AA Lelystad
tel: 0320-278411

ov. contactpersonen:
Ria Kamps
Frans Kerkum

Samenvatting

In de Richtlijn Nader Onderzoek voor waterbodems (Van Elswijk e.a., 2001) wordt aanbevolen de actuele risico's voor het ecosysteem mede te beoordelen met behulp van effectgericht onderzoek (bioassays) en veldwaarnemingen. Hiervoor is naar Amerikaans voorbeeld, een benaderingsmethode (TRIADE) voor de Nederlandse rijkswateren ontwikkeld, waarin gegevens van chemische analyses, veldinventarisaties, bioaccumulatie-experimenten en toxiciteitstesten onder laboratoriumcondities gecombineerd worden tot een eindoordeel.

Deze nota is een gedetailleerde methodebeschrijving, waarin gegevensverzameling voor verschillende onderdelen van de TRIADE-benadering zijn uitgewerkt.

De nota bevat laboratorium methodieken voor het beoordelen van de toxiciteit van waterbodems voor aquatische organismen. In deze nota worden alleen methoden beschreven voor zoetwater organismen. Testen voor zoutwater organismen zijn beschreven door Schipper en Stronkhorst (1999). Effecten van verontreinigingen worden bestudeerd in chronische testen met het bodembewonende organisme *Chironomus riparius* (dansmug). Door blootstelling aan verontreinigd sediment kunnen effecten op overleving en groei optreden. Opname van stoffen via de waterfase worden bestudeerd in chronische testen met de watervlo *Daphnia magna*, waarvan de overleving en reproductie in poriewater vastgesteld wordt. Voor kortdurend onderzoek wordt de methode voor luminescerende bacteriën *Vibrio fischeri* (voorheen *Photobacterium phosphoreum*) beschreven.

In het hoofdstuk bioaccumulatiemetingen is de methodiek beschreven waarop de bioconcentratie van stoffen in organismen bepaald kan worden. Uit berekende en gemeten concentraties is af te leiden wat de biologische beschikbaarheid van stoffen uit het sediment is.

Naast deze laboratoriummethoden is een richtlijn gegeven voor het uitvoeren van veldinventarisaties. Dichtheden en mentumafwijkingen van *Chironomus*-larven worden vergeleken met referentiewaarden voor een bepaald type sediment. Afwijkingen van deze normaalwaarden kunnen een indicatie zijn voor een verontreiniging.

Op basis van ervaring in onderzoek is voor iedere effectparameter een classificatiesysteem ontwikkeld, waarmee de mate van effect wordt aangegeven. Hiermee kan de noodzaak en urgentie van een sanering verder onderbouwd worden. De wijze waarop met dit classificatiesysteem gewerkt kan worden staat beschreven in de Richtlijn Nader Onderzoek voor waterbodems (Van Elswijk e.a., 2001).

1 Inleiding

De chemische verontreinigingsgraad vormt een belangrijk uitgangspunt voor de klassebeoordeling van sedimenten. Echter door de beperking van het aantal onderzochte stoffen en de ontbrekende kennis van aanvaardbaar geachte concentraties voor het bodemleven, kan vaak geen goede inschatting gemaakt worden van het effect van de waterbodem op organismen. Het is daarom van belang om naast de chemische analyses, de biologische beschikbaarheid van mengsels van stoffen uit die bodems op organismen te onderzoeken. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van biologische parameters zoals effecten op organismen onder laboratoriumcondities, en effecten, waargenomen bij organismen in het veld. Een dergelijke beoordeling wordt aangeraden in de Richtlijn Nader Onderzoek voor waterbodems (Van Elswijk e.a., 2001).

Deze methodebeschrijvingen zijn richtlijnen voor het uitvoeren van onderzoek aan organismen, zowel in het laboratorium als in het veld. Het doel van deze richtlijnen is, dat de kwaliteitsbeoordeling van waterbodems in Nederland zoveel mogelijk onder dezelfde condities wordt uitgevoerd, waardoor de reproduceerbaarheid verhoogd wordt en de resultaten van verschillende laboratoria in principe goed met elkaar te vergelijken zijn.

In deze richtlijn worden de volgende methoden beschreven:

1. Bioassays - het meten van effecten op organismen onder laboratorium omstandigheden (hfst. 2).
2. Bioaccumulatie-experimenten - het meten van concentraties van bioaccumulerende stoffen in organismen, die in het lab zijn blootgesteld (hfst. 3).
3. Veldinventarisaties - het meten van effecten op organismen in het veld, en het inventariseren van sleutelsoorten (hfst. 4).

In bioassays wordt de toxiciteit bepaald van de waterbodem. Uit ervaring (Van de Guchte and Maas-Diepeveen, 1987) is bekend, dat in de Nederlandse situatie effecten van de waterbodem pas zichtbaar zijn in chronische testen. In een evenwichtssituatie vindt opname van stoffen uit sediment veelal plaats via de waterfase (Lahr, 1988), zodat naast bodembewonende organismen ook organismen gebruikt kunnen worden, die in de waterfase leven. Uitgangspunt bij het maken van een keuze uit beschikbare bioassays was enerzijds de praktische haalbaarheid van en de ervaring met de methode, anderzijds de gevoeligheid van de organismen voor verschillende stofgroepen. Voor het testen van de toxiciteit van de waterbodem is gekozen voor een test met de muggelarf *Chironomus riparius*, waarbij direct in het sediment gemeten wordt, en een test met de watervlo *Daphnia magna*, die aan het poriewater blootgesteld wordt.

Sedimenten van zoutwatergebieden zullen niet voldoen aan de randvoorwaarden voor zoetwater organismen. Voor het testen van deze sedimenten zijn mariene organismen geschikt, zoals de amphipode *Corophium volutator*. Daarnaast wordt in zout milieu de luminescerende bacterie *Vibrio fischeri* (Solid Phase) en de cellijn Calux-DR voor dioxineachtige verbindingen toegepast (Stronkhorst e.a., 2001)

Een enkele keer, b.v. in sedimenten van ernstig verontreinigde havens, zijn effecten acuut te meten in onverdund poriewater van de waterbodem. Door concentratie van poriewater kunnen ook acute effecten van minder verontreinigde waterbodems gemeten worden (De Zwart en Folkerts, 1990; Slooff en De Zwart, 1991). In beide gevallen kan gebruik gemaakt

worden van acute testen met luminescerende bacteriën (*Vibrio fischeri*). Ook andere organismen, b.v. crustacea (*Daphnia magna*) kunnen in acute testen gebruikt worden.

Bioaccumulatie-experimenten geven een indruk van de opname van stoffen, die bij lagere organismen weinig effect veroorzaken, maar die via doorvergiftiging een bedreiging kunnen vormen voor organismen hoger in de voedselketen. Voor dit onderzoek kunnen verschillende organismen gebruikt worden, zoals oligochaeten (wormachtigen) en chironomiden (muggelarven). Veelal wordt de voorkeur gegeven aan oligochaeten, omdat deze met het oog op chemische analyses in voldoende biomassa verkrijgbaar zijn en in een experiment getest kunnen worden.

Bioaccumulatiemetingen kunnen ook toegepast worden op organismen, die in het veld voorkomen of uitgezet worden. In het eerste geval is vaak het probleem voldoende organismen te kunnen verzamelen voor chemische analyse. Voor de laatste toepassing wordt bijvoorbeeld gedacht aan het uitzetten van bodembewonende organismen, zoals de mossel *Corbicula* of *Dreissena polymorpha*. De methode voor *Corbicula* is echter nog niet voldoende ontwikkeld. Met *Dreissena* is al eerder ervaring opgedaan in onderzoek in de Rijn (Valk, van der, et al., 1989), in de Drentsche Hoofdvaart (Mulder e.a., 1991) en in het Maas- en Rijnstroomgebied (Kraak et al., 1991). TNO heeft naast ervaring met zoetwater mosselen ook ervaring opgedaan met de zoutwater mossel *Mytilus edulis* (Scholten e.a., 1991).

De dichtheid of biomassa van organismen in de waterbodem is een maat voor de waterbodemkwaliteit en voor het voedselaanbod. Om de kwaliteit te beoordelen wordt gerefereerd aan voor de karakteristieken van dat sediment als "normaal" voorkomende waarden. Voor de inventarisatie wordt gebruik gemaakt van sleutelorganismen; zoals chironomiden en oligochaeten (Van Urk en Kerkum, 1991). Echter de parameter voor chironomiden is tot nu toe het meest duidelijk en onderscheidend. Voor de oligochaeten wordt nog nader onderzoek gedaan naar de bruikbaarheid van deze parameter.

In het project typologie voor waterbodems (Kerkum en van de Guchte, 1992) wordt ook aandacht besteed aan de groep nematoden als sleutelsoort.

Morfologische afwijkingen aan organismen in het veld kunnen een indicatie zijn van verontreinigingen. Uit ervaring is bekend, dat in gebieden, waar de verontreinigingsgraad het hoogst is, de meeste kaakafwijkingen bij chironomiden voorkomen (Warwick, 1988; Van Urk en Kerkum, 1986; Klink, 1988). De keuze voor het meten van effecten in het veld is op deze parameter gebaseerd.

2 Bioassays

2.1 Inleiding.

Met behulp van bioassays worden chironomiden (*C. riparius*) en daphnia's (*D. magna*) onder gestandaardiseerde laboratoriumcondities blootgesteld aan verzamelde monsters van de waterbodem of het poriewater daaruit. In langdurende experimenten worden effecten bekeken op overleving, groei, ontwikkeling en voortplanting. De effecten op chironomiden worden vergeleken met effecten van een referentiesediment met vergelijkbare karakteristiek van een relatief schone lokatie. Belangrijk bij het uitvoeren van de testen is, dat het bodemmateriaal voldoet aan de randvoorwaarden, die gesteld zijn voor testen met de gekozen organismen.

Acute effecten van poriewater of concentraten daarvan, worden gemeten met luminescerende bacteriën (*V. fischeri*) of *D. magna*.

Op basis van een beoordelingssysteem voor de waargenomen effecten worden de sedimenten ingedeeld in een bepaalde verontreinigingsklasse.

2.2 Bemonsteringslocaties

Geschikte sedimenten voor het uitvoeren van bioassays met chironomiden zijn sedimenten van een slibrijke bodem. Deze bodems bevatten een fijnkorrelige structuur met een redelijk percentage aan deeltjes < 63 µm (≥20%) en organisch koolstof (Hof, 1991). Deze sedimenten bevatten over het algemeen voldoende poriewater om daphniatesten uit te voeren.

Het bodemmateriaal en de daaruit afgeleide sediment-water- en watersystemen moeten aan bepaalde randvoorwaarden voldoen alvorens de bioassays uit te voeren. Criteria voor deze randvoorwaarden worden besproken in hfst. 2.6.

2.3 Referentiesedimenten.

Om effecten te kunnen interpreteren moeten de resultaten vergeleken worden met die van een relatief schoon sediment met een vergelijkbare karakteristiek. Hiervoor kunnen verschillende sedimenten in aanmerking komen. Sedimenten, die gebruikt zijn voor het ontwikkelen van toetsmethoden zijn sedimenten uit beperkt toegankelijke gebieden, zoals de Oostvaardersplassen en het Schoonrewoerdse Wiel. Meer toegankelijke gebieden, die geschikt zijn voor het beoordelen van effecten in Rijnsedimenten zijn sedimenten uit het Markermeer en de Randmeren. Een derde mogelijkheid met name voor ander soortige watersystemen dan Rijnsediment kan worden gezocht in het te onderzoeken gebied zelf.

Een relatief schoon referentiesediment, waarbij normaliter een optimale ontwikkeling wordt geconstateerd, kan tevens gebruikt worden als referentiesediment ter beoordeling van de kwaliteit en normale ontwikkeling van de toetsorganismen. Met het sediment uit de Oostvaardersplassen en het Schoonrewoerdse Wiel is voldoende ervaring opgedaan, om deze sedimenten als controlesedimenten te beschouwen. Echter door de slechte toegankelijkheid van deze wateren (geen beheer van Rijkswaterstaat), wordt momenteel meer ervaring opgedaan met sediment uit het Drontermeer. In een onderzoek naar de typologie voor waterbodems (Kerkum en van de Guchte, 1992; AquaSense, 1993) is een aanzet gegeven voor uitbreiding van kennis van bodems met andere karakteristieken (zandig, weinig, zout).

Beperkt toegankelijke gebieden.

(als controle en referentie voor Rijnsedimenten)

Oostvaardersplassen (OVP): een relatief ongestoord natuurgebied in de nabijheid van Lelystad. Het beheer van dit gebied is in handen van Staatsbosbeheer. Het hier gesedimenteerde materiaal is sedert ± 25 jaar niet meer beïnvloed door Rijnwater. Het sediment heeft een gemiddeld organisch koolstofgehalte (4%) dat ongeveer overeenkomt met dat van een gedefinieerde standaardbodem (5%; Ministerie van Verkeer en Waterstaat, 1989). De aerobe bovenlaag van het sediment is slechts enkele mm tot 1 cm dik. Het verzamelde materiaal is dan ook vnl. anaeroob en daardoor zwart/grijs van kleur. De partikelgrootte is klein (ca. 65% is $< 63 \mu\text{m}$). Hierdoor is de bezinksnelheid ook gering. Een karakterisering van het OVP-sediment staat vermeld in bijlage 2.

Schoonrewoerdse Wiel (SW): een relatief schoon water in het Rijnstroomgebied nabij Leerdam. Beheerder van dit water is de stichting het Zuid-Hollands Landschap. Door overstromingen van de rivieren is Rijnsediment aangevoerd en werd het water ververst. De laatste overstroming heeft vermoedelijk plaatsgevonden in 1809. Sedert meer dan 100 jaar staat het water dus niet meer onder invloed van verontreinigingen uit de rivieren. Sinds 1984 wordt geen rioolwater meer op het Wiel geloosd. In de omgeving van het Wiel liggen echter wel enige boomgaarden, waardoor mogelijk bestrijdingsmiddelen uit kunnen spoelen. Het sediment heeft een gemiddeld organisch koolstofgehalte van 10%. Het verzamelde materiaal heeft een donker zwarte kleur. Een gedeelte van 26% heeft een partikelgrootte van $< 63 \mu\text{m}$. De bezinksnelheid is daardoor tamelijk snel. Een karakterisering van het SW-sediment staat vermeld in bijlage 2.

Goed toegankelijke gebieden als referentie voor Rijnsedimenten.

Randmeren: een relatief schoon sediment, dat niet meer onder invloed staat van de verontreinigingen uit de Rijn, maar waarvan de karakteristieken overeenkomen met Rijnsediment (met name uit het Ketelmeer). Het sediment bevat ca. 30% deeltjes $< 63 \mu\text{m}$. Het organisch koolstof bedraagt ca 3 %.

Markermeer (MK): een sediment, dat geschikt is als referentie voor sedimenten uit het Rijnstroomgebied. Het meer staat niet in directe verbinding met sedimentaanvoer uit de grote rivieren. De meeste slibafzetting bevindt zich in de zuid-oost hoek (nabij Lelystad). De locatie nabij de dijk Enkhuizen is het meest geschikt gebleken. (Coördinaten $x=158.912$; $y=509.490$). Ook sediment uit het havengebied bij de Block van Kuffeler voldoet goed als referentielocatie.

Er treedt geen significante sterfte op van daphnia's of chironomiden in deze sedimenten. De reproductie van daphnia's wordt niet geremd. De resultaten zijn vergelijkbaar met die in het SW-sediment. Het organisch koolstofgehalte is ca. 2 %. Het aantal deeltjes $< 63 \mu\text{m}$ is 55%.

Referentiesedimenten uit het te onderzoeken gebied.

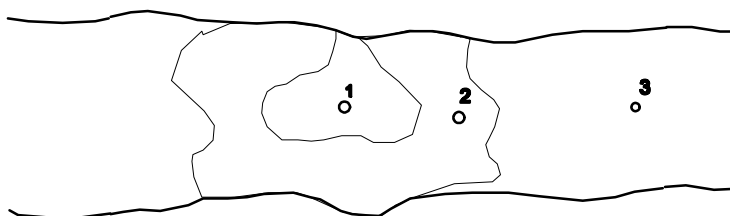
Het gebruik van referentiesedimenten uit hetzelfde watersysteem als de te onderzoeken waterbodem is vooral goed toe te passen als een bepaalde

verontreinigingsgradiënt geïnventariseerd moet worden. Ook een minder schone lokatie kan als referentie dienen.

2.4 Monsternamen.

Bemonsteringen kunnen in principe het gehele jaar uitgevoerd worden. Er zijn diverse bemonsteringstechnieken mogelijk. Voor de bioassays wordt de bovenste laag (10-15 cm) bemonsterd. Op vele lokaties is een box-corer het meest geschikt, omdat hiermee het sediment tijdens de bemonstering praktisch ongestoord blijft. Voor bemonstering van bodems met een slappe bodemstructuur is een Ekman-Birgehopper aan te bevelen. Diepe lagen kunnen gestoken worden met een 'Vrijwit' boor. De verwerking van de monsters is in alle gevallen hetzelfde. In bijlage 8 worden de diverse bemonsteringsapparaten beschreven.

In een te onderzoeken gebied worden tenminste drie lokaties bemonsterd, bij voorkeur in een verontreinigingsgradiënt (zie figuur 1).



Figuur 1: Voorbeeld van een te onderzoeken gebied. Over een bepaald traject worden tenminste drie locaties bemonsterd om een verontreinigingsgradiënt aan te tonen. Locatie 1 is sterk verontreinigd, locatie 2 minder verontreinigd. Locatie 3 is relatief schoon en kan als referentiesediment dienen. Per lokatie wordt één monster genomen.

Per lokatie wordt één monster van 30 liter (zie bijlage 3) sediment verzameld en in pvc emmers van 10 l overgebracht. Wanneer het sediment vrij droog (zanderig) is, zal ca. 50 liter nodig zijn.

De emmers worden direct naar het lab getransporteerd, waar ze bij $4 \pm 2^\circ\text{C}$ worden opgeslagen. Wanneer de emmers niet direct naar het lab gaan, moeten ze zo koel mogelijk gehouden worden.

In tabel 5 en 6 (bijlage 3) staan de benodigde hoeveelheden sediment voor elke afzonderlijke test en analyse weergegeven.

2.5 Behandeling monsters.

2.5.1 Voorbehandeling sediment.

Het sediment van één lokatie wordt samen met het bovenstaande water m.b.v. een plexiglas staaf of een mechanische roerder gehomogeniseerd. Grote delen moeten van te voren uit het sediment verwijderd worden, eventueel door het sediment te zeven over een grove zeef zonder extra

water toe te voegen. Na homogenisatie wordt het sediment weer over de drie emmers verdeeld.

Na bezinking van het sediment gedurende één dag bij $4 \pm 2^\circ\text{C}$ wordt zoveel van het bovenstaande water afgeschonken en weggegooid, dat het slib 'net' nat is. De monsters worden gedurende de testen opgeslagen in gesloten emmers bij $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Voordat er een monster uit een emmer genomen wordt, moet de inhoud goed gemengd worden.

Om storing te voorkomen van in het sediment aanwezige macrofauna wordt het sediment voor de test met **chironomiden** gezeefd over een zeef van $500 \mu\text{m}$.

Opmerking: Droge sedimenten zijn nauwelijks te behandelen. Om met deze sedimenten te kunnen omgaan wordt verdund met gestandaardiseerd medium (b.v. DSW) in een volumeverhouding van 1:1 tot 1:2.

2.5.2 Bereiding sediment-watersysteem.

Eén deel nat voorbehandeld en gezeefd slib (2.5.1) en 4 delen standaardwater (b.v. DSW, bijlage 4) (v/v) worden overgebracht in een goed af te sluiten pot (glas of polycarbonaat) zo, dat deze niet meer dan voor de helft gevuld is. Van te voren wordt nauwkeurig het volumedeel van het natte sediment bepaald, zodat bij herhaling van de bereiding van het sediment-watersystemen een gelijk deel kan worden afgewogen.

Het sediment-watmengsel wordt gedurende 24 uur flink geschud (ca. 100 r.p.m.) op een schudmachine (of rollerbank) bij $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Schud het sediment-watmengsel (na evt. bewaren; 2.5.5) voordat het in een test gebruikt wordt (ca. drie dagen voor het inzetten van de test). De testvaatjes (b.v. glazen kristalleerschalen van 60 ml; $\varnothing 5,5 \text{ cm}$) worden gevuld met 50 ml mengsel. Het waterpeil wordt m.b.v. een viltstift op de testvaatjes aangegeven. Vervolgens worden de testvaatjes gedurende drie dagen bij $20 \pm 2^\circ\text{C}$ weggezet om het sediment te laten bezinken.

Opmerking:

Deze methode is gebaseerd op sedimenten, die een redelijke fractie fijne deeltjes bevatten. Grofkorrelige monsters moeten in kleine hoeveelheden geschud worden (potten voor 1/4 gevuld) om het materiaal volledig in beweging te houden. Na het schudden wordt het water afzonderlijk en het sediment m.b.v. een schep gelijkmatig over de testvaatjes verdeeld. Door de snelle bezinking van het materiaal kan de bezinktijd aanzienlijk verkort worden (b.v. 1 dag).

2.5.3 Bereiding elutriaat.

Elutriaat is het bovenstaande water uit een sediment-water systeem na schudden en bezinken (2.5.2).

2.5.4 Bereiding poriewater.

Poriewater wordt bereid door m.b.v. centrifugeren het aanhangende water van het sediment (2.5.1) te scheiden. Voor grote hoeveelheden poriewater wordt het voorbehandelde sediment in pvc zakken of in polycarbonaat potten gebracht en gecentrifugeerd gedurende 30 minuten op tenminste $2500 \times g$. De bovenstaande vloeistof (het poriewater) wordt in een erlenmeyer uitgeschonken. Het poriewater wordt gefiltreerd over $0,45 \mu\text{m}$.

Voor kleine hoeveelheden poriewater, t.b.v. een test met luminescerende bacteriën (ca. 10 ml), wordt sediment (2.5.1) in centrifugebuizen gecentrifugeerd en **niet** gefiltreerd.

Opmerking: Het verzamelen van poriewater uit zandig materiaal kan het beste uitgevoerd worden d.m.v. hoge druk filtratie.

2.5.5 Bewaren van behandelde monsters.

Sedimentmonsters en -mengsels, elutriaat en poriewater dienen tijdens de bewaarperiode bij 4 ± 2 °C in gesloten vaten/potten in donker bewaard te worden.

Het geniet de voorkeur de monsters zo snel mogelijk na opwerking te gebruiken. Uit praktisch oogpunt gezien is een bepaalde bewaartijd voor de diverse behandelde sediment- en watersystemen gesteld.

Sedimentmonsters kunnen 3 maanden bewaard worden, sediment-water-mengsels max. 1 maand. Voor gebruik moet het sediment-watermengsel eerst geschud worden.

Elutriaat en poriewater kan max. 1 week bewaard worden. **Uitzondering** hierop is poriewater voor de test met luminescerende bacteriën (2.6.5). Het poriewater voor deze test moet zo vers mogelijk bereid worden.

2.6 Meetmethoden.

2.6.1 Fysisch-chemische en chemische analyses aan sedimenten.

Voor het vaststellen van de verontreinigingsgraad van sedimenten worden gehalten aan organische en anorganische microverontreinigingen bepaald. Routinematig worden analyses uitgevoerd aan ca. 40 stoffen van een standaardlijst verbindingen en somparameters, welke is opgenomen in bijlage 5. Deze lijst sluit nauw aan bij de gewenste informatie ten behoeve van de normering waterbodems.

In specifieke gevallen, afhankelijk van lokale verontreinigingsbronnen of historische gegevens, kunnen aanvullend ook andere verbindingen geanalyseerd worden.

Voor een verdere chemische-analytische beoordeling en klassificatie worden gemeten gehalten omgerekend naar die voor een gedefiniëerde standaardbodem en zijn karakteristieken als organisch koolstof gehalte en percentage lutum ($< 2 \mu\text{m}$) nodig.

2.6.2 Randvoorwaarden in testsystemen.

Voorwaarde voor het uitvoeren van de testen is, dat parameters zoals pH, O_2 , ammonium, nitriet en zoutgehalte in het bovenstaande water, elutriaat en de reeks verdunningen van het poriewater binnen de randvoorwaarden liggen van het organisme (zie tabel 1.1; bijlage 1). De parameters ammonium en nitriet worden in eerste instantie gescreend m.b.v. testkits (Merckoquant; Merck, Amsterdam). Wanneer het gehalte voor deze parameters 2x boven de in tabel 1.1 opgegeven randvoorwaarden ligt, heeft het geen zin deze concentratie (c.q. test) in te zetten. In verband met

de onnauwkeurigheid van de testkits is het wel noodzakelijk de randvoorwaarden in het kritieke gebied chemisch te laten bepalen. De toxiciteit, die eventueel in die verdunning optreedt, kan mede veroorzaakt zijn door de randvoorwaarden.

Met de testkit wordt het vrije ammonium-(NH₄⁺)-ion gemeten. De toxiciteit wordt echter veroorzaakt door het ongedissociëerde ammoniak (NH₃). De concentratie NH₃ is afhankelijk van de pH en temperatuur. In bijlage 1 (tabel 1.2) staan de percentages weergegeven van het ongedissociëerde ammoniak (NH₃) t.o.v. het totaal ammonia (NH₄⁺ + NH₃) bij een bepaalde temperatuur en pH.

Om het volume van de testvaten zo min mogelijk te beïnvloeden is het raadzaam de randvoorwaarden te meten voordat er een verdunningsreeks gemaakt wordt. Wordt de waarde echter overschreden, dan is het ook noodzakelijk randvoorwaarden in de verdunningsreeks te meten. Sommige parameters, zullen niet in het testvat te meten zijn. Hiervoor moet een extra testvat (hoeveelheid) aangemaakt worden.

Bij extreem lage O₂-waarden wordt vóór het inzetten van de organismen het medium ca. 10 minuten matig belucht. Wanneer het O₂-gehalte te laag blijft is continue beluchting aan te bevelen. Voor hoge ammonium en nitrietgehaltenes worden geen verwijderingstechnieken en voor afwijkende pH-waarden geen correcties toegestaan, daar behandeling van het water gevolgen kan hebben voor de toxische componenten in het water. Indien het zoutgehalte te hoog is, moet de keuze van testorganisme hierop afgestemd worden. Voor zoutwatersedimenten komen andere organismen in aanmerking. *Corophium* (amphipode) en *Vibrio fischeri* (luminescerende bacteriën). Protocollen voor deze testen zijn ontwikkeld in opdracht van RIKZ (Schipper en Stronkhorst, 1999).

2.6.3 *Chironomus riparius*, in sediment (eipakket; 28 dagen).

Voor de bioassays in sediment worden (gedeeltes van) eipakketten van de soort *Chironomus riparius* (muggelarf) gebruikt van ≤ 2 dagen oud, die afkomstig zijn uit een bestaande gestandaardiseerde laboratoriumcultuur. De testen worden uitgevoerd bij 20 ± 2 °C en een dag-nacht ritme van 16 uur licht en 8 uur donker (niet kritisch).

De test met sediment van één lokatie wordt in viervoud uitgevoerd. Als **controle** op het te testen sediment wordt sediment van een relatief schone lokatie (hfst. 2.3) op dezelfde wijze meegenomen. Vooraf aan de sedimenttest worden eieren en jonge larven van *Chironomus* blootgesteld aan elutriaat.

In **twee** testvaatjes met ca. 50 ml elutriaat (2.5.3) van een te onderzoeken lokatie worden 3 helften van verschillende eipakketten ingezet. De helften van verschillende eipakketten worden volgens een random verdeling aan de elutriaat toegevoegd. Hierbij worden de eipakketten genummerd en wordt de random verdeling genoteerd. Na 4 dagen wordt gecontroleerd en genoteerd of de eipakketten zijn uitgekomen en worden de larfjes per uitgekomen (half) eipakket éénmalig gevoerd met 50 µl van een 2%-ige voedsel-suspensie (b.v. Trouvit). Na een week, wanneer de muggelarven zich in het 2de stadium bevinden, wordt een gedeelte van de larven overgezet in **vier** sediment-water testsystemen (2.5.2) van de lokatie. In ieder vaatje worden 25 larven uitgeteld. Bij het uittellen van de larven

wordt een schatting gemaakt van de overleving van de larven in het elutriaat (> of < 50% uitgekomen cq. overleefd).

Drie maal per week wordt het bovenstaande water gedurende 10 minuten belucht. Tegelijkertijd worden de larven gevoerd. De eerste week (t=7-14d) met 100µl van een 2%-ige gemalen en vers bereide voedsel-suspensie. De tweede week (t=14-21d) 150 µl en de derde week (t=21-28d) 200 µl.

Eén keer per week wordt het waterniveau met demiwater op peil gebracht, door met een pipet de benodigde hoeveelheid water met kracht in het vaatje te spuiten. Hierdoor wordt het sediment opgewoeld, maar blijven de kokertjes, die de muggelarven maken, in tact. Indien het waterpeil constant gebleven is wordt het sediment met een gedeelte bovenstaand water opgewoeld.

Randvoorwaarden (2.6.2) in één van de testvatjes worden gemeten aan begin en eind van de blootstelling aan elutriaat. Tijdens de blootstelling in het sediment-watersysteem worden de randvoorwaarden in het bovenstaande water aan begin en eind en één maal per week gemeten. De saliniteit van het bovenstaande water wordt alleen op t=0 gemeten.

De test wordt beëindigd op het moment dat de muggen in de controle gaan uitvliegen, maar in ieder geval na 28 dagen. De muggelarven worden voorzichtig over een r.v.s zeef van 250 µm uitgespoeld. Per testvatje wordt het aantal larven, poppen en muggen geteld en het stadium (m.b.v. een binoculair) bepaald, waarin de overlevende muggelarven zich bevinden. Ontsnapte muggen kunnen geregistreerd worden aan de hand van de in het water achtergebleven huidjes.

Na beëindigen van de test wordt (per testvatje) van alle 4de stadium larven (L4) direct het drooggewicht bepaald. Hiervoor worden de L4-larven even in lauw water (geen alcohol!) gedompeld en tesamen gedroogd tot constant drooggewicht. Het gemiddelde drooggewicht van chironomide-larven in SW-sediment, volgens bovenstaande testprocedure, bedraagt ca. 0,6 mg/L4-larve.

2.6.4 *Daphnia magna*, in poriewater (ca. 14 dagen).

Testen in poriewater worden uitgevoerd met *Daphnia magna* (≤ 24 uur oud) uit een bestaande gestandaardiseerde laboratoriumcultuur. De testen worden uitgevoerd bij 20 ± 2 °C en een dag-nacht ritme van 16 uur licht en 8 uur donker (niet kritisch). De methode, die gebruikt wordt, is overeenkomend met de richtlijn van de EG (1986) en de OECD 211 (1998).

Poriewater van een lokatie wordt in een verdunningsreeks met een rede van 1,8 getest; waarvan de hoogste concentratie onverdund poriewater en de laagste 10% (v/v) is. Voor het bepalen van de EC50 of LC50 zijn minimaal 5 concentraties nodig. Voor het gebruik van de test voor de Triade-beoordeling (zie opmerking 2.10.2) kan met 4 concentraties worden volstaan (10-32-56-100% v/v). Als verdunningsmedium wordt het kweekmedium voor daphnia's gebruikt (b.v. Elendt M4; zie bijlage 4), dat tevens als **controle** voor de test dient.

Poriewater wordt voor het verdunnen eventueel kort (ca. 5 min.) belucht, wanneer het O₂-gehalte < 3 mg/l bedraagt.

Per concentratie worden 10 glazen potjes van ca. 100 ml gevuld met 50 ml medium.

In ieder testvat wordt één jonge daphnia (≤ 24 uur) uitgezet afkomstig van een gezonde kweek, die geen tekenen van stress, bleke daphnia's, mannetjes of wintereieren vertoont. De ouders moeten tenminste 14 dagen oud zijn (≥ 3de broed). De jonge daphnia's worden dagelijks gevoerd met een Chlorellasuspensie overeenkomend met 0,1-0,2 mg/l

C/daphnia/dag (ca. 3×10^7 cellen/daphnia/dag). De hoeveelheid is afhankelijk van de kwaliteit van het voedsel en kan voor ieder laboratorium verschillen. De hoeveelheid moet aangepast worden aan het voor de test geldende criterium m.b.t. het aantal jongen (2.7.3). Het medium wordt 2x per week ververs. Daarbij worden de oude daphnia's overgezet in het testvat met vers medium.

Randvoorwaarden voor pH, O₂, NO₂⁻, en NH₄⁺-gehalte (2.6.2) worden gemeten en genoteerd aan het begin en einde van de test in de controle en de hoogste concentratie en op t=7 en t=14 dagen in het oude en verse medium van deze concentraties. In dien de waarden in de hoogste concentratie afwijken van die van de controle, dan moeten deze parameters ook in de verdunningen gemeten worden. Treedt er gedurende de test in een verdunning 100% sterfte op, dan worden van deze concentratie ook de parameters gemeten. Op t=0 wordt de saliniteit van het onverdunde poriewater gemeten.

Het gedrag wordt bestudeerd en de sterfte van de daphnia's dagelijks genoteerd. Het moment van reproductie wordt dagelijks bijgehouden en genoteerd. Het aantal gereproduceerde daphnia's wordt drie maal per week geteld en verwijderd. In verband met de voedselhoeveelheid dient dit bij voorkeur zo snel mogelijk na reproductie te worden uitgevoerd.

Hoewel de OECD-guideline een testduur van 21 dagen voorschrijft, kan de test in de TRIADE-benadering uit oogpunt van kosten-effectiviteit beëindigd worden na minimaal 14 dagen, wanneer er in de controle tenminste drie broedsels voltooid zijn. Is dit niet het geval, dan wordt de test zolang doorgezet tot aan dit criterium wordt voldaan, met een maximum van 21 dagen. Testresultaten, die in minder dan 21 dagen verkregen zijn, zijn voldoende onderscheidend en kunnen voor de interpretatie van de gegevens nog steeds vergeleken worden met stofspecifieke toxiciteitsgegevens van 21 dagen.

2.6.5 *Vibrio fischeri* in poriewater (5,15 of 30 min).

Testen in poriewater worden uitgevoerd met luminescerende bacteriën (*Vibrio fischeri*), in gevriesdroogde vorm in de handel verkrijgbaar. De testen worden uitgevoerd m.b.v. een incubator bij 15 ± 2 °C. De methode, die gevolgd wordt is beschreven in de norm ISO 11348-3 (1999).

Poriewater wordt in een verdunningsreeks met een rede van 2 getest, waarvan de hoogste concentratie overeenkomt met een 45%-ige verdunning van het poriewater. De verdunningsreeks bestaat uit 4 concentraties en een controle (verdunningsmedium).

Het poriewater wordt vooraf op de pH gecontroleerd en eventueel gecorrigeerd. Voor de meting worden de zoete watermonsters op de juiste osmotische waarde gebracht met een NaCl-oplossing. Voor zoute monsters wordt er indien nodig een correctie toegepast.

Het meten van de toxiciteit van het poriewater met *V. fischeri* wordt uitgevoerd m.b.v. een lichtmeter. Een gedetailleerde beschrijving en voorwaarden voor de test worden gegeven in de norm ISO 11348 (1999). De meting wordt in duplo uitgevoerd en neemt ca. één uur in beslag. De reductie van de luminescentie onder invloed van verschillende verdunningen van het poriewater wordt gemeten na 5, 15 en 30 minuten.

2.7 Verwerking gegevens en statistische toetsing.

2.7.1 Chemische analyses.

De chemische analysegegevens van de sedimenten worden ingevoerd in het programma TOWABO, waarmee de gemeten gehalten omgerekend worden naar die voor een gedefiniëerde standaardbodem (OC-gehalte 5%; lutumgehalte 25%). M.b.v. deze waarden kan het programma een classificatie van het sediment aangeven volgens de normering vierde nota Waterhuishouding (Ministerie van Verkeer en Waterstaat, 1998).

2.7.2 *Chironomus riparius* in sediment-water.

Van de vier testvatjes per lokatie wordt het gemiddelde percentage sterfte berekend.

Uit het aantal dode larven en larven, die zich in het stadium <math><L_4</math> bevinden, wordt het gemiddelde percentage groeivertraging berekend.

Van het totaal drooggewicht van de vierde stadium larven per testvatje wordt het gemiddelde drooggewicht per larve berekend. Van de 4 gemiddelden wordt het gemiddelde drooggewicht (in mg) en standaardafwijking voor de lokatie ($n=4$) berekend.

Significantie ($P<0,05$) van verschillen in sterfte, groeivertraging en drooggewicht van de chironomidenlarven van de lokatie t.o.v. de controlelokatie worden statistisch getoetst m.b.v. een ANOVA-test (Sokal and Rohlf, 1981). Deze test staat bewerkt in het statistische programma Toxstat (versie 3,3; Gulley et al., 1988).

Voorwaarden voor de geldigheid van de test met **chironomiden** zijn:

- de sedimenten en waterlaag moeten voldoen aan de randvoorwaarden (2.6.2; bijl.1).
- de sterfte in het controle-sediment moet gemiddeld ≤ 10 % bedragen.
- ≥ 80 % van de chironomidelarven in het controlesediment moet zich in stadium 4 (of verder) bevinden.
- het gemiddelde drooggewicht per L4-larve in controle sediment moet 0,3 mg bedragen

2.7.3 *Daphnia magna* in poriewater.

Voorwaarden voor de geldigheid van de **daphniatest** zijn:

- het poriewater (en -verduningen) moet voldoen aan de randvoorwaarden (2.6.2; bijlage 1).
- de sterfte in de controle na drie broedsels moet ≤ 20 % bedragen.
- de eerste jongen in de controle moeten geboren worden binnen negen dagen ($\leq 9d$).
- het gemiddelde van het cumulatief aantal gereproduceerde jongen in de controle moet na drie broedsels tenminste 30 (≥ 30) bedragen.
- de variatiecoëfficiënt van het gemiddeld aantal gereproduceerde jongen in de controle moet $\leq 25\%$. (CV = standaardafwijking gedeeld door het gemiddelde).

De LC50.xx dagen (in geval van 5 conc) voor daphnia's wordt berekend m.b.v. een LC50 computerprogramma (RIZA, 1991). In dit programma wordt de LC50 geschat volgens de "maximum likelihood" methode met gebruikmaking van een iteratieve benaderingswijze (Kooijman, 1981). Als beginschatters voor deze benadering worden de parameterschattingen volgens de Spearman Karber methoden (Hamilton et al., 1977) gebruikt. De NOEC-waarde voor sterfte wordt bepaald door die concentratie, waarin $\leq 20\%$ sterfte optreedt.

Voor de reproductie wordt de parameter r_m (populatiegroei parameter of intrinsic rate of natural increase) berekend. Met deze parameter kan een schatting gegeven worden van het effect op de groeisnelheid van een populatie in het veld. In de berekening van de populatiegroeisnelheid worden ook gegevens meegenomen van de tijdens de test gestorven daphnia's. De groeisnelheid van een populatie wordt voornamelijk bepaald door het tijdstip van de eerste broedsels. Door de tijdsafhankelijke sterfte en reproductie in de berekening mee te nemen, kan ook reproductievertraging aangetoond worden.

De reproductie(r_m)-waarden worden berekend m.b.v. een iteratief programma gebruikmakend van de formule van Lotka (Van Leeuwen et al., 1985):

$$\sum l_x m_x e^{-r_m x} = 1$$

waarbij l_x de fractie is van het aantal overlevende vrouwtjes per concentratie, en m_x het aantal gereproduceerde jongen per overlevend vrouwtje op het tijdstip x .

Voor de berekening van de r_m -waarde worden telkens de sterfte en reproductie van twee daphnia's samengenomen. Per concentratie ontstaan er dus 5 waarden voor de r_m . Uit deze 5 waarden wordt de gemiddelde r_m en de standaardafwijking berekend. Een voorbeeld van een r_m -berekening wordt gegeven in bijlage 6.

Opmerking:

Deze methode kan alleen toegepast worden als er in een concentratie niet meer dan 50% sterfte is opgetreden. Wanneer er meer sterfte is opgetreden kan een r_m weergegeven worden door deze voor alle daphnia's tegelijk te berekenen.

De NOEC-waarde van de r_m t.o.v. de controle (verdunningsmedium) wordt bepaald m.b.v. Williams (1971, 1972) of in geval van stimulatie m.b.v. ANOVA-Dunnnett (Sokal and Rohlf, 1981; Dunnnett, 1955; 1964). De NOEC-waarde is die geteste concentratie, die ligt onder de concentratie, waarin een significant effect gevonden is. Voorwaarde voor deze testen is, dat in de concentratie niet meer dan 50% sterfte opgetreden is. Beide testen staan bewerkt in het statistisch programma Toxstat (versie 3.3; Gulley et al., 1988).

2.7.4 *Photobacterium phosphoreum* in poriewater.

Een toelichting van de berekeningsmethode wordt gegeven in de ISO norm 11348 (1999). Uit de gevonden afname in bioluminescentie in verschillende verdunningen van het poriewater en het percentage verdunning wordt een lineair verband berekend bij verschillende blootstellingstijden. De formule hiervoor is:

$$\ln \Gamma = b \ln C + \ln a$$

waarin C de concentratie is van het poriewater in het testvatje (%; v/v); Γ is een maat voor de afname in bioluminescentie. Deze laatste waarde is berekend uit de formule:

$$\Gamma = \frac{R_t \times I_0}{I_t} - 1$$

waarin R_t de correctiefactor is voor de blancoafname; I_0 is de luminescentie van een blanco-toets suspensie bij $t=0$; en I_t is de bioluminescentie van een toets suspensie bij een blootstellingstijd t .

Uit de dosis-effectrelaties bij drie verschillende blootstellingstijden ($t=5, 15$ en 30 min) wordt de EC20 en EC50-waarde bepaald. Van de drie blootstellingstijden wordt de laagste EC20 (resp EC50) met 95% betrouwbaarheidsinterval gegeven (ISO 11348,1999).

Voorwaarden voor de geldigheid van de **luminescentietest** zijn:

- het poriewater (en -verdunningen) moet voldoen aan de randvoorwaarden (2.6.2; bijl. 1).
- de blanco afname R_t moet tussen 0,6 en 1,3 liggen.
- de laagste van de drie gemiddelde EC20/EC50-waarden moet kunnen worden geïnterpoleerd.
- de EC20/EC50-waarden van de duplotoetsen mag niet meer dan 15% van elkaar afwijken.

2.8 Kwaliteitsbewaking.

Sedimenten dienen bij voorkeur zo snel mogelijk na bemonsteren verwerkt te worden, maar in ieder geval binnen drie maanden. Na een bewaartijd van 112 dagen zijn geen significante verschillen in effecten bij muggelarven aangetoond (Othoudt et al., 1991). Definiëer de gebruikte controle- en referentiesedimenten zo goed mogelijk (bijl. 2).

Wanneer voor de kweken en testen i.p.v. een synthetisch medium een natuurlijk medium wordt gebruikt moet het medium zo goed mogelijk gedefiniëerd (geanalyseerd) worden.

De gevoeligheid (kwaliteit) van de gekweekte chironomiden en daphnia's wordt aangetoond met een acute test met kaliumdichromaat ($K_2Cr_2O_7$) of 3,4-dichlooraniline (DCA) in water. Voor de chironomidentest worden tweede stadium larven gedurende 96 uur blootgesteld aan een verdunningsreeks. De acute daphniatest wordt uitgevoerd volgens internationale richtlijnen (ISO 6341, 1989; OECD 202, 1984) en beoordeeld na 24 resp. 48 uur. In bijlage 10 staat een korte beschrijving van de test voor chironomiden weergegeven. In tabel 1 staan de ranges voor de LC/EC50-waarden van de referentiestoffen voor beide organismen aangegeven, zoals deze door de ISO-norm worden voorgeschreven (daphnia's) en door ervaring zijn bepaald (chironomiden).

EC/LC50-waarden en het 95% betrouwbaarheidsinterval worden berekend m.b.v. het LC50-programma (RIZA, 1991; zie ook 2.7.3).

De kwaliteit van een charge bacteriën wordt bepaald met de referentiestof fenol of zink (ISO 11348, 1999).

Controle op de uitvoering van bioassays kunnen worden bewaakt door deelname aan ringonderzoek en het uit laten voeren van contra-expertise door een onafhankelijke instantie.

Tabel 1: LC/EC50-waarden voor de referentiestoffen met chironomiden en daphnia's ($K_2Cr_2O_7$ en 3,4-DCA) en bacteriën (fenol en Zn).

organisme	teststof	effect	range (mg/l)	referentie
<i>D. magna</i> (<1 dag)	$K_2Cr_2O_7$	LC/EC50.24	$0,9 < x < 2,4$	ISO 6341
	3,4-DCA	LC/EC50.48	$0,1 < x < 0,7$	RIZA*;Adema en Vink (1981)
<i>C. riparius</i> (L2)	$K_2Cr_2O_7$	LC/EC50.96	$20 < x < 75$	RIZA*
	3,4-DCA	LC/EC50.96	$4 < x < 12,5$	RIZA*
<i>V. fischeri</i>	fenol	EC20.5 min	$3 < x < 10$	ISO 11348 (1999)
	Zn** ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	EC20.30 min	$0,2 < x < 2$	ISO 11348 (1999)

* - eigen onderzoek RIZA.

** - NaCl vervangen door sucroseoplossing (ISO 11348, 1999)

2.9 Rapportage.

Van de verrichtte analyses en bioassays worden de verkregen gegevens zo volledig mogelijk in de rapportage verwerkt. Het verdient aanbeveling een samenvattende tabel met cruciale gegevens te vermelden in het rapport. Ruwe gegevens kunnen in een bijlage toegevoegd worden.

Chemische analyses.

Het standaardanalysepakket van het RWS (Visser et al., 1991) in combinatie met het programma TOWABO levert de volgende gegevens op:

- droge stofgehalte (%)
- korrelgrootteverdeling (% < 2, 10, 16, 50 en 63 µm)
- organisch koolstof (%)
- gehalten aan zware metalen (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb en Zn in mg/kg ds)
- gehalten aan PAK's, PCB's en OCB's (in µg of mg/kg ds)
- eventueel specifieke bepalingen afhankelijk van de lokatie.
- gehalten van bovenstaande parameters, omgerekend naar de standaardbodem
- klassebeoordeling volgens de vierde nota Waterhuishouding

Randvoorwaarden.

De parameters gemeten in het poriewater, elutriaat of bovenstaande water in de testsystemen:

- pH
- O₂-gehalte (mg/l)
- NO₂-gehalte (mg/l) (testkit of analytisch nauwkeurig)
- NH₄⁻ en (berekende) NH₃-gehalte (mg/l) (testkit of analytisch nauwkeurig)
- saliniteit (‰) of Cl-gehalte (in g/l)

Test met chironomiden.

- ruwe gegevens per testvaatje (aantal ingezet, overleving larven, poppen, muggen, aantal larven per stadium, gem. drooggewicht L₄)
- geschatte sterfte eipakketten in elutriaat
- gem. sterfte (%)
- gem. groeivertraging (%)
- gem. drooggewicht (mg) en s.d. van de 4de stadium larven
- significantie (P<0,05) van sterfte, groeivertraging en drooggewicht t.o.v. controlesediment.
- LC/EC50-waarde (96u) voor één van de referentiestoffen.

Test met daphnia's.

- ruwe gegevens per testvaatje (sterfte en aantal jongen per daphnia per dag)
- per concentratie sterfte (%) en de r_m-waarden
- LC50.xxd (" 95% bi.) (in % verdund poriewater)
- NOEC_{sterfte} (in % verdund poriewater)
- NOEC_{reprod} (P<0,05) (in % verdund poriewater)
- LC/EC50-waarde (24 cq. 48u) voor één van de referentiestoffen.

Test met luminescerende bacteriën.

- EC20,t met 95% bi. (in % verdund poriewater)
- bijbehorende regressielijn: $\ln \Gamma = b \ln C + \ln a$

- grafische weergave van de conc.-effectrelatie
- EC20 (5 cq. 30 min) met 95% bi. van één van de referentiestoffen.

2.10 Interpretatie van de gegevens.

2.10.1 Klasseïndeling sediment.

Voor de afzonderlijk gemeten parameters kan aan de hand van overschrijdingen van een klassegrens (criterium) een verontreinigingsklasse aangegeven worden. Er is een indeling gemaakt in drie effectklassen: -, " en +.

Deze klasseïndeling is als volgt weergegeven:

	klasse +	ernstig effect
criterium 2 -----		
	klasse "	matig effect
criterium 1 -----		
	klasse -	weinig tot geen effect

De eindbeoordeling van de parameter bioassays wordt gevonden door alle -, " en + aanduidingen te combineren. De gevoeligste parameter is bepalend voor het eindoordeel. Wordt b.v. voor één parameter een + gevonden en de rest van de parameters een - of ", dan is de eindklassificering van het sediment voor de bioassays +.

Een voorbeeld van een dergelijke interpretatie is uitgevoerd door Mulder en Espeldoorn (1992) en Mulder (1993).

2.10.2 Criteria voor de bioassays.

Voor iedere parameter zijn klassegrenzen (criterium 1 en 2) vastgesteld, waardoor voor een geteste parameter (sterfte, groei etc.) een -, " en + aanduiding gegeven kan worden.

Chironomiden.

Voor de sterfte, groeivertraging en het drooggewicht van **chironomiden** zijn de volgende klassegrenzen (criteria) vastgesteld:

voorwaarde: effecten significant t.o.v. de controle; (P<0.05):

<u>Sterfte:</u>	criterium 1: 10% sterfte	(> 10% → klasse ±)
	criterium 2: 50% sterfte	(≥ 50% → klasse +)

Tenzij de sterfte in het eistadium en/of eerste larvale stadium ≥ 50% bedraagt, dan valt het sediment in klasse +.

<u>Groeivertraging:</u> (stadium)	criterium 1: 10% in stadium L2, L3 of dood.	(> 10% → klasse ±)
	criterium 2: 50% in stadium L2, L3 of dood.	(≥ 50% → klasse +)

<u>Ontwikkeling:</u> (drooggewicht)	criterium 1: 10% minder t.o.v. controle (> 10% → klasse ±)
	criterium 2: 25% minder t.o.v. controle (≥ 25% → klasse +)

Daphnia's.

Voor **daphnia's** zijn de volgende criteria van toepassing:

<u>NOEC_{sterfte}</u> *	criterium 1: 100% (v/v) (< 100% (v/v) → klasse ±)
	criterium 2: 10% (v/v) (≤ 10% (v/v) → klasse +)

<u>NOEC_{reproductie}</u> :	criterium 1: 100% (v/v) (< 100% (v/v) → klasse ±)
	criterium 2: 10% (v/v) (≤ 10% (v/v) → klasse +)

Tenzij de sterfte binnen 48 uur in onverdund poriewater ≥ 50% bedraagt, dan valt het sediment in klasse +.

*Opmerking:

Er kan pas een NOEC_{st} bepaald worden, als drie opeenvolgende verdunningen van het poriewater een trend volgen. Hiermee wordt bedoeld, dat sterftepercentages in een verdunning gelijk of hoger dan de voorgaande verdunningsconcentratie moet zijn. Uitzondering hierop is het onverdunde poriewater. Uit ervaring is gebleken, dat het regelmatig voorkomt, dat effecten in onverdund poriewater lager zijn dan in de voorgaande concentratie. Mogelijk dat door extra voedsel (nutriënten) in het poriewater toxische effecten gemaskeerd worden. Mede hierdoor kan er ook een stimulatie in de reproductie (r_m) optreden.

Rekening houdend met dit feit is gekozen voor tenminste **vier** testconcentraties. Om sedimenten m.b.v. het bovenstaande classificatiesysteem te kunnen beoordelen kan volstaan worden met een concentratiereeks, die ligt tussen 10 en 100% (v/v; incl. beide conc). De voorkeur voor het uitvoeren van de test gaat uit naar een reeks van 10-32-56-100% (v/v).

Luminescerende bacteriën.

Voor de test met **luminescerende bacteriën** zijn de volgende criteria vastgesteld:

<u>EC20:</u>	criterium 1: 50% (v/v)* (< 50% (v/v) → klasse ±)
	criterium 2: 10% (v/v)* (≤ 10% (v/v) → klasse +)

*Opmerking:

De EC20 wordt vaak weergegeven als TI waarde (=100/EC20). Criterium 1 treedt dan op bij een TI waarde van 2; criterium 2 bij een TI waarde van 10.

2.10.3 Verklaarbaarheid effecten *D. magna*, *C. riparius* en *V. fischeri*.

De verklaarbaarheid van de in de bioassay gevonden effecten is bepaald door per stof te kijken in hoeverre de concentratie in het sediment het in de literatuur gerapporteerde no observed effect concentrations (NOEC) voor

de desbetreffende bioassay overschrijdt. Voor de TRIADE beoordeling is een lijst met NOEC's voor de verschillende organismen opgesteld. Deze lijst wordt momenteel geupdate en zal in de nieuwe versie van deze TRIADE verschijnen. Per stof worden NOEC-overschrijdingfactoren berekend door gestandaardiseerde gehalte van elke contaminant te delen door de NOEC van die contaminant. Dit levert per stof en per testorganisme het aantal TU's (Toxic Units). Is het aantal TU's hoger dan 1, dan kan deze stof alleen al verantwoordelijk worden beschouwd voor eventueel waargenomen toxiciteit. Om rekening te houden met combinatietoxiciteit worden de TU's per stofgroep gesommeerd. Wanneer de som TU de waarde 1 overschrijdt betekent dit dat de gevonden effecten in het sediment worden veroorzaakt door de verontreinigingen in het sediment. De gevonden effecten zijn verklaard.

Voorbeeld:
Effecten zijn verklaarbaar.

contaminant	NOEC daphnia (mg/kg sediment)	gestand. gehalten sediment (mg/kg sediment)	TU	klasse-indeling
As	4200	24.8	< 0.1	-
Cd	6.9	21.9	3.2	+
Cr	967	63.5	< 0.1	-
Cu	197	108.9	0.55	-
Hg	8.2	0.5	< 0.1	-
Pb	3840	210	< 0.1	-
Ni	53.3	102	1.9	±
Zn	3080	1607	0.52	-
			Σ 6.17	+

0.1 x NOEC-grens wordt relevant geacht met het oog op combinantie toxiciteit. (<0.1 doet niet mee in de optelling)

klasse-indeling:

- = TU < 1

± = TU ≥ 1

+ = TU ≥ 3

3 Bioaccumulatietesten (in het laboratorium)

3.1 Inleiding.

Onder gestandaardiseerde laboratoriumcondities worden organismen gedurende vier weken blootgesteld aan verzamelde monsters van de waterbodem. Na de blootstellingstijd worden de organismen uit het bodemmateriaal gezeefd en voor analyse gereed gemaakt. Hierbij worden oligochaeten en chironomiden gedurende een dag zowel inwendig als uitwendig schoongespoeld. Na vriesdrogen wordt in het materiaal een analyse van de gewenste stof uitgevoerd.

Risico's voor wormetende vogels, die kunnen optreden als gevolg van bioaccumulatie in de voedselketen kunnen worden beoordeeld door vastgestelde MTR's te vergelijken met gemeten gehalten aan contaminanten in oligochaeten en chironomiden.

3.2 Materiaal.

3.2.1 Bereiding sediment-water systeem.

Voor de bioaccumulatieexperimenten worden dezelfde sedimenten gebruikt als onder hoofdstuk 2.2 beschreven. Ook de bemonstering en voorbehandeling van de sedimenten gebeurt op dezelfde wijze (zie 2.4; 2.5.1).

Per sediment worden twee testvaten met sediment-water aangemaakt. In weckpotten van 4 liter wordt één liter nat voorbehandeld sediment (2.5.1) en 2 liter standaardwater (b.v. DSW, bijlage 4) gebracht. Het sediment-watermengsel wordt gedurende 24 uur flink geschud (ca. 100 r.p.m.) op een schudmachine (of rollerbank) bij $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Na schudden wordt dit mengsel in een testaquarium van ca. 5 liter (h x b x l; 15 x 15 x 25 cm) overgebracht en aangevuld met 2 liter standaardwater. Dit mengsel wordt m.b.v. een mechanische roerder nog eens een half uur geroerd.

(Wanneer de mogelijkheid bestaat grotere schudvaten te gebruiken, kan het mengsel ook in een keer bereid worden).

Voor gebruik worden de aquaria 2 tot 3 dagen weggezet bij de voor de experimenten geldende temperatuur, om het sediment te laten bezinken. Tijdens het bezinken wordt het bovenstaande water matig belucht.

3.2.2 Testorganismen.

Oligochaeten (wormachtigen)

Oligochaeten van verschillende soortensamenstelling (o.a. *Tubifex sp.* en *Naididae sp.*) worden verkregen van een dierenspecialzaak. Deze organismen zijn in voldoende biomassa te verkrijgen (porties van ca. 50 gram). Oorspronkelijk zijn de organismen uit het veld verzameld, waardoor de kwaliteit en chemische contaminatie voor elke partij sterk kan wisselen. Een week voor gebruik van de organismen worden ze in een doorstroomaquarium gebracht, waarin ze onder continue doorstroming met kopervrij water schoongespoeld worden tot een laag contaminatieniveau. De doorstroombak wordt continu belucht. De organismen worden drie maal per week gevoerd met 10 ml van een 10%-

ige voedsel-suspensie (b.v. Trouvit, Trouw & Co, Putten) per 150 g organismen. Het is niet bekend welk effect voeren heeft op de afbraak en uitscheidingsnelheid van verontreinigde componenten in de oligochaeten.

Chironomiden (muggelarven)

Voor de bioaccumulatie-experimenten kunnen ook muggelarven worden gebruikt van het tweede larvale stadium van de soort *Chironomus riparius*, die afkomstig zijn uit een bestaande gestandaardiseerde laboratoriumcultuur. Gezien de benodigde aantallen wordt de voorkeur gegeven aan de eenvoudiger te verkrijgen oligochaeten.

3.3 Methode.

3.3.1 Bioaccumulatie-experiment.

De experimenten worden uitgevoerd bij 15 ± 2 °C en een dag-nacht ritme van 16 uur licht en 8 uur donker (niet kritisch). Voor oligochaeten kan een hogere temperatuur (20 ± 2 °C) gekozen worden, om de biologische beschikbaarheid van stoffen in bioassays (bij 20°C) beter te kunnen vergelijken. Muggelarven groeien te snel bij 20°C, waardoor ze geen 4 weken blootgesteld kunnen worden, voordat ze uitgroeien tot volwassen mug.

De test met sediment van één lokatie wordt in duplo uitgevoerd. Het bovenstaande water wordt continu belucht. De bakken moeten goed afgesloten worden met een glasplaat om verdamping van de waterlaag tegen te gaan. Afbraak van met name PAK's is tegen te gaan door de bakken af te dekken met aluminium-folie en/of geel licht te gebruiken. Wekelijks wordt een aantal randvoorwaarden zoals pH, O₂, NH₄⁺, NO₂⁻ gecontroleerd. De saliniteit wordt aan het begin van het experiment gemeten. In bijlage 1 staan randvoorwaarden voor chironomiden en oligochaeten weergegeven.

Als **controle** op de test kan een sediment van een relatief schone lokatie meegenomen worden. Het SW-sediment (2.3) bleek minder geschikt als controlesediment, omdat zich in dit sediment veel organisch materiaal bevindt, dat moeilijk van de organismen te verwijderen is.

In ieder geval wordt een **controle** van de organismen meegenomen.

Oligochaeten.

Per aquarium wordt 14-16 gram oligochaeten (3.2.1) op basis van natgewicht ingezet. Deze hoeveelheid komt overeen met 2-3 gram drooggewicht. Ter controle wordt eenzelfde hoeveelheid organismen ingevroren voor chemische analyse.

De organismen worden drie maal per week gevoerd met 1 ml van een 10%-ige voedselsuspensie (b.v. Trouvit).

Na afloop van de test wordt een deel van het bovenstaande water afgetapt. De oligochaeten worden m.b.v. een kunststof zeef van 300 µm uit het sediment gezeefd. Gedurende een dag worden ze in een afgesloten petrischaal in het bovenstaande water gehouden, om zoveel mogelijk organisch materiaal kwijt te raken. Een hulpmiddel hierbij is een papierfilter.

De organismen hebben de neiging om onder het filter te kruipen terwijl het organisch materiaal er bovenop blijft liggen.

Bovendien scheiden de oligochaeten in één dag het grootste gedeelte van hun darminhoud uit. Hierbij is aangenomen, dat binnen deze periode de lichaamsconcentratie van de organismen niet door eliminatie beïnvloed wordt.

Na het schoonspoelen van de oligochaeten worden ze per aquarium in een glazen potje ingevroren en gevriesdroogd, waarna chemische analyse kan plaatsvinden.

De hoeveelheid organismen is voldoende voor het bepalen van zware metalen, PAK's, PCB's en OCB's.

Chironomiden.

De bioaccumulatie-experimenten met chironomiden wordt op dezelfde wijze uitgevoerd als met de oligochaeten. Per aquarium zijn ca. 25 eipakketten nodig om voldoende biomassa in te zetten. Ter **controle** worden tweede stadium larven opgekweekt in standaardwater tot vierde stadium larven op dezelfde manier en met dezelfde hoeveelheid voedsel als voor het bioaccumulatie-experiment.

De chironomiden worden driemaal per week gevoerd met 200 mg fijngemalen voedsel (b.v. Trouvit) per 15 g biomassa (natgewicht).

Na afloop van de test wordt een deel van het bovenstaande water afgetapt. De chironomiden worden m.b.v. een kunststof zeef van 200 µm uit het sediment gezeefd. Gedurende een dag worden ze in een afgesloten petrischaal in het bovenstaande water gehouden, om zoveel mogelijk organisch materiaal kwijt te raken.

Na het schoonspoelen van de chironomiden worden ze per aquarium in een glazen potje ingevroren en gevriesdroogd, waarna chemische analyse kan plaatsvinden.

3.3.2 Chemische analyses in organismen.

Voor de analyses van microverontreinigingen in organismen zijn geen (inter)nationaal gestandaardiseerde methoden beschikbaar. Door diverse onderzoekers (De Wolf, 1988; Boschker, 1989 en Tijink, 1990) zijn bij het RIZA methoden ontwikkeld voor PCB's, OCB' en PAK's. De concentraties van deze verbindingen worden uitgedrukt in mg/kg vet. Banerji et al. (1990) hebben de ervaringen van het RIVO, het IVM, het RIVM en RIZA gecombineerd tot een manual, waarin vooral het accent gelegd wordt op de voorbehandeling en opwerking van het biologische materiaal.

PAK's

Voor het bepalen van PAK's in organismen is o.a. in samenwerking met de afdeling IML van het RIZA een methode beschreven door Boschker (1989) en Tijink (1990). De gevriesdroogde organismen (ca. 500 mg drooggewicht) worden gedroogd met MgSO₄. Vervolgens worden de PAK's verbindingen in een Soxhlett-opstelling met dichloormethaan uit het

materiaal geëxtraheerd. Voor een clean-up van het eluaat wordt het eluaat op een silicagel-kolom gebracht en geëluëerd met pentaan. Na droogdampen tot constant gewicht wordt het vetgehalte bepaald (gewogen). Het residu wordt opgelost in methanol en vervolgens bepaald m.b.v. een HPLC met een fluorescentiedetector.

PCB's en OCB's.

Het bepalen van PCB's en OCB's in organismen is door De Wolf (1988) beschreven. Een hoeveelheid van ca. 500 mg (drooggewicht) gevriesdroogde organismen wordt na drogen met NaSO₄, m.b.v. een Soxhlett-opstelling geëxtraheerd met pentaan. In een Kuderna-Danish opstelling wordt het extract drooggedampt tot 5 ml. Na droogdampen tot constant gewicht, wordt het vetgehalte bepaald (gewogen). Het residu wordt in pentaan opgenomen en gaschromatografisch bepaald.

Zware metalen.

De gevriesdroogde organismen worden gedestruëerd met salpeterzuur m.b.v. een microwave oven. De gehalten aan zware metalen worden vervolgens bepaald m.b.v.

atomaire absorptie spectrometrie (AAS) volgens de methode, die gebruikt wordt voor het analyseren van metalen in sediment (bijlage 5). Concentraties in de organismen worden uitgedrukt in mg/kg ds.

3.3.3 Overige chemische analyses.

Voor het verkrijgen van een indruk in de biologische beschikbaarheid van verontreinigingen vanuit het sediment is het noodzakelijk deze verontreinigingen in sediment of poriewater te analyseren. Hiervoor bestaan standaard analyserichtlijnen (zie bijlage 5).

Contaminatie gedurende de experimenten kan plaatsvinden door contaminanten, die zich in het voedsel bevinden. Van verschillend visvoer zijn analysegegevens bekend (zie bijlage 11) voor metalen en linaan. Ander gebruikt voedsel moet nauwkeurig gedefinieerd worden.

3.4 Bioaccumulatie theorie.

Bioaccumulatie van stoffen door een waterbodemon organisme verloopt via rechtstreekse bioconcentratie uit het water en soms ook door consumptie van voedsel en sediment. Naast deze opname van stoffen vinden er in het organisme ook omzetting, afbraak en afvoer van sommige opgenomen stoffen plaats. Voor de meeste stoffen, waarvoor in de vierde nota Waterhuishouding een getalswaarde voor de signaleringswaarde is opgenomen, wordt aangenomen, dat in de 28-dagen durende test een evenwicht is bereikt tussen de concentraties in het sediment en het poriewater enerzijds en het organisme anderzijds. Uit eerdere onderzoeken met accumulatie van PAK in oligochaeten en *C. riparius* blijkt al na ongeveer 30 uur een stabilisatie in de concentratieverdeling van een stof over de verschillende milieucompartimenten op te treden (van de Guchte e.a., 1988; Tijink, 1990).

3.4.1 Bioaccumulatie organische microverontreinigingen.

De drie parameters die van belang blijken voor de verdeling van hydrofobe organische koolwaterstoffen in een waterbodemsysteem zijn de organische koolstoffractie in het sediment, het poriewater/elutriaat en de vetfractie in het organisme (Tijink, 1990). Als wordt aangenomen dat opname van deze groep stoffen vooral via de waterfase plaatsvindt, dan kan de uiteindelijk bereikte evenwichtsconcentratie beschreven worden met de 'equilibrium partitioning' theorie (Di Toro et al., 1991). De verdeling van een stof over de verschillende milieucompartimenten (bodem, water, organisme) wordt volgens de equilibrium partitioning theorie weergegeven door de volgende vergelijkingen:

Verdeling sedimentconcentratie / waterconcentratie

$$K_{oc} = C_{s,oc}/C_{w,v} \quad (1)$$

K_{oc} = verdelingsconstante tussen organische koolstof en water (l/kg oc)

$C_{s,oc}$ = concentratie in sediment op organische koolstof basis ($\mu\text{g}/\text{kg oc}$)

$C_{w,v}$ = vrije waterconcentratie ($\mu\text{g}/\text{l}$)

Verdeling organismeconcentratie / waterconcentratie

Deze verdeling wordt voor organische stoffen uitgedrukt op basis van het vetgehalte in organismen (BCF_{vet}).

$$BCF_{vet} = C_{o,vet}/C_{w,v} \quad (2)$$

BCF = bioconcentratiefactor (verdelingsconstante tussen organisme en water (l/kg vet))

$C_{o,vet}$ = concentratie in het organisme op vetbasis ($\mu\text{g}/\text{kg vet}$)

Verdeling concentratie sediment / concentratie organisme

Uit bovenstaande vergelijkingen kan een relatie tussen de concentratie aan organische koolwaterstoffen in sediment en organismen afgeleid worden, de zgn. Biota Sediment Accumulatie Factor (BSAF):

$$BSAF = C_{o,vet}/C_{s,oc} \quad (3)$$

Theoretisch is de waarde van de BSAF gelijk aan 2. Door verschillen in BCF en K_{oc} waarden van stoffen kan deze waarde echter variëren van ca. 1 tot ca. 4. Lagere verhoudingen kunnen ontstaan door biotransformatie van stoffen door organismen (Bruggeman et al., 1985).

3.4.2 Bioaccumulatie zware metalen

De accumulatie van zware metalen in een organisme kan het beste weergegeven door de BSAF. Voor zware metalen wordt de BSAF uitgedrukt op basis van het droge stofgehalte van organismen ($BSAF_{ds}$).

$$BSAF_{ds} = C_{o,ds}/C_{s,ds} \quad (4)$$

$C_{o,ds}$ = concentratie in het organisme op droge-stofbasis ($\mu\text{g}/\text{kg ds}$)
 $C_{s,ds}$ = concentratie in sediment op basis van droege stof ($\mu\text{g}/\text{kg ds}$)

3.5 Interpretatie van bioaccumulatiegegevens.

3.5.1 Klasseïndeling sedimenten.

Bioconcentratiemetingen aan organismen kunnen gebruikt worden om een bepaalde verontreinigingsklasse aan het sediment toe te kennen. Er is een indeling gemaakt in drie klassen: -, \pm en +. Om tot een klassenindeling te komen, zijn voor de stoffen MTR-waarden afgeleid uitgedrukt in laboratorium voedsel. Deze waarden zijn geëxtrapoleerd naar verschillende voedseltypen via een correctie voor de energetische inhoud van het voedsel. Gemeten gehalten aan microverontreinigingen worden ingevoerd op basis van mg/kg nat gewicht.

De gemeten gehalten aan contaminanten in organismen worden vergeleken met de vastgestelde MTR. Een overschrijding van 1X de MTR geeft aan dat er doorvergiftiging plaats vindt (effect \pm), terwijl bij een overschrijding van 10x de MTR er gerekend mag worden op ernstige effecten (+).

Bijvoorbeeld:

contaminant	MTR (mg/kg vers voedsel)	gemeten gehalten oligochaeten (mg/kg nat gewicht)	overschrijding	klasse-indeling TRIADE
cadmium	0.006	7.4	> 10 x	+
kwik	0.055	0.096	1.7 x	\pm
PCB-153	0.277	0.070	< 1 x	-

Ook via de BSAF voor de organismen wordt een indeling gemaakt in klassen. Hiervoor geldt dat wanneer de BSAF factor van 2 overschreden wordt, de mate van beschikbaarheid van stoffen hoger is dan verwacht. De risico's worden daarmee groter. Een overschrijding van de BSAF van 2 met een factor ≥ 1 betekent een matig risico (\pm), een overschrijding < 1 betekent geen risico (-) en een overschrijding van de theoretische BSAF van 2 met een factor ≥ 5 betekent een ernstig risico (+).

bijvoorbeeld:

contaminant	gestand. gehalte (mg/kg ds)	gehalte oligochaeten (mg/kg ds)	BSAF	theorisch BSAF	overschrijding sfactor	klasse-indeling TRIADE
cadmium	21.9	34	1.55	0.04	38.7 x	+
zink	1607	400	0.28	0.8	< 1	-
contaminant	gestand. gehalte (mg/kg oc)	gehalte oligochaeten (mg/kg vet)	BSAF	theorisch BSAF	overschrijding sfactor	klasse-indeling TRIADE
fluoratheen	221.6	550	2.48	2	1.2	\pm
pcb153	1.043	8.5	8.15	2	4.1	\pm

De lijst met MTR-waarden die afgeleid zijn voor enkele stoffen:

verbinding	gehalte in chironomide/oligochaete MTR
Cadmium	0,006
Kwik	0,013
PCB 153	0,277
HCB	0,069
Aldrin	0,0007
Dieldrin	0,04
Endrin	1,1
β -HCH	8,7
γ -HCH	0,022
Endosulfan	0,018
Heptachloor	0,125
Hepo	0,0003
Pentachloorphenol	3,5
4,4-DDE	0,021
4,4-DDD	0,015
2,4-DDT	0,7
4,4-DDT	0,029

4 Veldinventarisaties

4.1 Inleiding.

Op geschikte plaatsen in het veld wordt de bodemfauna bemonsterd. Na determinatie van de macrofauna wordt het aantal chironomiden per oppervlakte-eenheid bepaald en vergeleken met een referentie(waarde). De dichtheid is een maat voor de kwaliteit van de waterbodem en voor het voedselaanbod. Naast het bepalen van de dichtheid van chironomiden is het voorkomen van afwijkingen aan het mentum bij *Chironomus*larven een indicatie voor verontreiniging.

Omdat het voorkomen van macrofaunasoorten sterk samenhangt met de aanwezigheid van een geschikt substraat is het noodzakelijk dat tegelijkertijd enkele bodemkarakteristieken bepaald worden.

4.2 Bemonsteringslokaties.

Geschikte lokaties, waar *Chironomus*-larven voorkomen, zijn lokaties waar sedimentatie plaatsvindt of heeft plaatsgevonden. Deze sedimentbodems bevatten een fijnkorrelige structuur. In andere sedimenten, b.v. zanderige (> 60% deeltjes > 63 µm) of zoute (Cl⁻-gehalte > 400 mg/l) zullen andere soorten zich beter ontwikkelen en kunnen variaties in aantallen optreden. Criteria, welke van invloed kunnen zijn op het al of niet voorkomen van bepaalde soorten, worden besproken in hfst. 4.5.

4.3 Referentiegebied.

De beoordeling en klassificatie van de parameter dichtheid en kaakafwijkingen van chironomiden moet gebaseerd zijn op waarden, die voor een bepaald type bodem "normaal" zijn. Als referentiegebied wordt een relatief schone lokatie genomen, waarvan de bodemkarakteristieken (org. C, korrelgrootte en watergehalte) vergelijkbaar zijn met die van het monsterpunt.

Wanneer (historische) referentiewaarden voor een bepaald type bodem bekend zijn kan voor de beoordeling van een lokatie ook van deze waarde gebruikt gemaakt worden. Ervaring is opgedaan met relatief schone Rijnsedimenten, waarin normaalwaarden van > 1500 *Chironomus sp.*-larven per m² gemeten zijn (Van Urk en Kerkum, 1991).

Niet alle waterbodems, die bemonsterd worden, zullen slibrijk zijn. Ook bodems met andere karakteristieken (zandig, venig, zout) zullen beoordeeld worden. In een onderzoek naar de typologie voor waterbodems (Kerkum en van de Guchte, 1992; Aqua-Sense, 1993) is met name voor deze watersystemen een aanzet gegeven voor uitbreiding van kennis op het gebied van "referentiewaarden".

4.4 Monstername.

De bemonstering kan het beste plaatsvinden vanaf eind oktober tot begin april. In principe is het mogelijk de hele winter te bemonsteren, alleen als het vriest kan het zeven door een 500 µm zeef problemen geven. In de winter periode zullen voornamelijk larven van het grootste, 4de larvale stadium, aanwezig zijn, die het meest eenvoudig te verzamelen en te

determineren zijn. In het voorjaar en zomer (mei/juni en juli/augustus) zwermen de dieren uit.

Voor het bemonsteren van sediment wordt een Ekman-Birgehopper (bijlage 8) gebruikt, een rechte happer, waarmee per "hap" een oppervlak van 15 x 15 cm (= 0,225 m²) en ca. 15 cm diepte bemonsterd wordt. Uit onderzoek van Van Urk en Kerkum (1991) is aangetoond dat chironomiden tot 15 cm diepte voorkomen.

Voor stevige of zandige bodems wordt meestal een boxcorer gebruikt (bijlage 8).

In een te onderzoeken gebied worden tenminste **vijf lokaties** bemonsterd, bij voorkeur in een verontreinigingsgradiënt (zie fig.1; 2.4). Per lokatie worden random **5 monsters** (=steken) genomen. Deze monsters worden afzonderlijk verwerkt. Op de lokatie worden de monsters gezeefd over een 500 µm zeef. De organismen worden overgespoeld in een goed af te sluiten potje aangevuld met water van de lokatie.

Voor het meten van het vochtgehalte (4.6.2) in het sediment wordt uit twee steken een profiel gestoken met een buisje (opp. ± 25 cm² en lengte 10 cm), dat vervolgens met doppen aan beide kanten wordt afgesloten. De buisjes worden naar het lab getransporteerd voor verdere verwerking.

De potjes met makrofauna en de buisjes met bodemprofiel worden zo koel mogelijk (≤ 10 °C) naar het lab getransporteerd, waar ze bij 4 ± 2 °C en in donker opgeslagen worden. Na ontvangst moet de makrofauna direct ontdaan worden van sedimentdeeltjes, organisch materiaal, schelpen etc. De makrofauna (puur) wordt opgeslagen in 70%-ig ethanol en kan, indien goed afgesloten, onbeperkt bewaard worden. De bepaling van het vochtgehalte in het sediment moet zo snel mogelijk na bemonsteren uitgevoerd worden.

Opmerking: Wanneer de structuur van de bodem weinig slib bevat (stevige bodem) en het niet mogelijk is een bodemprofiel te steken, kan dit ook m.b.v. een Eykelkamp mudsampler of een Beekersampler (bijlage 8) uitgevoerd worden. De verwerking van de monsters is in alle gevallen hetzelfde.

Ten behoeve van het bepalen van het organisch koolstof, de korrelgrootte en chemische parameters wordt nog een extra hoeveelheid sediment (tenminste 1 liter) bemonsterd. Deze hoeveelheid wordt in een polycarbonaat emmertje van 2 liter naar het lab gebracht, waar het koel (5°C) bewaard moet worden. In tabel 6 (bijlage 3) staan de benodigde hoeveelheden sediment voor elke afzonderlijke analyse weergegeven. Voor de chemische analyses moet het sediment binnen een maand na monsternamen verwerkt worden.

4.5 Karakterisering van watersysteem en sediment.

Om de resultaten van de dichtheden van muggelarven te kunnen interpreteren is het noodzakelijk de waarden te vergelijken met voor het onderzochte gebied gevonden normaalwaarden (AquaSense, 1993). Voor de karakterisering van het sediment dienen de volgende parameters gemeten te worden:

Korrelgrootteverdeling:	d.m.v. indeling in percentage deeltjes < 63 µm is een classificatie te maken in slib/klei (≥ 40 %) en zand (≤ 40%). In zand-bodems komen afwijkende soortensamenstellingen voor (Van Urk en Kerkum, 1991; AquaSense, 1993).
Organisch C:	bodems met een gehalte ≥ 15% worden geklassificeerd als veen bodems. Venige bodems hebben vaak afwijkende soortensamenstellingen (AquaSense, 1993).
Vochtgehalte:	voor het berekenen van een empirische constante K_s . M.b.v. deze constante is het type bodem en de stabiliteit ervan af te leiden. In slappe bodems ($K_s < 1$) zullen chironomiden moeite hebben hun woonbuizen te bouwen.

De volgende gegevens kunnen eveneens van invloed zijn op de dichtheid van en het voorkomen van bepaalde soorten makrofauna.

Watertype:	eutroof of hypertroof (meten van zwevend stof, N, P en chlorofyllgehalte).
Stroomsnelheid:	stroomsnelheden; stromend, stagnant of semi-stagnant gebied/ ge-tijdegebied. Sedimentatie- of resuspensie (meting in m/s).
Dimensie:	diepte bemonsteringslokatie in meters.
Chloridegehalte:	in poriewater; in zoutere sedimenten zullen andere soorten (b.v. <i>Chironomus salinarius</i>) voorkomen, die kunnen variëren in aantallen (en kaakafwijkingen) t.o.v. de soorten uit zoete sedimenten met vergelijkbaar org. C en korrelgrootte (zie ook bijl. 1).
NH ₄ ⁺ /NH ₃ :	Hoge gehalten ammoniak in het poriewater kunnen afwezigheid van chironomiden in het sediment verklaren. In hoofdstuk 2 (Bioassays) is uitvoeriger ingegaan op deze randvoorwaarde (zie ook bijlage 1).

4.6 Meetmethoden.

4.6.1 Fysisch-chemische en chemische analyses aan sedimenten.

Voor het vaststellen van de verontreinigingsgraad van sedimenten worden gehalten aan organische en anorganische microverontreinigingen bepaald. Voor routinematige analyses wordt gebruik gemaakt van een standaardlijst te bepalen verbindingen en somparameters, welke is opgenomen in bijlage 5. Deze lijst sluit nauw aan bij de gewenste informatie ten behoeve van de normering waterbodems.

In specifieke gevallen, afhankelijk van lokale verontreinigingsbronnen of historische gegevens, kunnen aanvullend ook andere verbindingen geanalyseerd worden.

Voor een verdere chemische-analytische beoordeling en classificatie worden gemeten gehalten omgerekend naar die voor een gedefiniëerde standaardbodem en zijn karakteristieken als organisch koolstof gehalte en percentage lutum (< 2 µm) nodig.

Voor karakterisering van de bodem moet het organisch koolstof gehalte en het percentage deeltjes < 63 µm bepaald worden (4.5).

4.6.2 Bepalen van het vochtgehalte.

Het profiel uit de steekbuisjes wordt horizontaal in plakjes van 1 cm gesneden. Elk plakje wordt afzonderlijk gewogen en vervolgens gedroogd gedurende 16 uur bij 105EC. Uit de vermindering in gewicht voor en na drogen kan het vochtgehalte per cm bodem bepaald worden.

4.6.3 Dichtheid *Chironomidae*.

De *Chironomidae* uit de 5 subsamples (5 steken/lokatie) worden gedetermineerd en gescoord op het niveau van subfamilies volgens De Pauw en Vannemel (1991). Van de *Chironomini* worden de muggelarven gedetermineerd en gescoord tot op geslachtsniveau volgens de determinatietabellen van Moller-Pillot (1984) en Webb and Scholl (1985). Het soort *Chironomus spec.* wordt apart gehouden voor het bekijken van kaakafwijkingen. In bijlage 12 staat een overzicht van waar te nemen en te determineren muggelarven. Na determinatie worden de larven met water gespoeld en in een goed afgesloten potje bewaard in 96% ethanol.

4.6.4 Kaakafwijkingen chironomiden.

Tenminste 100 exemplaren van de *Chironomus sp.*-larven (totaal uit 5 steken) worden opgekookt in 40% KOH bij 80 °C gedurende ca. 10 minuten. Wanneer er < 100 chironomiden beschikbaar zijn, wordt de beoordeling wel uitgevoerd, maar gelden andere criteria (zie 4.7.4).

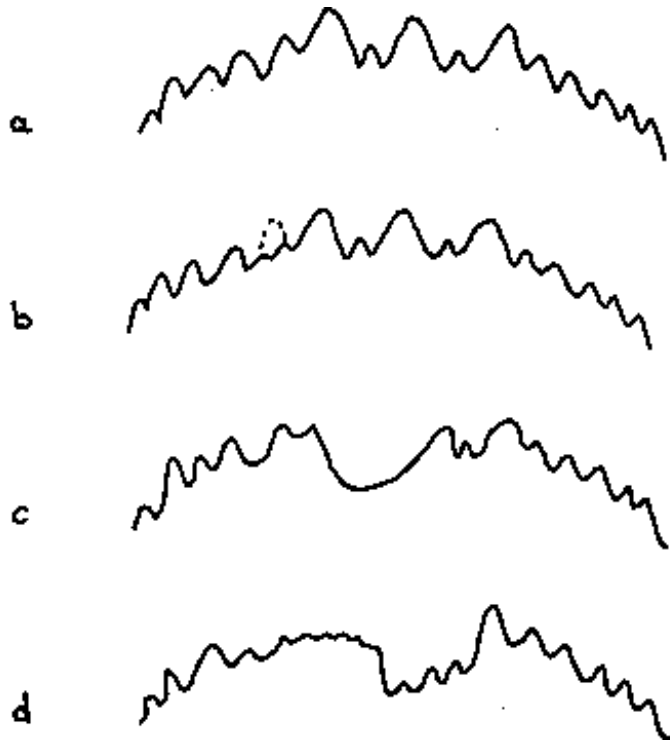
Na afkoelen en spoelen met leidingwater worden de larven met de dorsale zijde op een objectglaasje gelegd, zodat de ventrale zijde van het kopkapsel naar boven gekeerd is. Onder de microscoop wordt de vorm van het mentum bekeken. Het normale patroon van het mentum staat aangegeven in fig. 3. Het patroon van de onderzochte muggelarve wordt hiermee vergeleken.

Bij de waarnemingen wordt gescoord op slijtage, breuk en misvormingen. Aan de hand van figuur 3 worden de definities voor deze waarnemingen duidelijk gemaakt:

- Slijtage: Een onregelmatigheid in het normale patroon (fig. 3a), waarbij de rand van het mentum ligt tussen het denkbeeldige normale patroon en de basislijn van de tanden. Slijtage is alleen aanwezig als meerdere tanden op dezelfde wijze afwijken van het denkbeeldige patroon. Het grensvlak is niet scherp.
- Breuk: Een onregelmatigheid in het normale patroon (fig 3a), waarbij de rand van het mentum ligt tussen het denkbeeldige normale patroon en de basislijn van de tanden en waarbij het grensvlak scherp is.
- Misvormingen: Een reductie van de middentand of van één van de zijtanden tot beneden het niveau van de andere zijtanden (fig. 3b). Een gat in het mentum ("Koehn gap"), dat zich uitstrekt beneden de basislijn van de tanden (fig 3c) of een onregelmatigheid niet passend binnen het denk

beeldige normale patroon (fig. 3d) wordt als misvorming beschouwd.

Alle afwijkingen van het normale patroon - misvorming, breuk of slijtage - worden als zodanig genoteerd (Van Urk en Kerkum, 1991). Na beoordeling van de kaakafwijkingen worden de larven met water gespoeld en in een goed afgesloten potje bewaard in 96%-ig ethanol. De monsters worden koel bewaard in donker.



Figuur 3: Schematische weergave van een normaal (a), een mentum met een gereduceerde zijtand (b), een mentum met een 'Koehn gat' (c) en een onregelmatig gevormd mentum (d).

4.7 Verwerking gegevens en statistische toetsing.

4.7.1 Chemische analyses.

De chemische analysegegevens van de sedimenten worden ingevoerd in het PC-programma TOWABO, waarmee de gemeten gehalten omgerekend worden naar die voor een gedefiniëerde standaardbodem. M.b.v. deze waarden kan het programma een klassificatie van het sediment aangeven volgens de normering vierde nota Waterhuishouding (Ministerie van Verkeer en Waterstaat, 1998).

4.7.2 Bepalen van de constante K_s .

Voor de berekening van K_s wordt de volgende formule gebruikt:

$$W_{(x)} = W_{(0-1)} + K_s \cdot \ln(2x)$$

waarin $W_{(x)}$ het vochtgehalte (4.6.2) op diepte x is, $W_{(0-1)}$ is het vochtgehalte in de toplaag van 1 cm (4.6.2), en K_s is de empirische constante (Håkanson and Jansson, 1983). Door alle gegevens van de duplomonsters in te voeren kan m.b.v. lineaire regressie de constante K_s en de correlatiecoëfficiënt (r^2) bepaald worden.

De correlatiecoëfficiënt geeft het verband aan tussen het watergehalte en de diepte. M.b.v. de Student's t-toets wordt bepaald of de relatie significant is. Is de correlatie niet significant ($P < 0,1$), dan is de bodem niet gelijkmatig van samenstelling en vaak minder geschikt als substraat voor de muggelarven. De te gebruiken formule voor het bepalen van de significantie is:

$$t = r \cdot \sqrt{(n-2) / \sqrt{1 - r^2}} \quad (n = \text{aantal monsters})$$

Wanneer t kleiner is dan de tabelwaarde in de Student's t-tabel ($P < 0,1$), dan is de correlatie niet significant.

4.7.3 Dichtheid *Chironomidae*.

Uit de aantallen waargenomen muggelarven per subsample wordt per subfamilie en geslacht de gemiddelde dichtheid per m^2 met het 95% betrouwbaarheidsinterval bepaald. De spreiding in de aantallen larven is afhankelijk van de ruimtelijke variatie in bodemsamenstelling. Deze kan regelmatig, "random" of geclusterd zijn (Elliott, 1971). Als we uitgaan van een "random" verdeling, dan zijn de aantallen in afzonderlijke monsters Poisson verdeeld. De standaardafwijking van het gemiddelde van het aantal monsters (= 5 steken) wordt bepaald door $\sqrt{x/n}$ (waarbij $n=5$). De waarde voor $t = 2,78$ voor $(5-1) = 4$ vrijheidsgraden en een waarschijnlijkheid van 95%. Het betrouwbaarheidsinterval ligt tussen $x - t\sqrt{x/n}$ en $x + t\sqrt{x/n}$. Een uitvoerige discussie over de betrouwbaarheid van de dichtheidsmeting van chiro-nomiden wordt beschreven door Van Urk en Kerkum (1991).

4.7.4 Kaakafwijkingen chironomiden.

Uit het aantal beoordeelde *Chironomus*-larven (≥ 100) wordt het percentage misvormingen bepaald. Bij de misvormingen zijn **niet** de aantallen slijtage en geringe breuk inbegrepen (zie definities, 4.6.4). Is het aantal larven < 100 , dan moet de χ^2 -waarde (Sokal & Rohlf, Biometry, 1981) van het monster berekend worden t.o.v. een fictief monster van 100 larven en 9 % misvorming. Hieronder volgt een rekenvoorbeeld van een monster met < 100 *Chironomus*-larven:

V.b.: Stel er zijn 7 misvormde muggelarven gevonden op een totaal van 36, dan wordt het percentage en bijhorende χ^2 -waarde als volgt berekend:

Het percentage misvorming is 19,4%.

	Misvormd	Normaal	Totaal
lokatie	(a) 7	(b) 29	36
fictief	(c) 9	(d) 91	100
	-----	-----	-----
	16	120	136 (n)

De formule voor χ^2 is:

$$\chi^2 = \frac{n \{ad-bc - n/2\}^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} = 1.8665$$

Een uitvoerige discussie over het bepalen van het percentage kaakafwijkingen bij muggelarven wordt beschreven door Van Urk en Kerkum (1991).

4.8 Kwaliteitsbewaking.

Om in geval van bijzonderheden een controle te kunnen uitvoeren is het noodzakelijk alle gedetermineerde en behandelde monsters te bewaren.

Een controle op de kwaliteit van dit onderzoek wordt bewaakt door een enkel monster te laten onderzoeken door een derde instantie.

De opgestelde normaalwaarden voor een type bodem moeten regelmatig gecontroleerd worden op wijzigingen in de loop van de tijd.

4.9 Rapportage.

Chemische analyses.

Het standaardanalysepakket van het RWS (Visser et al., 1991) levert de volgende gegevens op:

- droge stofgehalte (%)
- korrelgrootteverdeling (% < 2, 10, 16, 50 en 63 μm)
- organisch koolstof (%)
- gehalten aan zware metalen (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb en Zn in mg/kg ds)
- gehalten aan PAK's, PCB's en OCB's (in μg of mg/kg ds)
- eventueel specifieke bepalingen afhankelijk van de lokatie.
- gehalten van bovenstaande parameters, omgerekend naar de standaardbodem
- klassebeoordeling volgens de vierde nota Waterhuishouding

Karakterisering van het watersysteem.

- korrelgrootteverdeling (% < 63 μm)
- organisch koolstof (%)
- vochtconstante K_s , met correlatie coëfficiënt en significantie
- stroomsnelheid (m/s)
- diepte waterbodem (m)
- $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -gehalte en Cl^- -gehalte in poriewater (mg/l)

Dichtheid *Chironomidae*.

- aantal *Chironomidae*-larven per monster
- (gedetermineerd op subfamilie en geslacht conform 4.6.3)

- gemiddeld aantal *Chironomidae*-larven per m² met 95% betrouwbaarheidsgebied
- (uitgesplitst in subfamilie en geslacht conform 4.6.3 en 4.7.3)

Kaakafwijkingen chironomiden.

- aantal beoordeelde *Chironomus*-larven
- aantal larven met slijtage, breuk, misvorming
- percentage misvorming
(en evt. Chi²-waarde in geval n < 100)

4.10 nterpretatie van de gegevens.

4.10.1 Geschiktheid substraat voor *Chironomus. sp.*

Uit de gemeten randvoorwaarden voor poriewater en sediment moet blijken of *Chironomus sp.* voor kan komen in het onderzochte gebied. Roback (1974) heeft voor een groot aantal insecten parameters in het veld gemeten, waarbij een soort in het veld gevonden is. Enkele van deze parameters worden behandeld in bijlage 1.

Uit korrelgrootteverdelingen en het vochtgehalte is af te leiden of de bodem veel slib of zand bevat. In het eindrapport van het project "Biologische typologie waterbodems" (AquaSense, 1993) worden hiervoor schema's gegeven (zie ook bijlage 13). Over het algemeen komt *Chironomus* niet of nauwelijks voor in zanderige bodems of bodems met een dun laagje slib.

De K_s-waarde is een maat voor de stabiliteit van de bodem. Bij een bepaalde K_s-waarde in relatie met de korrelgrootte en het vochtgehalte zullen *Chironomiden* zich slecht kunnen handhaven. De interpretatie van deze waarden wordt uitvoerig uitgelegd in het eindrapport van het project "Biologische typologie waterbodems" (AquaSense, 1993).

De K_s-waarde zal meestal negatief zijn. In sterke erosiegebieden komen positieve K_s-waarden voor, doordat de toplaag een lager watergehalte kan hebben dan de onder-liggende lagen. Hoe groter de verticale gradiënt, hoe groter de K_s-waarde.

Ook de correlatie-coëfficiënt (r) geeft een indruk van de lokatie. Een lage r-waarde, die niet significant is, geeft aan, dat op de lokatie een sterke mate van transport van het sediment aanwezig is. Factoren, waardoor het substraat minder geschikt is voor chironomiden.

4.10.2 Klasseïndeling sediment.

Voor de afzonderlijke gemeten parameters kan aan de hand van overschrijdingen van een klassegrens (criterium) een verontreinigingsklasse aangegeven worden. Er is een indeling gemaakt in drie klassen: -, ± en +. Deze klasseïndeling is als volgt weergegeven:

	klasse +	ernstig effect
criterium 2 -----		
	klasse ±	matig effect
criterium 1 -----		
	klasse -	weinig tot geen effect

5 Referenties

Adema, D.M.M. and G.J. Vink (1981). A comparative study of the toxicity of 1,1,2 trichloroethane, dieldrin, pentachloorphenol and 3,4, dichloroaniline for marine and freshwater organisms. *Chemosphere* 10: 533-554.

Alabaster, J.S. and R.R. Lloyd (1980). Water quality criteria for freshwater fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Butterworths, London, England, pp. 297.

Ankley, G.T., A. Katko and J.W. Arthur (1990). Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox river and Green Bay, Wisconsin. *Environm. Toxicol. and Chemistry*, 9, 313-322.

AOCE (1990). Programma voor het berekenen van een LC50-waarde. Handleiding PC-programma.

AquaSense (1992). Beoordeling van reinigingstechnieken voor verontreinigde waterbodems met bioassays. In opdracht van: Programmabureau Onderzoek Saneringsprocessen Waterbodems, RIZA, Rapport 92.0193.

Aquasense (1993). Biologische typologie Zoete Waterbodems. Normaalwaarden voor biologische parameters. In opdracht van: Rijksinstituut voor integraal zoetwaterbeheer en afvalwaterbehandeling, Dienst Getijdewateren en regionale directies van Rijkswaterstaat. Rapport nr. 92.0241.

Banerji, U., D. de Zwart and C. van de Guchte (1990). Manual for the determination of residues of chemical contaminant in biological sample. Report on Indo Dutch International Cooperation Programme on Environmental Protection, The Netherlands.

Den Besten, P.J. (1997). Biotisch effectonderzoek Hollandsch Diep en Dordtsche Biesbosch. RIZA rapport 97.098.

Boschker, E. (1989). Bioaccumulatie van PAK's in bentische organismen vanuit Ketelmeer sediment. DBW/RIZA werkdocument 89.056X.

Bruggeman W.A. (1985). De voorspelbaarheid van bioaccumulatie van sterk lipofiele stoffen in waterdieren. Themanummer Ecotoxicologie, Geneve, Vol 1. 554-557.

Chapman, P.M., M.A. Farrell and R.O. Brinkhurst (1982). Relative tolerance of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47-67.

Cowgill, U.M. and D.P. Milazzo (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.* 120, 2, 185.

Cowgill, U.M. and D.P. Milazzo (1991). Demographic effects of salinity, water hardness and carbonate alkalinity on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Hydrobiol.*, 122, 1, 33.

-
- De Pauw, N. en R. Vannevel (1991). Macroïnvertebraten en waterkwaliteit.
- De Wolf, W. (1988). Bioaccumulatie van microverontreinigingen uit Ketelmeersediment. DBW/RIZA Notitie 88.054X. 56p.
- De Zwart, D, and A.J. Folkerts (1990). Monitoring the toxicity of organic compounds dissolved in Rhine water. *Hydrobiol. Bull.* 24(1), 5-12.
- Di Toro, D.M., C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Schwartz, C.E. Cowan, S.P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas and P.R. Paquin (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Env. Tox. and Chem.*, Vol 10, 1541-1583.
- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Stat. Assoc.* 50, 1096.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparison with a control. *Biometrics* 20, 482.
- Duyvenbooden, W. van, en A.J.C.M. Mathijssen (1987). Basisdocument Nitraat - Effects (Appendix). RIVM report nr. 758473007.
- Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea. An ultrastructural approach to antennal damage
in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma* 154: 25-33.
- Elliot, J.M. (1971). Some methods for the statistical analyses of samples of benthic invertebrates. *Freshw. Biol. Assoc.*, Scientific Publication No 25, 144 pp.
- Elswijk, M. van, J.A. Hin, P.J. den Besten, L.M. van der Heijdt, M. van der Hout en C.A. Schmidt (2001). Richtlijn nader onderzoek van waterbodems. Ernst en urgentiebepaling vanverontreinigde waterbodems. AKWA rapport 01.005; RIZA nota 2001.052.
- Grootelaar, E.E.M. en J.L. Maas-Diepeveen (1988). Invloed van zout- en ammoniagehalte op *Daphnia magna* (watervlo) en *Chironomus riparius* (muggelarve). D.B.W./RIZA AOCE 88-04.
- Guchte, C. van de, and J.L. Maas-Diepeveen (1987). Screening sediments for toxicity: a water-concentration related problem. Paper presented at the 14th Annual Aquatic Toxicity Workshop, 1987, Toronto, Ontario, Canada.
- Guchte, C. van de, G. Niebeek and J. Botterweg (1988). Chironomids uptake of chlorobenzenes from contaminated sediments. *Proc. 2nd Int. TNO/BMFT Conference on Contaminated soil.*
- Guchte, C van de (1991). De TRIADE, een methode voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems. *Proc. Symp. N&M, 'Van vuil bagger tot schoon slib'*, Utrecht, dec. 1990.
- Guchte, C. van de (1992). The sediment quality TRIAD: An integrated approach to assess contaminated sediments. In: *River Water Quality,*

Ecological Assessment and Control. Eds. Newman, P.J., M.A. Piavaux and R.A. Sweeting. Brussel, Belgium. pp 417-423.

Gulley, D.D., Ann M. Boelter and H.L. Bergman (1988). Toxstat, release 2.1. Fish Physiology and Toxicology Laboratory Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Wyoming, USA.

Håkanson, L. and M. Jansson (1983). Principles of Lake Sedimentology.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston (1977). Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Envir. Sci. Technol.* 11(7): 714-719; Correction 12(4): 417 (1978).

Hattum, B. van, K.R. Timmermans en H.A. Govers (1991). Abiotic and biotic factors influencing in situ trace metal levels in macroinvertebrates in freshwater ecosystems. *Env. Tox. and Chem.*, Vol. 10, 275-292.

Heinis, F. (1993). Oxygen as a factor controlling occurrence and distribution of chironomid larvae. Thesis, Department of Fundamental and Applied Ecology, Univ. of Amsterdam, the Netherlands. pp. 155.

Hof, C.H.J. (1991). De invloed van korrelgrootte en organisch koolstof in sediment bioassays met *Chironomus riparius* (Diptera). RIZA AOCE 91-15.

Homer, D.H. and W.T. Waller (1983). Chronic effects of reduced dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Water air soil Pollut.* 20, 23-28. Uit: Nebeker et al. (1992).

ISO 6341 (1989). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.

Kerkum, F.C.M. en C. van de Guchte (1992). Biologische Typologie Waterbodems, projectplan. RWS, projekt VWA*TYPOSED, RIZA, Lelystad.

Klink, A.G. (1988). Hydrobiologisch onderzoek van de bodem van de Vecht in Noord-Holland. *Hydrobiol. Adviesburo Klink, Wageningen. Rapporten en mededelingen* 33, 21 pp en bijlagen.

Kooijman S.A.L.M. (1981). Parameter analyses of mortality rates in bioassays. *Water res.* 15, 107-119.

Kraak, M.H.S., M.C.Th. Scholten, W.H.M. Peeters and W.Chr. de Kock (1991). Biomonitoring of heavy metals in the western european rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreiscena polymorpha*. *Environmental Pollution*, 74, 101-114.

Lahr, J. (1988). De bioaccumulatie van chloorbenzenen in larven van *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) in een kunstmatig sediment/water systeem. RWS, Stageverslag DBW/RIZA, Lelystad.

Leeuwen, C.J. van, W.J. Luttmer and P.S. Griffioen (1985). The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*. I. A Cadmium example. *Ecot. and Environm. Saf.* 9, 26-39.

Leeuwen, C.J. van, G. Niebeek and M. Rijkeboer (1987). Effects of chemical stress on the population dynamics of *Daphnia magna*: a comparison of two test procedures. *Ecotoxicol. and environm. saf.* 14, 1-11.

Lohner, T.W. and S.W. Fisher (1990). Effects of pH and temperature on the acute toxicity and uptake of carbaryl in the midge, *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 16, 335-354.

Ministerie van Verkeer en Waterstaat (1998). Vierde nota waterhuishouding.

Moller-Pillot, H.K.M. (1978/1979). De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera) - 1A, en (1984) De larven der Nederlandse Chironomidae (Orthoclaadiinae) - 1B.

Mount, D.I. and T.J. Norberg (1984). A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environm. Toxicol. and Chemistry*, 3, 425-434.

Mulder, M.A.A.J., F.C.M. Kerkum en C. van de Guchte (1991). Drentsche Hoofdvaart: Beoordeling waterbodempkwaliteit met de Triade-benadering. RIZA, nota nr. 91.041.

Mulder, M.A.A.J. en A. Espeldoorn (1992). Beoordeling waterbodempkwaliteit Ketelmeergradiënt met de TRIADE-benadering. RIZA, werkdocument 92.133X, AOCE-rapport 92-17, Lelystad.

Mulder, M.A.A.J. (1993). Bioassays met sedimenten van enkele lokaties in regionale wateren in Noord-Holland. RIZA, werkdocument 93.023X, AOCE rapport 93-01, Lelystad.

Nebeker, A.V., S.T. Onjukka, D.G. Stevens, G.A. Chapman and S.E. Dominguez (1992). Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus*. *Environm. Toxicol. and Chem.* 11, 373-379.

NEN 6503 (1980). Water - benodigdheden, werkwijze en medium voor het kweken van *Daphnia magna* en van de hiervoor als voedsel benodigde algen. Nederlands Normalisatie instituut, Delft.

NVN 6516 (1993). Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Photobacterium phosphoreum*. Nederlands Normalisatie instituut, Delft (in voorbereiding).

OECD (1984). Acute immobilisation test and reproduction test. OECD guidelines for testing of chemicals no. 202, ISBN-92-64-1221-4. OECD, Paris. pp. 15.

OECD (1999). Prolonged toxicity study with *Daphnia magna*: effects on reproduction. OECD Guideline 211. OECD, Paris. pp.14.

Othoudt, R.A., J.P. Giesy, K.R. Grzyb, D.A. Verbrugge, R.A. Hoke, J.B. Drake and D. Anderson. (1991). Evaluation of the effects of storage time on the toxicity of sediments. *Chemosphere*, 22, 9-10, 801.

Postma, J.F., S. de Valk, M. Dubbeldam, J.L. Maas, M. Tonkes, C.A. Schipper and B.J. Kater (2002) Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. Accepted by Environm Chem. and Toxicology.

Roback, S.S. (1974). Insects (*Arthropoda: Insecta*). Uit: Pollution ecology of freshwater invertebrates. Hart, C.W., Jr. and S.L.H. Fuller (Eds). Academic Press, New York and London.

Salanki, J., Katalin V.-Balogh and Erzsébet Berta (1982). Heavy metals in animals of lake Balaton. Water Res. 16, 1147-1152.

Slooff, W. and D. de Zwart (1991). The pT-value as environmental policy indicator for the exposure to toxic substances. RIVM report 719102003, Bilthoven.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf (1981). Biometry. W.H. Freeman & Company, New York. Second Edition.

Scholten, M.C.Th., R.G. Jak, K.J.M. Kramer, W.Chr. de Kock en H.P.M. Schobben (1991). Verschillen in bioaccumulatie van metalen in zoet- en zoutwatermosselen. In opdracht van RWS/DGW-AOC. TNO rapport R 91/332, Delft.

Stortelder, P.B.M., M.A. van der Gaag en L.A. van der Kooij (1989). Kansen voor Waterorganismen. Een ecotoxicologische onderbouwing voor kwaliteitsdoelstellingen voor water en waterbodemp. DBW/RIZA Nota nr. 89.016.

Tijink J. (1990). Bioaccumulatie van PAK's vanuit kunstmatig verontreinigd sediment. DBW/RIZA Lelystad, LU, Wageningen. AOCE 90-11, 54p.

Timmermans, K.R. (1991). Trace metal ecotoxicokinetics of chironomids; academisch proefschrift, Universiteit van Amsterdam, 185p.

Urk, G. van, en F.C.M. Kerkum (1986). Misvormingen bij muggelarven uit Nederlandse oppervlaktewateren. H₂O 19: 624-627.

Urk, G. van, en F.C.M. Kerkum (1991). Biologische beoordeling van sedimentkwaliteit met Chironomus (diptera: chironomidae). RIZA nota 91.017.

Valk, F. van der, Q.T. Dao and J. Speur (1989). Contaminant contents of freshwater mussels (*Dreiscena polymorpha*) incubated at various locations in the river Rhine from Switzerland to the Netherlands. Under commission of RWS/DBW/RIZA. RIVO report MO 89-206, IJmuiden.

Visser, W., W. Verlinden en E. Landman (1991). Kwaliteitsonderzoek in de Rijkswateren; planning 1992. Nota RIZA/DGW nr. 91.084.

Warwick, W.F. (1988). Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress. Toxic contaminants and ecosystem health; a great lake focus. Edt. Marlene S. Evans, John Wiley & Sons, inc.

Webb, C.J. and A. Scholl (1985). Identification of larvae of European species of Chironomus Meigen (Diptera: Chironomidae) by morphological characters. Systematic Entomology 10, 353.

Wedemeyer, W.A., and W.T. Yasutake (1978). Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can. 35, 822.

Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

Williams, K.A., D.W.J. Green and D. Pascoe (1986). Studies of the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates. Arch. Hydrobiol. 106, 61-70.

BIJLAGEN

BIJLAGE 1: Randvoorwaarden voor toxiciteitstesten.

Inleiding.

De in de bioassays gebruikte organismen worden in het laboratorium onder gestandaardiseerde condities, wat betreft pH, O₂, NH₄⁺/NH₃, NO₂ en saliniteit cq. geleidbaarheid, getest. In veldmonsters kunnen echter situaties ontstaan, waarbij lage pH en O₂-gehaltes optreden. Van de overige parameters, met name NH₄⁺-gehaltes, kunnen eveneens hoge gehalten voorkomen of ontstaan. De gehalten van de parameters kunnen soms zo extreem zijn, dat hiervan alleen al effecten of zelfs sterfte te verwachten is. Getracht is d.m.v. literatuurgegevens en eigen onderzoek voor enkele parameters een waarde vast te stellen, waarbij geen **acute** effecten zijn waargenomen, of waarbij in het veld nog organismen zijn gevonden.

De waarden, die als randvoorwaarden in het overzicht opgenomen zijn, sluiten echter niet uit, dat stoffen in hun toxische werking beïnvloed worden (maskeren) of dat interferentie (synergisme of antagonisme) optreedt. Het is bijvoorbeeld ook bekend, dat chloride-ionen invloed hebben op de toxiciteit van ammonium (Alabaster and Lloyd, 1980).

In de literatuur worden verschillende mogelijkheden aangegeven om extreme waarden bij te stellen. Al deze technieken hebben echter wel de consequentie, dat het effect van de toxische verbinding ook kan verdwijnen of veranderen. In geval een parameter bijgesteld wordt, dient altijd het onbehandelde en het bijgestelde monster getest te worden.

In sommige sediment-watersystemen, waarin in het bovenstaande water extreme randvoorwaarden voorkomen, zullen verwijderingstechnieken of behandelings-methoden misschien geen effect hebben, doordat er door het sediment een constante nalevering plaatsvindt. In dat geval is het aan te raden het bovenstaande water te scheiden van het sediment, waarna toxiciteitstesten kunnen worden uitgevoerd.

In de afgelopen 10 jaren zijn diverse testen uitgevoerd om de randvoorwaarden beter te definiëren. Een verslag van deze studies wordt gegeven door Postma et al (2002). Inonderstaande tabel zijn de waarden weergegeven voor de acute en chronische testen. Een verbeterde versie zal worden gegeven in de update van de TRIADE.

Tabel 1.1: Voorstel voor randvoorwaarden voor pH, O₂-, hardheid, NO₂⁻, NH₄⁺/NH₃- en zoutgehalte, waaraan een poriewater of bovenstaand water moet voldoen om geschikt te zijn als testmedium voor de organismen *D. magna*, *C. riparius* en *P. phosphoreum* en oligochaeten.

organisme	tenminste geen acuut effect te verwachten bij een conc. van							
	pH	O ₂ %		NO ₂ ⁻ (mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)		Cl ⁻ (g/l)	geleid.*** (mS/mm)
<i>D. magna</i> (chron)	6,5-9	> 30		<10	<30		<0,8	<185
<i>C. riparius</i> (ac)	6,8-8,5	> 35		<50	<60		4,1 1,25**	<950 <300**
<i>P. phosphoreum</i> (ac)	6-8,5	>30		<70	<1000		n.v.t.	n.v.t.
Oligochaeten	5-9	0-		n.b.	110		<20	<4600

n.b. = niet bekend;

* bij 20°C en pH 8.

** voor eipakketten en jonge larven van *C. riparius*.

*** op basis van zeewater.

Toelichting.

Tabel 1.2: Percentage ongedissocieerd ammoniak (NH₃) t.o.v. totaal ammonia (NH₃+NH₄) bij een bepaalde temperatuur en pH.

Temperatuur (°C)	pH-waarde					
	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0*
5	0,04	0,12	0,40	1,25	3,8	10,9
10	0,06	0,19	0,58	1,78	5,6	15,6
15	0,09	0,27	0,86	2,66	8,1	20,8
20	0,12	0,40	1,25	3,79	11,4	28,5
25	0,18	0,57	1,78	5,43	15,6	36,2

BIJLAGE 2: Karakterisering referentiesedimenten.

Karakterisering van referentiesedimenten Oostvaardersplassen (OVP; sept. 1992); Schoonrewoerdse Wiel (SW; sept. 1992) en Markermeer (MM; sept. 1992).

De chemische gehalten zijn gecorrigeerd voor een standaardbodem vlg. de derde nota Waterhuishouding (Ministerie van Rijkswaterstaat, 1989).

Tabel 2.1: Fysisch-chemische parameters van referentiesedimenten.

Fysisch-chemische parameters	OVP	SW	MM
korrelgrootte: (%)			
< 63 (μm)	61,1	25,8	54,9
< 50 (μm)	56,3	22,5	50,6
< 16 (μm)	28,1	8,6	23,1
< 10 (μm)	20,1	5,5	15,7
< 2 (μm)	5,5	1,0	4,2
droge stof (%)	36	17	n.b.
org. koolstof* (%)	3,38	6,8	2,99
anorg. k. stof* (%)	1,42	4,5	2,44
N (kj-N)* (g/kg)	3,62	6,28	2,56
P (P_2O_5)* (g/kg)	0,97	1,64	6,70
Fe* (g/kg)	26,1	31,2	22,3
Mn* (mg/kg)	1772	1243	575

* op basis van droge stof gehalte.

Tabel 2.2: Chemische samenstelling referentiesedimenten

Chemische parameters	OVP	SW	MM
Metalen: (mg/kg)*			
As	26,0	10,6	24,1
Cd	1,34	1,60	2,06
Cr	52,7	29,6	51,8
Cu	23,5	34,1	24,2
Ni	30,3	36,3	32,8
Pb	62,4	69,6	52,4
Zn	249	233	279
Hg	0,45	0,25	0,47
olie (mg/kg)*	134	79,9	725
EOCI (mg/kg)*	0,1	n.b.	n.b.
PAK's: (mg/kg)*			
Fluorantheen	0,34	0,42	0,19
Benz(b)fluorantheen	0,34	0,42	< 0,19
Benzo(k)fluorantheen	< 0,17	0,17	0,19
Benzo(a)pyreen	0,17	0,17	0,19
Benzo(ghi)peryleen	0,17	0,25	0,19
Indeno(1,2,3-cd)pyreen	0,17	0,25	0,19
PCB's: (µg/kg)*			
PCB 28	< 1,7	< 0,85	1,94
PCB 52	< 1,7	< 0,85	< 1,94
PCB 101	1,7	< 0,85	3,88
PCB 118	1,7	< 0,85	1,94
PCB 138	1,7	< 0,85	5,82
PCB 153	1,7	< 0,85	5,82
PCB 180	1,7	< 0,85	1,94
OCB's: (µg/kg)*			
drins	< 3,4	< 1,7	< 3,9
DDT (incl. DDE en DDD)	< 5,2	37,3	< 5,8
HCB's	< 1,7	< 1,7	< 3,9
HCH's	< 1,7	< 0,85	< 1,9

* op basis van droge stof gehalte

Op basis van de chemische classificatie vlg. de toetsing van de vierde nota Waterhuishouding vallen de drie sedimenten in klasse 2. Voor alle drie referentiesedimenten is deze klasseindeling gebaseerd op overschrijding van de normen voor PAK's.

BIJLAGE 3: Benodigde hoeveelheden materiaal

Tabel 3.1: Benodigde hoeveelheden sediment en poriewater voor de testen met *D. magna* en *C. riparius*.

Organisme	Sediment-water testen		Poriewater testen	
	sediment (ml)	bov.st. water (ml)	poriew. ml/l	benod. sed (ml)*
<i>D. magna</i>	--	--	5000	15.000
<i>C. riparius</i>	50	200	--	--

* uitgaande van **slibrijk** sediment (redelijk nat, droge stofgehalte ca. 35%)

Tabel 3.2: Benodigde hoeveelheden sediment en poriewater voor het uitvoeren van chemische analyses.

Te meten parameter	Sediment (ml)	Poriewater (ml)	Totaal benod. sed. (ml)
Karakterisering	200	--	200
Randvoorwaarden	--	150	450
Metalen	100	1.000	3.100
PCB's/OCB's	100	1.000	3.100
PAK's	100	1.000	3.100
Nutriënten	--	150	450
DOC	--	100	300
Totaal (afgerond)	500	3.500	11.000

Voor het beoordelen van de verontreinigingsgraad van een slibrijke lokatie is er per punt tenminste **25 - 30 liter** sediment nodig. Wanneer een meer zandig sediment wordt onderzocht is in veel gevallen **50 liter** sediment nodig.

BIJLAGE 4: Samenstelling standaardmedia.

Dutch standard water (DSW; NEN 6503, 1980):

Tabel 4.1: Samenstelling stamoplossingen voor het bereiden van DSW.

Stamoplossing	I: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 g per liter
Stamoplossing	II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	90 g per liter
Stamoplossing	III: NaHCO_3 KHCO_3	50 g per liter 10 g per liter

Steriliseer stamoplossingen I en II gedurende 20 min. in autoclaaf bij 121 EC.

Steriliseer stamoplossingen III door filtratie over een membraamfilter van 0,2 μm .

Bereiding:

Voor de bereiding van het DSW wordt van iedere oplossing 2 ml toegevoegd aan 1 liter demiwater. Het DSW-water moet tenminste één uur goed belucht worden voor gebruik.

De evenwichts pH na beluchting is ca. 8,2. De hardheid bedraagt 210 mg/l als CaCO_3 . Het water kan in grote hoeveelheden worden gemaakt. Het behoudt gedurende ca. 1 maand dezelfde samenstelling mits het goed wordt belucht.

Elendt-medium (M4; Elendt, 1990):

Het medium wordt samengesteld uit 4 sets stockoplossingen: I t/m IV.

Deze sets bestaan uit:

- I. micro nutriënten (15 individuele oplossingen gecombineerd tot één stockoplossing)
- II. macro nutriënten (4 individuele oplossingen)
- III. buffers (4 individuele oplossingen)
- IV. vitamines (3 individuele vitamines gecombineerd tot één stockoplossing)

Bereid het medium met demiwater en gebruik zoveel mogelijk Anal[□]-grade reagentia.

De oplossingen worden bewaard bij 4 " 2 EC in donker. De vitamine-oplossing (IV) moet in kleine porties in de diepvries bewaard worden. Voeg de hoeveelheid vlak voor gebruik van het standaardwater toe.

Voeg van iedere stockoplossing de gewenste hoeveelheid (zie onderstaand schema) toe aan demiwater en vul aan tot 1 liter. Belucht het medium tenminste 1 uur voor gebruik. Na beluchting ligt de pH tussen 7,5 en 8,5. De hardheid bedraagt ca. 250 mg/l als CaCO_3 .

Het water kan in grote hoeveelheden worden gemaakt zonder toevoeging van vitamineoplossing. Het behoudt gedurende ca. 1 maand dezelfde samenstelling. Met vitamines-oplossing behoudt het medium gedurende 1 week zijn kwaliteit.

Tabel 4.1: Samenstelling stockoplossing Micronutriënten* (Set I).

Verbinding	Conc. in stamopl (mg/l)	Toevoegen aan stockopl. (ml/l)
B (H ₃ BO ₃)	57 190	1.0
Mn (MnCl ₂ .4H ₂ O)	7 210	1.0
Li (LiCl)	6 120	1.0
Rb (RbCl)	1 420	1.0
Sr (SrCl ₂ .6H ₂ O)	3 040	1.0
Br (NaBr)	320	1.0
Mo (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	1 260	1.0
Cu (CuCl ₂ .2H ₂ O)	335	1.0
Zn (ZnCl ₂)	260	1.0
Co (CoCl ₂ .6H ₂ O)	200	1.0
I (KI)	65	1.0
Se (Na ₂ SeO ₃)	43.8	1.0
V (NH ₄ VO ₃)	11.5	1.0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	bij elkaar voegen (tot. 2 liter) en autoclaveren (20 min, 121EC)
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	
Fe de gecombineerde Fe-oplossing		20

* Deze stockoplossing Micronutriënten (I) is 20-voudig geconcentreerd.

Tabel 4.3: Samenstelling stockoplossingen voor de bereiding van Elendt-medium M4.

Verbinding	Conc. in stockopl (mg/l)	Hoeveelheid toevoegen (ml stockopl/l)
Set I: Stockoplossing Micronutriënten	----	50
Set II: Macronutriënten		
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1.0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	0.5
KCl	58 000	0.1
NaHCO ₃	64 800	1.0
Set III: Buffers		
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	0.2
NaNO ₃	2 740	0.1
KH ₂ PO ₄	1 430	0.1
K ₂ HPO ₄	1 840	0.1
Set IV: Vitamine-oplossing		
Thiamine hydrochloride	750	bij elkaar gevoegd in 1 l
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	
Biotine	7.5	
gecombineerde vitamine-oplossing		

BIJLAGE 5: Tabel 5.1: Analysemethoden RIZA (stand van zaken 1992)

Bepaling	Methode	Fase
Korrelgrootte	Algan 201 (concept)	sediment
(an)org. C	Algan 200 (concept)	sediment
P en Kj-N	Algan 102	sediment
EOCI	OA-3B	sediment
olie	NEN 6675	sediment
NH ₄ /NH ₃		water
NO ₃ /NO ₂	Algan 100	water
Cl		water
o-PO ₄	NEN 6663	water
SO ₄	Algan 104	water
HCO ₃	NEN 6531	water
TOC	Algan 09	water
DOC	Algan 107	water
EOCI	NEN 6402	water
olie	NEN 6675	water
PAK's	B 352	sediment
PCB's	B 327	sediment
OCB's	B 332	sediment
PAK's	B 351	water
PCB's	B 326	water
OCB's	B 331	water
Fe	NEN 6460 (alle monsters	sediment
Mn	NEN 6461 zijn ontsloten	sediment
As	NEN 6432 vlg. NEN 6465,	sediment
Cd	NEN 6452 waarbij als	sediment
Cr	NEN 6448 verwarmings-	sediment
Cu	NEN 6451 bron een	sediment
Ni	NEN 6456 microwave-	sediment
Pb	NEN 6453 oven is	sediment
Hg	NEN 6439 gebruikt)	sediment
Zn	NEN 6443	sediment
As	NEN 6457	water
Cd	NEN 6458	water
Cr	NEN 6448	water
Cu	NEN 6454	water
Ni	NEN 6430	water
Pb	NEN 6429	water
Hg	NEN 6445	water
Zn	NEN 6443	water
Na	NEN 6442 (emissie spectr.)	water
K	NEN 6442 ..	water
Ca	NEN 6446 ..	water
Mg	NEN 6455 ..	water

Algan, OA en B-nummers zijn bij RIZA ontwikkelde methoden

BIJLAGE 6: Het bepalen van de r_m voor *Daphnia magna*.

Uit de waargenomen aantallen jongen per daphnia en de sterfte gedurende 21 dagen wordt een gemiddelde r_m berekend op de volgende manier:

Voorbeeld:

Van een lokatie is een verdunningsreeks van 100, 320 ml/l en onverdund poriewater ingezet met 10 daphnia's volgens de methodebeschrijving. Gedurende 21 dagen is de sterfte van de ouderdieren en het aantal geboren jonge daphnia's bijgehouden. In het onverdunde poriewater zijn de daphnia's na 8 dagen doodgegaan. In onderstaande tabel (6.1) staan de getallen voor de conc. 100 en 320 ml/l weergegeven.

Tabel 6.1: Het berekenen van de r_m voor daphnia's.

d.	100 ml/l										320 ml/l									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t/m																				
7																				
8	8	8	9	8	12	9	8	10	8	9	7	8	5	4	6	-	5	7	5	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	-	-	-	†	-	†	-	†
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	15	-	16	13	-	-	-	-	13	-	-	-	12	14	-	-	-	-	-	-
12	-	17	-	-	15	14	15	15	-	11	-	-	-	17	-	14	-	-	12	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	□	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-
15	16	19	21	15	-	19	18	19	18	19	-	-	20	-	22	-	21	-	17	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	18	17	15	13	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	18	16	18	-	16	-	-	6	-	-	-	3	-	5	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-
r_m	0.339		0.344		0.341		0.339		0.335		0.288 en 0.297				0.258		0.284		0.237	
	0.340 " 0.003										0.273 " 0.025									

Voor de concentratie van 100 ml/l zijn steeds de waarden voor twee opeenvolgende testvatjes bij elkaar genomen. In de concentratie van 320 ml/l zijn 1 en 3; en 2 en 4 samen genomen.

Voorbeeld 5+6 van conc. 100 ml/l:

$$\text{dag 8: } l_x = 1 \quad m_x = 10,5$$

$$\text{dag 12: } l_x = 1 \quad m_x = 14,5$$

$$\text{dag 15: } l_x = 0,5 \quad m_x = 19$$

$$\text{dag 19: } l_x = 0,5 \quad m_x = 18$$

BIJLAGE 7: Berekening van de significantie van verschillen in misvormingenpercentages bij Chironomus-larven. (Van Urk en Kerkum, 1991).

Als rekenvoorbeeld worden de volgende waardes gebruikt:

	Onderzocht	Misvormd	% misv.
Locatie	104	22	21
Referentie	100	1	1

Deze getallen kunnen paarsgewijs in een 2 x 2 tabel worden gerangschikt. Dit geeft de volgende tabel:

	Misvormd	Normaal	Totaal
Lokatie	(a) 10	(b) 94	104
Referentie	(c) 1	(d) 99	100
	-----	-----	-----
	11	193	204 (n)

De gebruikte methode om de significantie van de verschillen in een 2 x 2 tabel te berekenen is de Chi-kwadraat toets volgens de formule:

$$\text{Chi-kwadr.} = \frac{n \{(ad - bc) - n/2\}^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} = 5.82$$

In deze formule is Yates' continuïteitscorrectie verwerkt.

De significantiegrens van Chi-kwadraat is 3.84 (P = 0.05) met het aantal vrijheidsgraden van $\nu = 1$.

Het aantal misvormingen verschilt in dit geval van de referentielokatie.

Verklaring criteriumgrenzen volgens de Chi-kwadraat statistiek.

Omdat bij lage aantallen een klein aantal misvormde larven al een hoog percentage veroorzaakt, moeten in principe voor het vaststellen van een verantwoord misvormingspercentage minimaal 100 larven onderzocht worden. Op lokaties waar een sterk effect van verontreiniging is, is de dichtheid echter zo gering, dat dit aantal niet of slechts met zeer grote inspanning verzameld kan worden. Om toch een uitspraak te kunnen doen over de mate van verontreiniging (klasse - of klasse +) zijn als criteriumgrenzen significantiegrenzen gekozen. De mate van significant verschil tussen monsters wordt zoals in het bovenstaande rekenvoorbeeld berekend.

Bij voldoende larven (100 of meer) is het verschil tussen 10 en 20% misvorming gevoelsmatig al dermate groot, dat deze waarden zonder meer geaccepteerd worden als grenzen tussen de verschillende klassen. Het verschil tussen beide percentages is echter net niet significant op het 5% niveau ($\text{Chi}^2 = 3,176$ voor $P > 0,05$; $\text{Chi}^2 = 3,841$ voor $P = 0,05$). Het verschil tussen 9 en 20 % is echter wel significant ($\text{Chi}^2 = 4,033$ voor $P < 0,05$).

Bij kleine aantallen larven kan één misvormde larf meer of minder een groot verschil in percentage veroorzaken. Hierdoor is het noodzakelijk de grenzen strikter vast te stellen, waarbij een significant verschil tussen beide criteriumgrenzen een voorwaarde is. Monsters met een klein aantal larven worden daarom vergeleken met een fictief monster van 100 exemplaren met 9% misvorming.

De Chi^2 -waarde van een monster van 100 larven en 9% misvorming vergeleken met een monster van 100 larven en 0% misvorming bedraagt **7,446** en is de grens voor criterium 1.

De Chi^2 -waarde tussen monsters met 9 en 20% misvorming is 4,033. De grens voor criterium 2 is dan $7,446 + 4,033 = \mathbf{11,479}$.

BIJLAGE 8: Bemonsteringsapparatuur.

Er kunnen diverse technieken gevolgd worden bij het nemen van waterbodemmonsters. De juiste keuze van happer of steker is afhankelijk van het te bemonsteren materiaal. In onderstaande paragrafen staan enkele monstertechnieken uitgewerkt van bodemhappers en -stekers, welke gebruikt worden voor het bemonsteren van sediment t.b.v. chemische analyses, bioassays en het verzamelen van muggelarven.

Happersystemen.

Ekman-Birge happer.

De Ekman-Birge happer (figuur 8.1) bestaat uit een vierkante metalen bak van 15x15x21 cm, met boven en onder kleppen. De onderste kleppen worden op de bodem door middel van een veermechanisme gesloten. Dit sluitingsmechanisme wordt geactiveerd door een vallood. De bovenste kleppen gaan tijdens het zakken van de happer, als gevolg van de waterstroming door de bak, open staan. Bij het ophalen van de happer worden deze kleppen weer gesloten, waardoor de bovenste laag van het monster niet weg kan spoelen.

Van Veen-happer.

De Van Veenhapper (figuur 8.2) bestaat uit 2 min of meer segmentvormige, scharnierende bakken met draagarmen. Door middel van een vergrendelingsmechanisme worden deze bakken in geopende stand afgevoerd naar de bodem. Bij contact met de bodem ontkoppelt de vergrendeling. Door ophijzen worden de bakken tegen elkaar getrokken en wordt een oppervlakte sedimentmonster van de waterbodem verzameld. De bemonsteringsopening bedraagt ca. 250 cm². De happer is gefabriceerd van gegalvaniseerd of roestvrij staal.

Stekers.

De Vrij Witboor.

De Vrij Witboor (figuur 8.3) is een steekbuis in de vorm van een keg, uitgevoerd in roestvrij staal. De buis is op z'n smalst ca. 10 x 5 cm. De steekbuis kan aan één zijde geopend worden middels een schuif. De geopende Vrij Witboor wordt m.b.v. verlengstangen in de bodem gedrukt. Als de gewenste steekdiepte is bereikt, wordt met de schuif de boor gesloten. Na ophalen van de boor kan de schuif verwijderd worden, waarna het bodemmonster vrijkomt.

Met deze boor kan op een diepte van 1,5 tot max. 3 meter diepte bemonsterd worden. Wanneer de steekbuis geopend is, kunnen monsters genomen worden van verschillende gelaagdheid en diepte.

Boxcorer.

De naam boxcorer wordt gebruikt voor een groep van de stekers met een grote, ronde, vierkante of rechthoekige steekbuis. De belangrijkste

overeenkomst tussen de types zijn het hoge totaalgewicht en het feit, dat gestoken monsters praktisch ongeroerd zijn. De werking van de apparaten berust op het principe, dat de box door middel van een gewicht van de steekbuis houder in de bodem gestoken wordt. Tijdens het hijsen wordt de onder- en soms ook bovenzijde afgesloten.

De boxcorer (figuur 8.4) bestaat uit een steekbuis (box), waarvan de afmetingen kunnen variëren, maar ca. 20x30 cm bedragen. Een steekbuis houder, een frame, een ontgrendelingsmechanisme, een afsluitmechanisme en aanvullende gewichten. Door de zwaarte van het geheel is een hijswerktuig vereist. Ook dient er voldoende werkruimte op een schip aanwezig te zijn.

Beeker- of mudsampler.

De beeker- of mudsampler (figuur 8.5) bestaat uit een doorzichtige pvc-buis, van onderen voorzien van een snijkop. De buis wordt door middel van verlengstangen of in een frameconstructie in de bodem gedreven. Een zuiger in de steekbuis zorgt voor onderdruk in de steekbuis, zodat het monster gemakkelijk de kunststofbuis (monsterbuis) inschuift. Zodra de steekbuis op diepte (3-5 m.) is, wordt een rubberband in de snijkop opgeblazen, zodat de onderkant hermetisch afgesloten wordt. De monsterbuis kan worden afgesloten, waarmee de buis klaar is voor vervoer. Uit de buis kunnen submonsters genomen worden.

Bij chemisch/fysisch onderzoek wordt er ook gebruik gemaakt van roestvrij stalen buizen.

Tabel 8.1: Overzicht van soorten monsternemers en geschiktheid voor bodems.

	Happers		Stekers		
	Ekman-Birge	Van Veen	Vrij Witboor	Boxcorer	Beeker of Mudsampler
afmetingen (lxbxh in cm)	15x15x21	20x30x60	5x10 x150	20x20x30	Ø 6,3 x 100
gewicht (kg)	3,5	5	30	- 600	15-100
bemonsteringsopp. (cm ²)	225	250	50	400	31
diepte bodemmonst. (cm)	10-15	15 - ..	150	5-30	100
geschikt voor:					
harde bodem	-	+	-	+	-
zand	-	+	-	-	-
klei	-	-	±	+	+
veen	+	-	-	-	+
slib	+	+	+	+	+
zachte, slappe bodem	+	±	+	-	+
hijswerktuig nodig	-	±	+	+	+
ongestoord monster	±	+	+	+	+
diep te bemonsteren	-	-	-	+	-
geen last van stroming	+	-	-	+	±
subsampling mogelijk	±	-	-	+	-
gelaagdheid mogelijk	-	-	+	±	+
dieptelagen mogelijk			+	-	+

+ : ja, geschikt

- : nee, ongeschikt



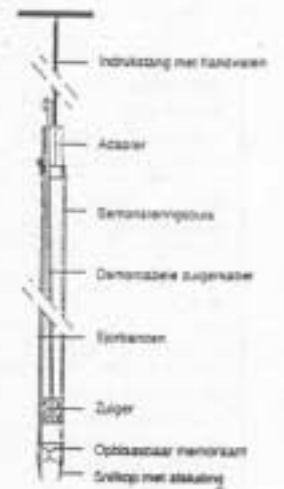
Figuur 8.1: Ekman-Birge happer



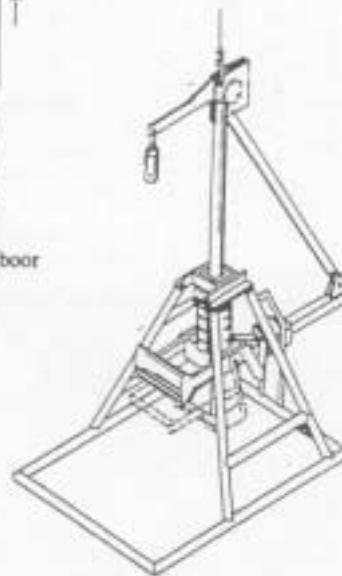
Figuur 8.2: Van Veen happer



Figuur 8.3: Vrij Witboor

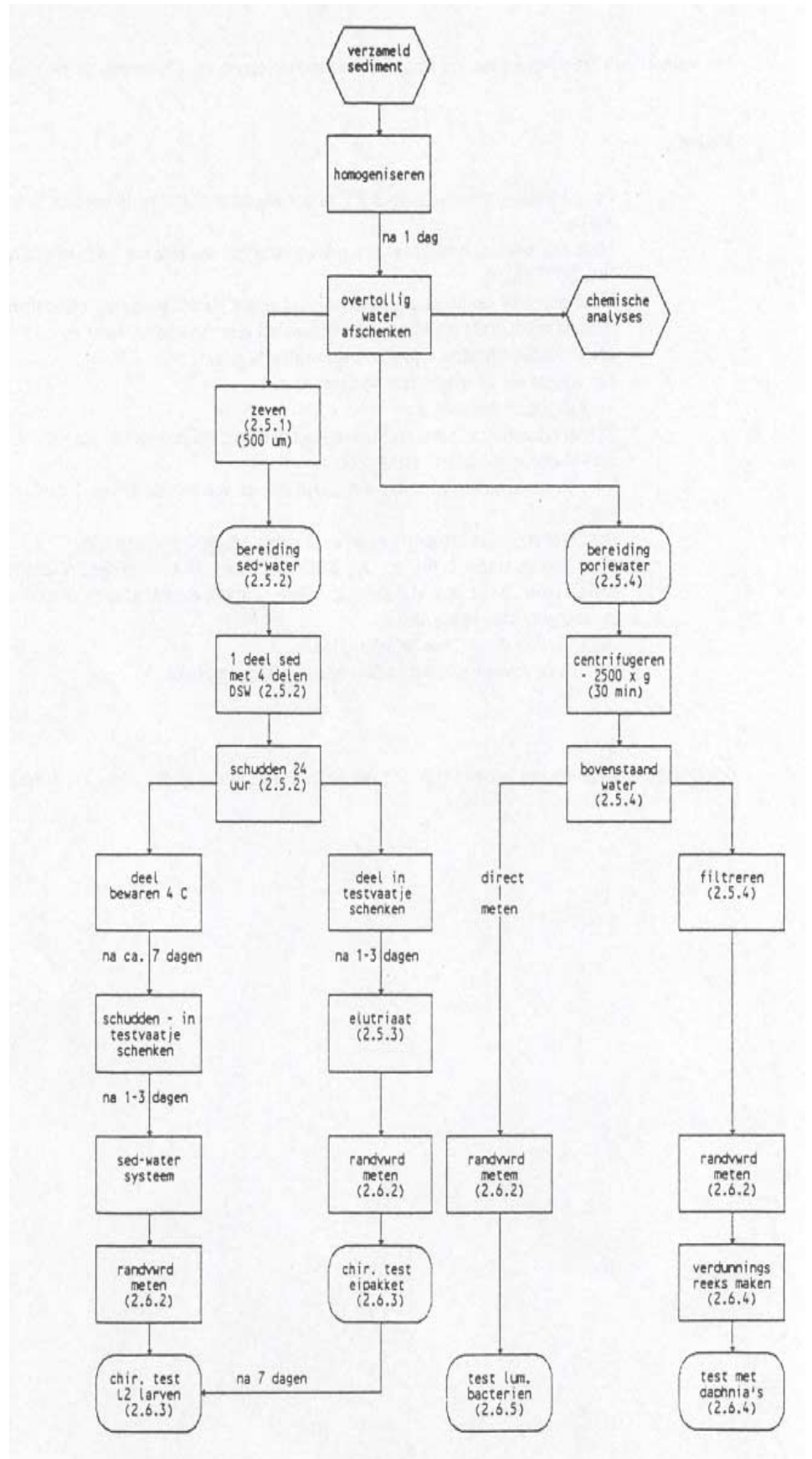


Figuur 8.5: Beeker- of mudsampler



Figuur 8.4: Boxcorer

BIJLAGE 9: Schema voor behandeling sediment.



BIJLAGE 10: Beschrijving van de kwaliteitstest voor chironomiden.

Een voorstel voor het uitvoeren van een acute toxiciteitstest met larven van *Chironomus sp.* (96 uur).

Methode:

- De test wordt uitgevoerd bij $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en een dag-nacht ritme van 16 uur licht en 8 uur donker.
- Maak een concentratiereeks van een referentiestof met een rede van 1,8 in standaardwater (b.v. DSW; bijl. 4).
- Maak een reeks van tenminste 5 concentraties en een blanco. Indien een oplosmiddel gebruikt wordt, dient een blanco met oplosmiddel getest te worden. Maak de oplosmiddelenconcentratie in alle testconcentraties gelijk.
- Het volume per testconcentratie bedraagt 50 ml.
- Voer de test in tweevoud uit.
- Zet per schaalje 25 *Chironomus*-larven van het tweede stadium uit van een gestandaardiseerde laboratoriumkweek.
- Voer de larven op $t=0$ en $t=48\text{u}$ met 200 μl van een vers bereide 2%-ige Trouvit-suspensie.
- Bestudeer en noteer het gedrag en de sterfte van de muggelarven dagelijks.
- Controleer en noteer de pH, het O_2 -gehalte van de controle en de hoogste concentratie op $t=0$ en $t=96\text{u}$. Meet deze waarden ook tussentijds in een concentratie, als er 100% sterfte in die concentratie opgetreden is.
- Pas gedurende de test geen beluchting toe.
- Bereken de concentratie, waarin 50% sterfte (effect) opgetreden is.

Opmerking: Deze test kan ook met andere larvale stadia van de chironomiden uitgevoerd worden.

BIJLAGE 11: Analysegegevens diverse visvoerders.

Tabel 11.1: Analysegegevens van visvoerders (geanalyseerd door TNO; persoonlijke mededeling, 1988).

	Gehaltes in mg/kg d.s.								
	Cr	Cd	Ni	Pb	Zn	Cu	As	Hg	HCH (Fg/kg)
Trouvit	2,4	0,27	2,2	0,37	120	7,1	0,60	0,094	27
Tetramin	2,9	0,17	2,1	0,53	50	8,3	0,58	0,104	4,5
Tetramix mengsel (Tetramin en Tetraphyll)									117
Aquariaan									2,3

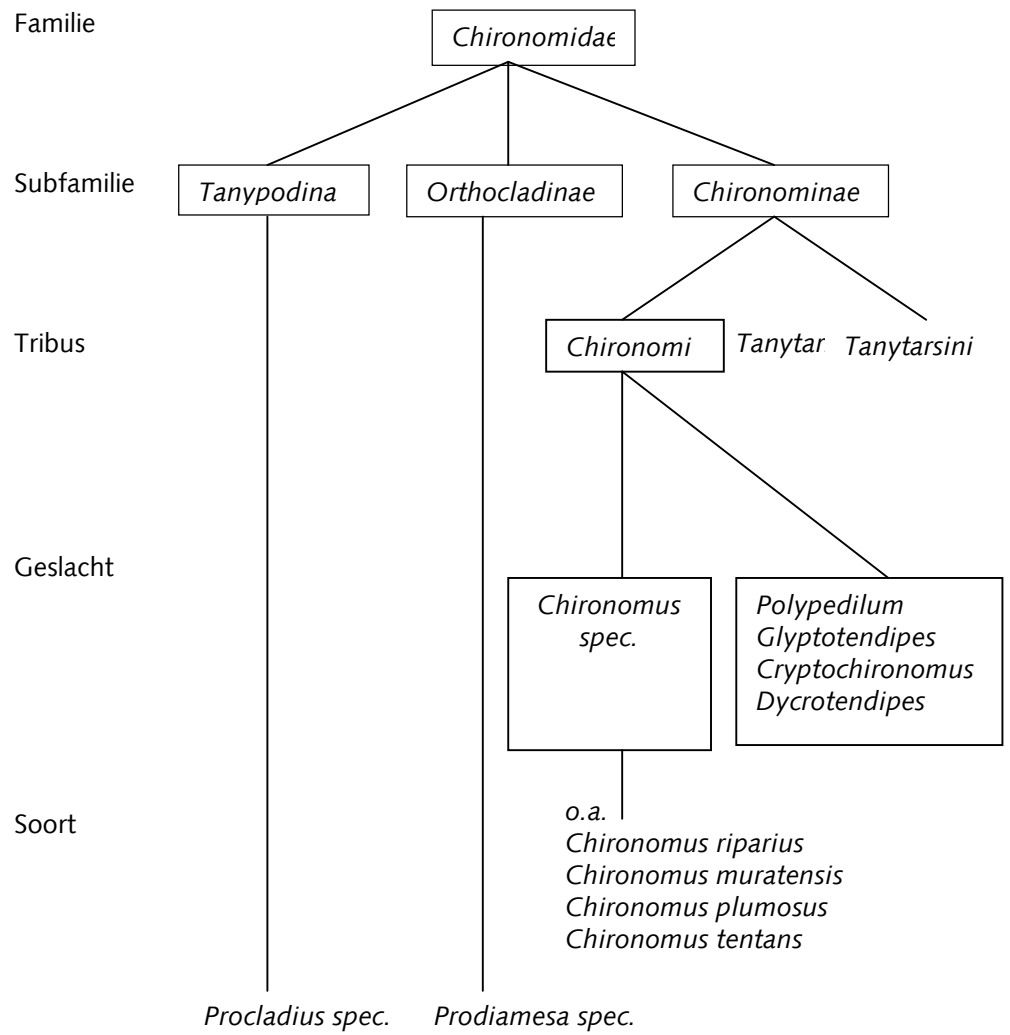
Samenstelling Trouvit (persoonlijke mededeling Trouw Nederland BV, 1988).

ruw eiwit	-	52 %
ruw vet	-	9 %
koolhydraten	-	17,5%
vitamine A	-	24.000 IE/kg
vitamine D ₃	-	2.400 IE/kg
vitamine E	-	80 mg/kg
vitamine C	-	1.000 mg/kg

Additieven Tetramin (persoonlijke mededeling RIVM, 1988).

E 101	Lactoflavine	-	6,7-dimethyl-9-(D-'-ribyl)-isoalloxazine of 7,8-dimethyl-10-(2,3,4,5-tetrahydroxy-pentyl)-isoalloxazine.
E 102	Tartrazine	-	Trinatriumzout van 4-(4'-sulfo-1'-fenylazo)-1-(4'-sulfofenyl)-5-hydrxypyrazolon-3-carbonzuur.
E 127	Erytrosine	-	Dikalium- of dinatriumzout van tetrajodofluoresceïne of hydroxy-tetrajodo-o-carboxy-furylfluoron.
E 141			Koperhoudende complexen van chlorofyllen en chlorofyllinen.
E 172			Ijzeroxyden en ijzeroxyhydraten

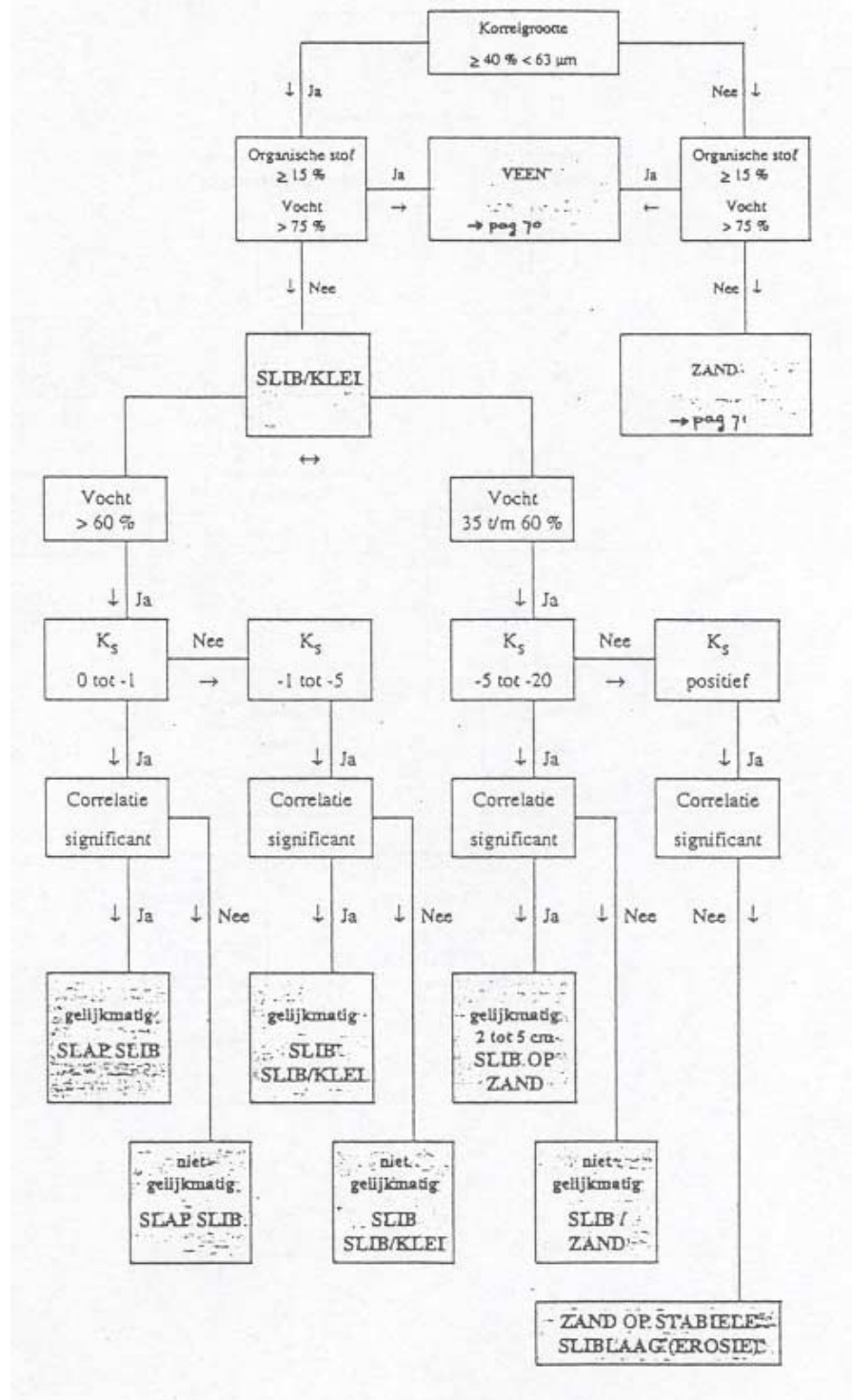
BIJLAGE 12: Overzicht Chironomus sp. inventarisatietabel.

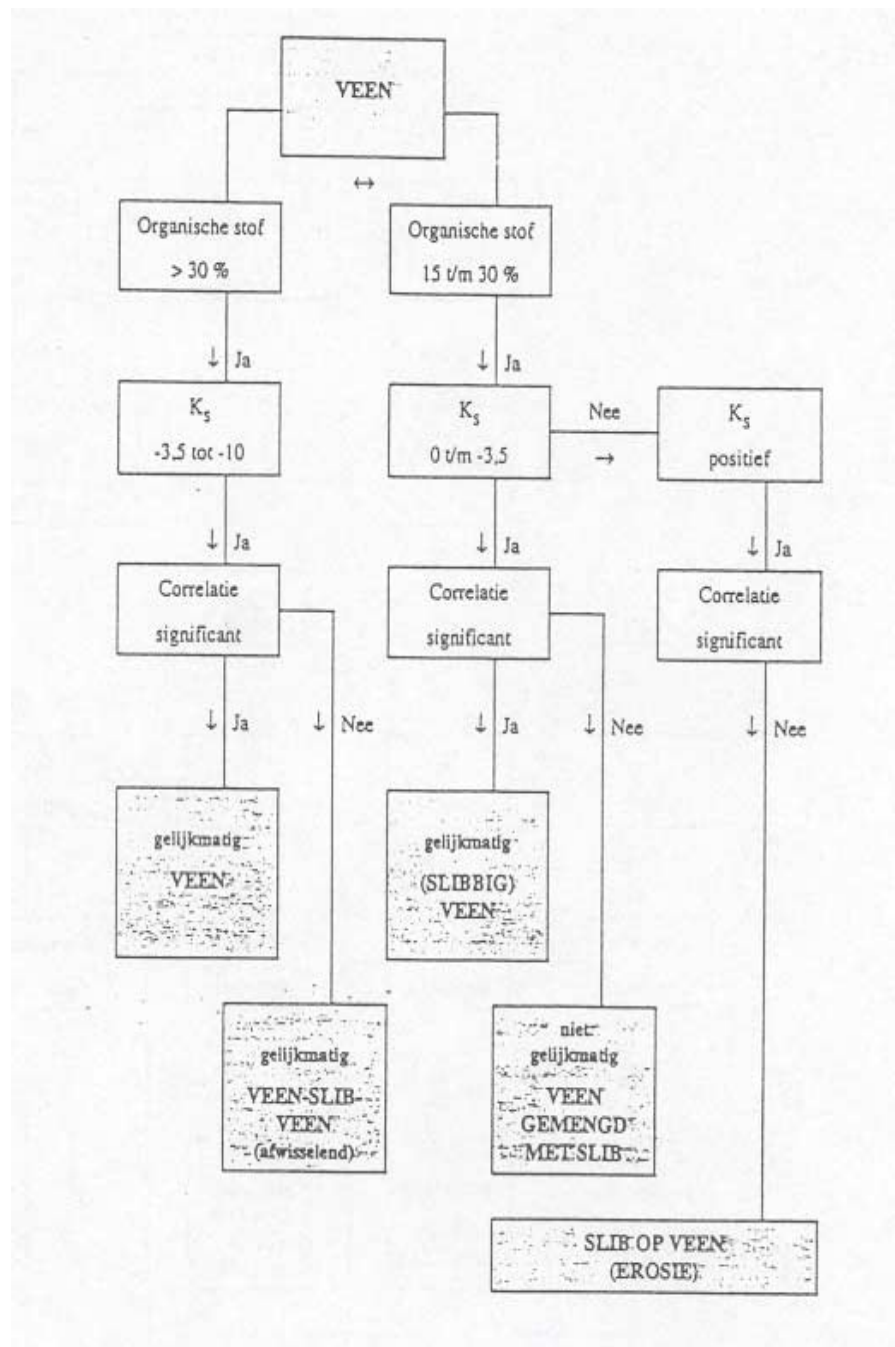


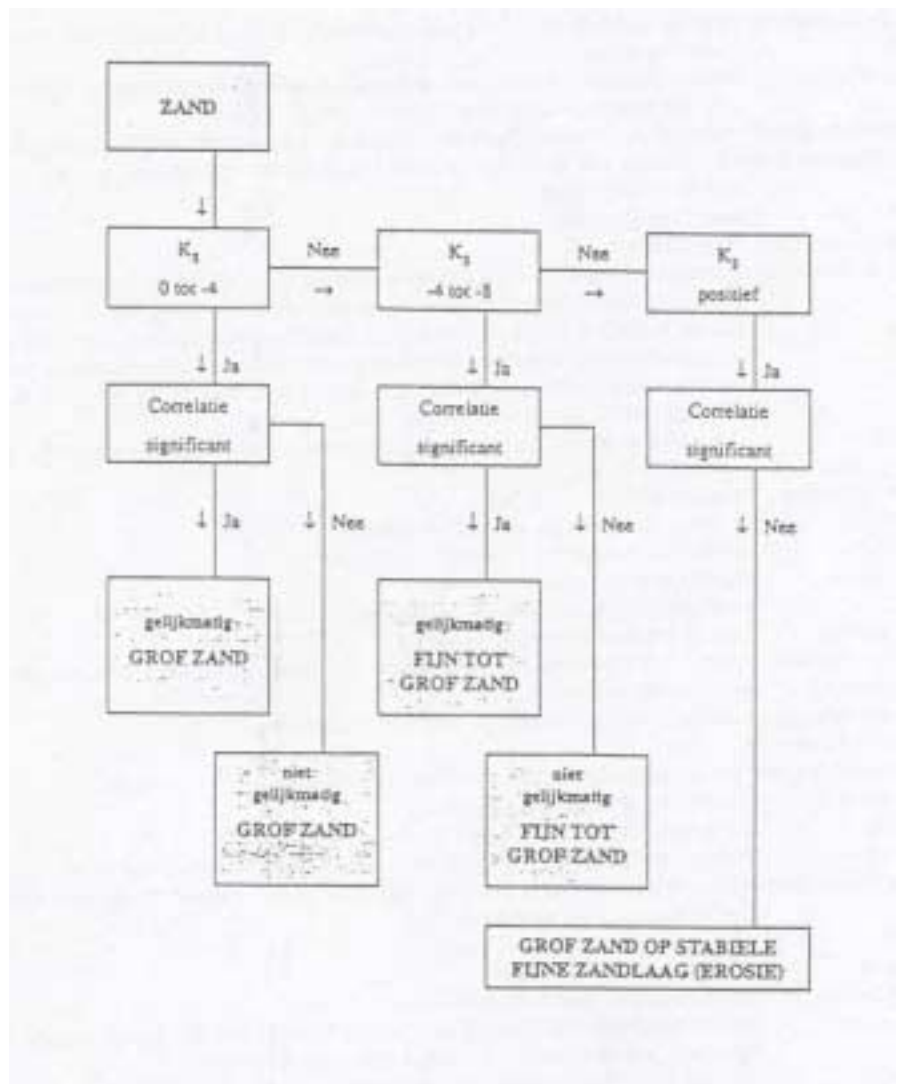
De omljnde namen moeten gedetermineerd worden. Alleen van de *Chironomus*-larven wordt het percentage misvorming bepaald.

BIJLAGE 13: Indeling slib/klei-, veen- en zandbodem.

(Biologische typologie zoete waterbodems (Aquasense, 1993).







BIJLAGE 14: Begrippenlijst.

Anaeroob:	Zuurstofloos.
BCF:	Bioconcentratiefactor
Binoculair:	Stereomicroscoop.
Bioaccumulatie:	opname van een stof, door een organisme, via huid, ademhalingsorganen of voedselopname.
Bioassays:	laboratoriumtest, waarin met biologisch materiaal (organisme) de (potentiële) toxiciteit van een stof (milieumonster) wordt bepaald.
Bioconcentratie:	opname van een stof door een organisme via huid of ademhalingsorganen.
Biologische beschikbaarheid:	een deel van chemische stoffen, dat opneembaar is door levende organismen.
Chlorella:	eencellige groenalg.
Chironomiden:	muggelarven.
Controlesediment:	sediment van een relatief schone lokatie, ter controle op de gebruikelijke procedurele uitvoering van de gekozen bioassay en voor de beoordeling van de normale ontwikkeling van de gebruikte testorganismen. Het controlesediment dient zoveel mogelijk de samenstelling en structuur te hebben als het sediment uit de normale habitat van de testorganismen. Effecten in een controlesediment dienen op het 'geen waarneembaar effectniveau' te liggen voor de gekozen parameter.
Criteria:	parameterwaarden, die vastgesteld zijn voor de overgang van verontreinigingsklassen.
Daphnia's:	watervlooien.
Dorsale zijde:	rugzijde van de muggelarf.
EC20:	concentratie, waarbij 20% effect optreedt.
EC50:	concentratie, waarbij 50% effect optreedt.
Elutriaat:	waterig extract van een sediment.
Eutroof:	voedselrijk (rijk aan stikstof en fosfaat).
Gradiënt:	toe- of afname in verontreiniging.
Grenswaarden:	normen t.a.v. gehalten in water en waterbodems, welke als basiskwaliteit geëist worden.
Hypertroof:	bovenmatig voedselrijk.
Klasseïndeling:	indeling in verontreinigingsgraad van sedimenten
Klassegrenzen:	zie criteria
Kaakafwijkingen:	misvormingen, die zich voordoen aan de tanden van de muggelarf.
Kuderna Danish-opstelling:	droogdamp installatie.
LC50:	concentratie, waarin 50% van de organismen dood gaat.
Lokatie:	punt in een gebied, waarvan de verontreinigingsklasse bepaald wordt.
Luminescerende bacteriën:	bacteriën, die in staat zijn, d.m.v. een biochemisch proces, zelf licht (luminescentie) uit te stralen.
Lutum:	sediment korrelgrootte < 2 Fm.
Mentum:	tandenrij van de muggelarf.
Monster:	hoeveelheid sediment, dat op een lokatie bemonsterd is. Op één lokatie, kunnen meerdere monsters genomen worden (binnen een beperkt gebied).
NOEC:	no observed effect concentration; concentratie, waarbij geen effect is waargenomen.

Normaalwaarden: zie referentiewaarden.

PAK's: polycyclische aromatische koolwaterstoffen.

PCB's: polychloorbifenylen.

BSAF: verhouding van concentratie organische microverontreiniging in organisme (op vetbasis) en sediment (op organische koolstofbasis).

Poriewater: Water, dat aanwezig is tussen sedimentdeeltjes (interstitieel water) en dat relatief eenvoudig d.m.v. centrifugatie of persen van de waterbodem gescheiden kan worden.

OCB's: organo chloorbestrijdingsmiddelen.

Oligochaeten: wormachtigen.

Random: willekeurig.

Randvoorwaarden: de diverse karakteristieken van sediment, poriewater, bovenstaand water en elutriaat bij ecotoxicologisch onderzoek aan sedimenten, welke van soort tot soort kunnen verschillen.

Referentiesediment: sediment van een meestal relatief schone lokatie, waarmee te beoordelen sedimenten worden vergeleken. Het referentiesediment moet bij voorkeur zoveel mogelijk dezelfde samenstelling en structuur hebben als het te beoordelen sediment, maar noodzakelijk is dat niet. Effecten in een referentiesediment hoeven niet noodzakelijk op het 'geen waarneembaar effectniveau' te liggen. Een referentiesediment, waarin geen effecten worden waargenomen kan als controle gebruikt worden bij de uitvoering van de betreffende bioassays.

Referentiewaarden: waarden voor parameters, bijv. dichtheden en kaakafwijkingen van chironomiden, die normaal zijn voor schoon sediment met vergelijkbare korrelgrootte en organisch koolstof.

Resuspensie: opwervelen van sedimentdeeltjes.

Reproductie: voortplanting.

Sediment: bodemmateriaal, dat zich onder het wateroppervlak bevindt; waterbodem.

Sedimentatie: bezinken van sedimentdeeltjes.

Sediment-watersysteem: een systeem voor het blootstellen van organismen, dat bereid is door mengen van sediment met water in een vaste volumeverhouding (1:4).

Signaleringswaarden: normen t.a.v. gehalten in water en waterbodems, waarbij een overschrijding aanleiding is tot Nader Onderzoek naar de saneringsnoodzaak.

Soxhlett-opstelling: extractie opstelling.

Standaardbodem: bodem, met een organisch koolstofpercentage van 5% en een lutum gehalte van 10%.

Standaardwater: kunstmatig bereid water.

Toxiciteit: giftigheid.

Ventrale zijde: buikzijde van de muggelarf.