



Het ontwikkelen van chronische *in vivo* bioassays voor brakke en mariene sedimenten

Jaap Postma#*, Anja Derksen*, Martine van den Heuvel-Greve#
& Dick Vethaak#

RIKZ Veldstation Jacobahaven

* AquaSense, Amsterdam

Rapport RIKZ/2003.002

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	3
Voorwoord	5
Samenvatting	7
1. Inleiding	9
2. Chronische bioassays voor brakke en mariene milieumonsters in Nederland	15
2.1. Afvalwater	15
2.2. Oppervlaktewater	15
2.3. Baggerspecie	16
2.4. Sedimenten	16
2.5. Verwachte biologische effecten	19
3. Chronische bioassays voor brakke en mariene sedimentmonsters in het buitenland	21
3.1. Reproductietesten	21
3.2. Larvale groeitesten	30
4. Bodemdieren in de Noordzee en kustzone	37
4.1 Macrofauna in de Noordzee en de kustzone	37
4.2 Detritivore fauna in brakke en mariene sedimenten	41
5. Selectiecriteria	47
5.1 Een testbatterij gericht op de effecten van stoffen in terrestrische systemen	47
5.2 Een testbatterij gericht op bioassays voor regionale wateren	48
6. De te ontwikkelen testbatterij voor brakke en mariene sedimenten	55
6.1 Inkadering	55
6.2 Selectiecriteria	56
6.3 Selectie van relevante taxa	57
6.4 Selectie van soorten	58
6.5 De te ontwikkelen testbatterij	67
Literatuur	71

Voorwoord

In opdracht van DG Water ontwikkelen RIZA en RIKZ in het kader van het WONS-programma 'Toxische stoffen' een geïntegreerd chemisch-biologisch beoordelingsinstrumentarium voor zoete en zoute watersystemen. Hiertoe wordt een nieuwe generatie waterkwaliteitsparameters (waaronder bioassays) in het waterkwaliteitsbeheer geïmplementeerd. Het chemisch-biologisch instrumentarium dient in 2006 geoperationaliseerd te worden.

Om een goede, gedetailleerde en, ook in de toekomst, bruikbare kwaliteitsbeoordeling van sedimenten uit te voeren is een aanvulling van de huidige set bioassays gewenst. Het accent zou hierbij moeten verschuiven van acute testen met pelagische organismen naar chronische testen met sedimentbewonende organismen. Hiervoor is een uitbreiding van het aantal chronische sediment bioassays voor de brakke en mariene gebieden noodzakelijk, om zo in staat te zijn de aanwezige taxonomische groepen (en hiermee het betreffende ecosysteem) voldoende bescherming te bieden. Deze testen staan nog veelal in hun kinderschoenen. In de nabije toekomst moet dan ook veel inzet gepleegd worden op de analytische, milieuchemische en ecologische validatie van de testen. Om deze inzet zo efficiënt mogelijk te laten plaatsvinden, geeft dit werkdocument een overzicht van bestaande *in vivo* bioassays op grond waarvan, aan de hand van selectiecriteria, een visie wordt gepresenteerd voor de ontwikkeling van een pragmatische testbatterij van chronische sediment testen voor brakke en mariene milieu's. Door hier onze effort op te richten, kunnen we voldoen aan de wens om het nieuwe beoordelingssysteem in 2006 operationeel te hebben.

De hier verwoorde visie is tot stand gekomen in nauwe samenwerking tussen het RIKZ en AquaSense. Op onderdelen is de hulp van specialisten gevraagd. Hun ideeën, suggesties en werkzaamheden hebben de totstandkoming van deze visie vereenvoudigd en inhoudelijk verbeterd. Stefan, Wouter, Johan, André. Bedankt!

Samenvatting

Als aanvulling op de huidige chemische beoordeling, wordt in de Vierde Nota Waterhuishouding het regeringsvoornemen voor een ruimere inzet van bioeffectmetingen aangekondigd. Gesteld wordt dat uiterlijk in 2006 deze nieuwe effectparameter opgenomen dient te zijn in de normering van de waterkwaliteit. In een recent opgesteld achtergronddocument over het omgaan met bioassays (Maas *et al.*, 2003) staat voor het sediment compartiment vermeld, dat "voor het vaststellen van het MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect) drie chronische bioassays beschikbaar dienen te zijn, waarvan tenminste twee 'whole-sediment' testen zijn. Daarnaast wordt in ditzelfde document geconstateerd, dat speciale aandacht zou moeten uitgaan naar het ontwikkelen van bioassays, die geschikt zijn voor toepassing bij brakke sedimenten. Waar het RIZA zich vooral richt op een set bioassays voor de zoete sedimenten, is het de taak van het RIKZ om een vergelijkbare set bioassays te ontwikkelen voor brakke en mariene sedimenten. De wens dat een dergelijke set in 2006 moet kunnen worden toegepast, legt een zekere druk op de tijdsplanning en maakt pragmatische keuzes tussen bijvoorbeeld geschikte testen wenselijk. Aan de andere kant gaat het er ook (en vooral) om dat men met de uiteindelijke set bioassays inderdaad recht doet aan de doelstelling dat de betreffende sedimentkwaliteit daarmee beter beoordeeld kan worden om zodoende een betere bescherming van het ecosysteem te kunnen waarborgen. Het huidige rapport geeft beide gedachtelijnen weer om zo te komen tot een geïntegreerd voorstel ten aanzien van de te ontwikkelen set bioassays. In verband met de tijdsplanning en de gewenste pragmatische keuzes wordt allereerst een overzicht gegeven van chronische 'whole-sediment' testen, die reeds in het buitenland worden toegepast op brakke en mariene sedimenten. Een keuze voor een van deze testen, maakt de implementatie waarschijnlijk eenvoudiger. Daaraan tegengesteld zijn andere aspecten als de mate waarin het gebruikte organisme representatief is voor de in Nederland aanwezige ecotopen. In dat kader heeft het werken met inheemse dieren bijvoorbeeld de voorkeur boven uitheemse organismen. In het huidige rapport wordt daarom een korte kenschets gegeven van de benthische macrofauna in een aantal typische brakke en mariene ecotopen in Nederland. Beide gedachtelijnen worden op basis van een aantal met name genoemde selectiecriteria uiteindelijk samengevoegd om zo te komen tot een voorstel aangaande de te ontwikkelen testen. Naast een set testen en/of testorganismen die de status 1^{ste} keus verdienen (die daarmee voor 2006 geïmplementeerd zouden moeten kunnen worden), worden tevens een aantal andere mogelijkheden aangedragen (zie tabel op volgende pagina). Bij het ontwikkelen van nieuwe bioassays dient namelijk altijd rekening gehouden te worden met de mogelijkheid dat een bepaald organisme uiteindelijk toch als 'niet toepasbaar' wordt beoordeeld.

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
--	-----------	-------------------	----------------------------

1^{ste} keus

(verdere ontwikkeling op korte termijn wenselijk; implementatie van tenminste 3 beoogd < 2006)

Wormen	<i>Arenicola marina</i>	<i>Nereis diversicolor</i>	<i>Arenicola marina</i>
Kreeftachtigen	<i>Corophium volutator</i>	<i>Corophium volutator</i>	<i>Corophium arenarium</i>
Weekdieren	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>
Stekelhuidigen	<i>Echinocardium cordatum</i>	-	<i>Echinocardium cordatum</i>
Overig			

2^{de} keus

(mogelijk geschikte organismen, indien in bovenstaand overzicht organismen / testen komen te vervallen)

Wormen	<i>Streblospio benedicti</i> <i>Capitella capitata</i>	<i>Streblospio benedicti</i> <i>Capitella capitata</i>	<i>Scoloplos armiger</i>
Kreeftachtigen			<i>Bathyporeia spec.</i>
Weekdieren	<i>Scrobicularia plana</i>	<i>Hydrobia ventrosa</i>	<i>Abra alba</i>
Stekelhuidigen	<i>Ophiura albida</i>		<i>Ophiura albida</i>
Overig	Een nematodensoort	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Een nematodensoort

1. Inleiding

De risico's en ernst van aanwezige verontreinigingen worden traditioneel vooral via chemische analyses in beeld gebracht. In steeds toenemende mate wordt echter ook van biologische testmethodieken gebruik gemaakt. Een van de belangrijkste en veel gebruikte biologische testmethodiek is de bioassay. Bioassays, ook wel bioeffectmetingen of toxiciteitstesten genoemd, zijn instrumenten waarmee nadelige biologische effecten van stoffen, mengsels of milieumonsters kunnen worden vastgesteld. Voor wat betreft de toepassing binnen milieumonsters hebben bioassays als twee grootste voordelen dat ze a) inzicht geven in de mate waarin de verontreinigingen beschikbaar zijn en b) kijken naar het gezamenlijke effect van alle aanwezige verontreinigingen. Of die elkaars werking nu versterken of juist afzwakken en of de stoffen chemische geanalyseerd zijn of nog onbekend doet hierbij niet ter zake (Slooff *et al.*, 2001). Mede hierom wordt in de Vierde Nota Waterhuishouding een regeringsvoornemen voor een ruimere inzet van bioeffectmetingen aangekondigd. Gesteld wordt dat uiterlijk in 2006 deze nieuwe effectparameter opgenomen dient te zijn in de normering van de waterkwaliteit.

Ook in de praktijk bij zowel het zoete en zoute milieu als ook in een terrestrische omgeving worden bioassays in toenemende mate ingezet om zo een beter inzicht te krijgen in de ecologische risico's van aanwezige verontreinigingen (De Zwart *et al.*, 1999; Van Elswijk, 2000; Rutgers *et al.*, 2001; Stronkhorst *et al.*, 2001). Een steeds groter aantal van dergelijke bioassays zijn goed gestandaardiseerd en gevalideerd en worden niet alleen in speciale onderzoeksprogramma's maar ook in routinematige beoordelingen ingezet. Zo vindt er binnen de EC momenteel een discussie plaats over het toekennen van een formele status voor de beoordeling van effluënten met bioassays (ENDS report, 2000). Ook in Nederland zijn implementatie trajecten gestart voor de toepassing van bioassays bij de beoordeling van de milieubezwaarlijkheid van effluënten en baggerspecie (NW4; De Graaf *et al.*, 2000a; Stronkhorst & de Jong, 1999; Stronkhorst *et al.*, 2001). Deze tendens naar het standaardiseren en valideren van bestaande bioassays zal de komende tijd doorgaan en zal leiden tot een voldoende grote set bioassays, die routinematig toepasbaar zijn en waarvan de resultaten goed geïnterpreteerd kunnen worden.

Naast deze tendens tot het verder standaardiseren en valideren van bestaande bioassays wordt er op meerdere fronten gewerkt aan het ontwikkelen van nieuwe biologische testmethodieken. Er zijn hiervoor meerdere redenen aan te geven:

1. De huidige set goed gestandaardiseerde bioassays richt zich vooral (maar niet uitsluitend) op effecten op de overleving. Om effecten op de populatiedynamiek in het veld goed te kunnen begrijpen is het wenselijk om ook inzicht in andere variabelen zoals groei en reproductie te krijgen.
2. Bestaande bioassays en parameters blijken niet altijd gevoelig genoeg te zijn om effecten van de aanwezige verontreinigingen aan te tonen. Er is dus behoefte aan gevoeliger methoden, zeker gezien de (gelukkig) dalende trend in de niveaus van veel verontreinigingen in bijv. de Rijn (Brongers *et al.*, 1998; Van Dessel, 1989).
3. Bestaande bioassays zijn gericht op het aantonen van effecten. In sommige gevallen is het nuttig om een signaal te krijgen voordat het

negatieve effect op overleving, groei en/of reproductie zichtbaar is. Meer biochemische methodieken bieden hiervoor goede mogelijkheden.

4. Bestaande bioassays geven vooral inzicht in de effecten van alle aanwezige verontreinigingen tezamen. Over het algemeen is dit een pluspunt. In tweede instantie wil men echter ook vaak weten, welke stoffen verantwoordelijk zijn voor deze effecten, omdat men op die manier beter de bronnen kan aanpakken. Hiervoor zijn meerdere mogelijkheden beschikbaar zoals TIE-onderzoek. Het ontwikkelen van testen met een zeer specifieke gevoeligheid voor bepaalde (groepen van) stoffen is echter een andere mogelijkheid.
5. Bestaande bioassays maken vaak gebruik van typische laboratorium soorten, die niet altijd even relevant zijn voor bepaalde veldsituaties. Op meerdere fronten wordt daarom gewerkt aan het ontwikkelen van testen met soorten, die voor de specifieke situatie relevant zijn.

Vooraf op grond van de eerste twee bovenstaande redenen wordt er gewerkt aan het ontwikkelen van 'chronische' *in vivo* bioassays (zie ook de recent uitgevoerde evaluatie van bestaande bioassays, AquaSense, 2002a). Zo ook bij het RIKZ, die zich daarbij richt op brakke en mariene organismen. Chronisch is hierbij tussen accolades gezet. In strikte zin wordt chronisch meestal uitgelegd als "testen waarbij het organisme gedurende een groot deel van zijn levenscyclus wordt blootgesteld". Voor een bacterie kan een test van een paar uur daarom chronisch zijn, voor een alg een test van een paar dagen, terwijl men voor een vis eerder aan een periode van maanden moet denken. Omdat dergelijke zeer langdurige testen niet erg praktisch en kosteneffectief zijn, wordt ook gewerkt aan testsystemen waarbij wordt ingezoomd op een bepaald onderdeel van de levenscyclus, dat naar verwachting een zeer gevoelig stadium is. Als voorbeelden gelden hiervoor de talrijk ontwikkelde fertilisatie en embryonale ontwikkelingstesten met bijvoorbeeld oesters en zee-egels (bijv. ASTM, 1991; Burgess *et al.*, 1993; Carr & Chapman, 1992; Dinnel *et al.*, 1982; US EPA, 1990). Deze zijn veelal gevoeliger dan klassieke acute testen kijkend naar sterfte, maar beslaan een kortere tijdspanne dan de meeste chronische bioassays. Om deze kortdurende testen te kunnen onderscheiden van de meer klassieke sterfte testen, worden ook deze wel eens als 'chronisch' of 'semi-chronisch' aangeduid. In het huidige werkdocument wordt de term chronische bioassay alleen gebruikt voor testen, waarin het organisme gedurende langere tijd aan een monster wordt blootgesteld en waarbij niet alleen op sterfte maar vooral op groei en/of reproductie wordt gelet. Daarnaast zijn er meerdere (soms zeer snelle) testen ontwikkeld waar primair op het gedrag van het dier wordt gelet. Voorbeelden hiervan zijn de klepbeweging van de mossel (zie bijv. www.mosselmonitor.nl), het ingraafgedrag van de zeeklit *Echinocardium cordatum* (Bowmer, 1993) of van bivalven als *Macoma*, *Mya* en *Cerastoderma* (Møhlenberg & Kiørboe, 1983; Phelps, 1989), het vermijdingsgedrag van de krab *Carcinus maenas* of de garnaal *Crangon crangon* (Møhlenberg & Kiørboe, 1983) dan wel de faeces productie van de worm *Arenicola marina* of de Witte Dunschaal *Abra alba* (Strömberg *et al.*, 1993; Thain & Bifield, 1993). Alhoewel deze parameters zeker relevant zijn voor de populatiedynamica van de betreffende organismen (bijv. in relatie tot het verkrijgen van voedsel, dan wel de kans op het ten prooi vallen aan predatoren) is besloten om ook deze testen in principe buiten de huidige visieontwikkeling te houden.

De twee daaronder genoemde ontwikkelingen (punten 3 en 4) maken het wenselijk om naast een set *in vivo* bioassays ook te beschikken over

een set goed gevalideerde *in vitro* bioassays. Legierse (2001) geeft een overzicht van de mogelijkheden en beperkingen van *in vitro* bioassays en op de rol en keuze van *in vitro* bioassays als onderdeel van een ecologische risicobeoordeling van milieumonsters. Dit aspect zal daarom hier niet verder worden besproken. Het huidige werkdocument kan gezien worden als *in vivo* tegenhanger, en geeft de visie van het RIKZ weer op het ontwikkelen van chronische bioassays. Overeenkomstig met Legierse (2001) wordt ingegaan op de keuze van chronische *in vivo* bioassays als onderdeel van een ecologische beoordeling van milieumonsters.

Leeswijzer

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de werkvelden binnen het RIKZ waar chronische *in vivo* bioassays toegepast kunnen worden en laat zien dat er door meerdere instituten en in meerdere kaders aan het ontwikkelen en toepassen van chronische bioassays wordt gewerkt. Omdat afhankelijk van het werkveld en het specifieke project tot een andere keuze van bioassays gekomen kan worden, zou voor elk van deze individuele werkvelden de keuze voor en status van chronische bioassays verder kunnen worden uitgewerkt om zo te komen tot een plan van aanpak. Op dit ogenblik is gekozen om allereerst het werkveld 'sedimenten' verder uit te werken. Uit het overzicht van de situatie in Nederland blijkt, dat men, vooral bij de toepassing in de praktijk, soms moet schipperen met de bestaande testen, terwijl men eigenlijk liever de beschikking zou hebben over andere en/of verder uitontwikkelde testen. Verder lijkt de keuze van de nu gebruikte organismen niet alleen af te hangen van goed onderbouwde keuzes maar mede van enkele toevalligheden (wat niet wil zeggen dat de keuze daarmee fout is). Dit visie document beoogt daarom om dit op een rijtje te zetten, om zo toe te werken naar wel overwogen keuzes over waar de aandacht zich de komende jaren op moet richten.

Om deze afweging te kunnen maken wordt in hoofdstuk 3 allereerst stilgestaan bij de vraag welke chronische sediment testen er in de andere delen van de wereld reeds (al dan niet routinematig) worden toegepast. Aansluiten hierbij kan zowel voor- als nadelen hebben. In hoofdstuk 4 wordt vervolgens een korte karakterschets gegeven van de sediment bewonende fauna in een aantal typische brak water en mariene ecotopen. De relevantie van een test met een bepaalde soort hangt namelijk niet alleen af van de vraag of het een inheems dan wel uitheems organisme is, maar ook van de vraag hoe relevant het organisme is gelet op de ecosystemen waar de bescherming zich op richt. Vervolgens wordt in hoofdstuk 5 ingegaan op de te hanteren selectiecriteria. Op basis van deze overzichten wordt in hoofdstuk 6 een voorstel gedaan betreffende een beperkte set organismen, waarmee een set chronische *in vivo* bioassays voor brakke en mariene sedimenten kan worden ontwikkeld. Hierbij is onderscheid gemaakt op basis van enkele belangrijke taxonomische groepen (wormen, kreeftachtigen, tweekleppigen en stekelhuidigen), het type gebied waar de bioassay voor wordt ontwikkeld (havenslib, brakke dan wel mariene sedimenten) als mede de vraag of ontwikkeling van een test op korte, middenlange of lange termijn wordt voorzien.

2. Chronische bioassays voor brakke en mariene milieumonsters in Nederland

Het selecteren van de te gebruiken (set van) bioassays hangt van vele variabelen af. "Is het onderzoek gericht op het pelagische of het benthische systeem?" en "Betreft het een brakwater of een marien milieu?" zijn maar twee van de belangrijke vragen. Hieronder is daarom allereerst een overzicht gegeven van werkvelden (geordend naar het type monsters), waarbij is nagegaan hoe de stand van zaken aangaande het toepassen van bioassays op dit moment is binnen Nederland en in hoeverre er een vraag is naar het ontwikkelen van chronische bioassays.

2.1. Afvalwater

Binnen het RIZA wordt gewerkt aan het ontwikkelen, valideren en implementeren van de TEB-methode of te wel de Totaal Effluent Beoordelingsmethodiek. Deze methode richt zich op acuut toxische effecten, chronische effecten, afbreekbaarheid, genotoxiciteit en bioaccumulerend vermogen. Vooral het ontwikkelen van een set acute bioassays is redelijk gevorderd en er wordt in de praktijk dan ook al veel ervaring mee opgedaan zowel binnen Rijkswaterstaat als de regionale waterbeheerders (zie bijv. De Graaf *et al.*, 2000a; 2000b). Aan het ontwikkelen van een set chronische bioassays wordt op dit moment gewerkt. Voor wat betreft de brakke en mariene monsters werd recent door TNO een overzicht opgesteld van mogelijk geschikte testen (Hooftman, 1999) en zijn de eerste praktijk studies ook reeds uitgevoerd. Een van de uitgangspunten bij het toepassen van bioassays voor het beoordelen van afvalwater is dat de betreffende monsters zo min mogelijk veranderd mogen worden. Dit heeft onder meer tot gevolg dat specifiek bekeken moet worden welke testen geschikt zijn om brakke afvalwatermonsters te testen. Alhoewel het RIZA dit traject blijft trekken kan vooral op het vlak van de brakke en mariene bioassays input vanuit het RIKZ wenselijk zijn.

2.2. Oppervlaktewater

In verscheidene onderzoeksinstituten (bijv. RIKZ, TNO, AquaSense, NIOO-CEMO, NIOZ) wordt gewerkt met (semi-) chronische testen met pelagische organismen of levensstadia. Deze testen worden veelal toegepast in het kader van specifieke onderzoeksvragen, bijvoorbeeld gericht op de toxiciteit van bepaalde stoffen. Het gaat hierbij om meerdere organismen, waaronder algen, *Acartia*, zee-egels, oesters en tarbot larven. Bij het monitoren van de oppervlaktewater kwaliteit wordt voor wat betreft de brakke en mariene systemen binnen Nederland weinig tot geen gebruik gemaakt van chronische effect bioassays. Er zijn wel enkele mogelijkheden. Zo heeft het bedrijf Mermayde een mosselmonitor ontwikkeld, waar de klepbeweging van mossels (bijv. *Mytilus*) gebruikt wordt als effectparameter. Daarnaast worden mosselen gebruikt om de accumulatie van verontreinigingen

vanuit het water in beeld te brengen. Beide parameters geven echter geen direct inzicht in effecten op populatiedynamische parameters als groei en/of reproductie.

Ook in internationaal kader is men bezig met het ontwikkelen van biologische effectmetingen voor het pelagische ecosysteem. De Advisory Committee on the Marine Environment (ACME), onderdeel van ICES, geeft in haar jaarlijks rapport (ICES, 2001) bijvoorbeeld aan dat de Working Group on Biological Effects of Contaminants een gebrek constateerde aan overeenstemming over in te zetten effectmetingen voor het pelagische ecosysteem. Aangezien de ervaringen met de Bremerhaven workshop (die zich vooral op het sediment richtte) zeer goed waren, werd er in 2001 een workshop georganiseerd waarbij de focus zich op het water richtte. Hierbij zijn een groot aantal mogelijk geschikte technieken ingezet, zich richtend op:

- in het veld verzamelde organismen
Bijv. de fotosynthese van fytoplankton, biomarkers in zooplankton en kril en misvormingen en biomarkers in vis en vislarven.
- experimenten met gekooide organismen
Bijv. biomarkers in de mossel *Mytilus edulis*, in de kabeljauw *Gadus morhua* en in de driedoornige stekelbaars (*Gasterosteus aculeatus*).
- experimenten met verzameld water
Bijv. AChE inhibitie, primaire vis hepatocyten, ELS testen als mede larvale ontwikkelingstesten met de oester of zee-egels.

2.3. Baggerspecie

Bij het beoordelen van baggerspecie gericht op de vraag of de specie al dan niet op zee mag worden gestort, wordt gewerkt aan de implementatie van de CTT-toets (Stronkhorst *et al.*, 2001). Naast een groot aantal chemische analyses wordt hierbij gebruik gemaakt van een drietal bioassays, namelijk de Microtox Solid Phase test, de DR-CALUX en de 10 daagse test met de slijkgarnaal *Corophium volutator*. Het beoordelen van baggerspecie dient in dit kader gezien te worden als een productbeoordeling, waarbij het doel niet gelegen is in het beoordelen van de actuele ecologische risico's in het betreffende havenvak.

2.4. Sedimenten

Een op effect gerichte beoordeling van mariene en brakke sedimenten (afgezien van bovengenoemde baggerspecie) wordt in meerdere kaders toegepast. Allereerst wordt er binnen het RIKZ in het kader van het biologisch-chemisch beoordelingsinstrumentarium aan het opzetten van chronische bioassays gewerkt. Daarnaast worden de testen in specifieke projecten toegepast en neemt ook vanuit een internationaal kader (OSPAR, ICES) de druk op het implementeren van biologische effectmetingen toe. Deze drie punten zijn hieronder in meer detail uitgewerkt.

i) ontwikkeling chronische bioassays door RIKZ

Als eerste is een test met de polychaet *Nereis virens* opgezet. Naast het waarnemen van eventuele sterfte gaat het bij deze test vooral om het vaststellen van eventuele effecten op de groei tijdens een blootstelling van 28 dagen. Tevens kan aanvullend ook naar de mate van bioaccumulatie gekeken worden (Kater & Hannevijk, 2000). Deze test is reeds redelijk ver ontwikkeld en is de laatste paar jaar ook in enkele projecten reeds toegepast, bijv. bij het beoordelen

van met HCB gespiked sediment (AquaSense, 2001) en experimenten met materiaal uit de Waddenzee en het Zeehavenkanaal (Kater *et al.*, 1999, 2000). Deze test met *Nereis* leent zich tevens voor een *in situ* uitvoering (AquaSense, 1999; 2000a). Verder wordt er sinds kort gewerkt aan het opzetten van een test met *Nereis diversicolor*, omdat deze soort qua saliniteitsbereik wellicht de voorkeur boven *N. virens* verdient. Ook wordt op dit moment hard gewerkt aan het ontwikkelen van een chronische test met *Corophium volutator*. Het doel van deze test is dat de beoordeling niet alleen op basis van de groei (zoals bij *Nereis*) maar ook op basis van de reproductie kan plaatsvinden. De eerste resultaten van een lopende stage geven aan dat reproductie van *Corophium* onder laboratorium condities mogelijk is.

ii) specifieke projecten

Op meerdere lokaties in Nederland zijn bioassays toegepast om een oordeel over de sedimentkwaliteit te geven. Deze informatie kan bijvoorbeeld gebruikt worden om een saneringsbeslissing te onderbouwen of de urgentie van een sanering aan te geven. Zonder daarbij de intentie te hebben, dat het overzicht volledig is worden hieronder enkele recente voorbeelden genoemd.

1. Waddenzee / Zeehavenkanaal

Zoals hierboven reeds vermeld zijn er in de periode 1999 – 2000 meerdere experimenten met materiaal uit de Waddenzee en het Zeehavenkanaal uitgevoerd. Recent zijn deze resultaten geïntegreerd (Van den Brink & Kater, 2000) waarbij via multivariate statistiek bekeken is in hoeverre de resultaten van chemische en biologische analyses elkaar ondersteunen.

2. Loswal Noord

Bij het beoordelen van de ecotoxicologische effecten van het storten van baggerspecie op zee is behoefte aan gevoelige testen, vooral als gevolg van de aard en mate van verontreiniging van de baggerspecie, die mag worden gestort. Bij het opzetten van een onderzoeksplan voor een effectgerichte beoordeling van het verplaatsen van de Loswal Noord bestond deze behoefte ook en is er uitgebreid naar geschikte testen gezocht. In die tijd bestond er binnen Nederland echter nog weinig ervaring met chronische zoutwater sediment bioassays en is gekozen voor een combinatie van de meer standaard toegepaste acute testen (bijv. testen met *Corophium*), een enkele embryonale test (de fertilisatie test met de zee-egel *Psammechinus miliaris*) en biochemische analyses in ter plaatse gevangen zeester *Asterias rubens* (AquaSense, 1996).

3. Kanaal door Walcheren

Op dit ogenblik wordt in opdracht van Rijkswaterstaat directie Zeeland onderzoek gedaan naar de ernst en urgentie van de waterbodembodem verontreiniging (vooral koper) in het Kanaal door Walcheren. Als een van de onderdelen hiervan wordt gekeken naar de effecten van de verontreinigingen door bioassays en bioaccumulatie testen uit te voeren met *Corophium*, de oester *Crassostrea gigas*, de Microtox test en *Nereis* (AquaSense, 2001). Speciale aandacht gaat hierbij uit naar de invloed van het zoutgehalte op de beschikbaarheid van koper. Naast het feit, dat dit kanaal vooral brakwater bevat kan het zoutgehalte ook sterk variëren tussen de seizoenen.

4. Noordzeekanaal

In opdracht van Rijkswaterstaat directie Noord-Holland wordt onderzoek uitgevoerd naar de effecten van de sedimentverontreiniging in een aantal havens langs het Noordzeekanaal. Een van de doelstellingen van dit onderzoek is dat de resultaten van het biologische onderzoek (bioassays, bioaccumulatie, veldinventarisaties) gebruikt kunnen worden bij het prioriteren van de sanering tussen de havens onderling. Overeenkomstig met het Kanaal door Walcheren speelt ook hier de variatie in het zoutgehalte een prominente rol bij het interpreteren van de resultaten (lopend onderzoek TNO).

Deze voorbeelden illustreren onder meer het relatieve belang van het brakke water. De geografische ligging en dynamiek van de brakwatergebieden veroorzaakt namelijk tegelijkertijd dat zich juist hier relatief veel verontreinigingen in het sediment ophopen. Het is dan ook van groot belang, dat de te ontwikkelen chronische bioassays ook toepasbaar zijn in deze brakke wateren.

iii) internationale monitoring

In 1998 werd er door de OSPAR besloten dat in verband met de implementatie van CEMP (=Coordinated Environmental Monitoring Programme), sommige onderdelen van de JAMP (=Joined Assessment and Monitoring Program) als verplichting gezien moeten worden. Het gaat hierbij alleen om goed gevalideerde parameters (geprotocoliseerd, QA procedures etc.), die als categorie 1 worden gekwalificeerd. De biologische effect parameters binnen JAMP worden vooralsnog als categorie 2 bestempeld, omdat de kwaliteitsborging van deze parameters nog niet volledig operationeel is. Voorbeelden van deze parameters zijn cytochroom P450, PAK metabolieten, DNA-adducten, metallothioneinen en imposex. De bedoeling is echter dat (bijv. via het EU-programma BEQUALM) de kwaliteitsborging voor deze parameters binnenkort zover is geïmplementeerd, dat ook deze biologische effect parameters een categorie 1 status krijgen. Op dat moment dienen deze parameters echter ook als een verplichting gezien te worden op basis van CEMP. De OSPAR CEMP kan daarmee als een van de belangrijkste drijfveren achter het implementeren van biologische effectmetingen gezien worden. Vooralsnog omvat deze lijst met biologische effect parameters, die mogelijk binnenkort een categorie 1 status krijgen, vooral parameters die zich op cellulair of orgaanniveau laten analyseren en nog geen bioassays, die zich richten op het beoordelen van mogelijke effecten op de sterfte, groei en/of reproductie. De ICES werkgroep, die zich richt op de biologische effecten van contaminanten, heeft echter in aanvulling daarop een drietal lijsten opgesteld (die periodiek worden geëvalueerd), namelijk i) aanbevolen parameters; ii) potentieel interessante parameters en iii) parameters die binnenkort verder moeten worden bestudeerd en geëvalueerd. In de lijst 'aanbevolen parameters' zijn een zevental sediment bioassays opgenomen namelijk bioassays met *Corophium*, *Echinocardium*, *Arenicola*, *Leptocheirus*, *Grandidierella*, *Rhepoxynius* en *Ampelisca*. Verder worden er enkele waterfase testen genoemd, zoals testen met *Acartia*, Microtox en larvale ontwikkelingstesten met bivalven of zee-egels. Binnen Nederland worden in dit kader periodiek testen met larven van de oester *Crassostrea gigas* uitgevoerd. Op de lijst met potentieel interessante parameters wordt melding gemaakt van 'chronische sediment testen met evertetraten', die echter verder niet met name zijn genoemd. Uit de toegevoegde referentie blijkt dat het

hierbij om *Leptocheirus* gaat, maar waarschijnlijk vooral omdat dit een van de weinige soorten is waarmee in sediment testen naar chronische effecten is gekeken (WGBEC report, 2001).

2.5 Verwachte biologische effecten

Zoals hierboven is geschetst zijn er voor meerdere lokaties binnen Nederland gegevens over de effecten van verontreinigde sedimenten beschikbaar. Zonder de resultaten van deze studies in detail te bespreken blijkt uit de geciteerde rapporten, dat het huidige verontreinigingsniveau van sedimenten in een aantal brakke binnenwateren zodanig hoog is, dat negatieve effecten in relatief kortdurende testen kunnen worden aangetoond. De studie op Loswal Noord laat (zoals te verwachten is) zien dat de effecten op de Noordzee geringer zijn. Dit betekent, dat nu reeds een behoefte bestaat aan gevoeliger testen, zoals bijvoorbeeld chronische bioassays. Daarnaast mag verwacht worden, dat de dalende trend in de verontreinigingsniveaus van de grote rivieren zich zal vertalen in lagere verontreinigingsniveaus in het sediment en daarmee in geringere ecotoxicologische effecten. De noodzaak voor een inzetbare testbatterij met chronische sediment testen wordt daardoor verder vergroot.

3. Chronische bioassays voor brakke en mariene sediment-monsters in het buitenland

Indien bij de ontwikkeling, validatie en toepassing van chronische sediment bioassays kan worden aangesloten bij ontwikkelingen in het buitenland kan dit veel werk besparen. Ook zal er over het algemeen meer kennis beschikbaar zijn om de resultaten goed te kunnen interpreteren. Aan de andere kant zijn er ook nadelen, zoals het feit, dat het werken met uitheemse dieren waar mogelijk voorkomen moet worden. Omdat er meerdere argumenten een rol kunnen spelen, beperkt dit hoofdstuk zich tot het geven van een overzicht van uit de literatuur bekende testen (§3.1). Tevens wordt van ieder van deze testen een korte karakteristiek gegeven (§3.2).

In opdracht van het RIKZ heeft AquaSense in 1998 een korte literatuurstudie uitgevoerd naar reeds aanwezige chronische sediment bioassays (AquaSense, 1998). In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de aangetroffen chronische sediment testen. De testen waarbij naar reproductie is gekeken zijn allereerst benoemd. Daarnaast zijn de testen weergegeven, die niet naar reproductie maar wel naar larvale groei kijken. Ook in de testen gericht op reproductie wordt aandacht besteed aan de groei. Het kan niet worden bestudeerd of reproductie is echter zo'n voordeel dat dit onderscheid is aangebracht.

Korte omschrijving testen

Veel van de in tabel 3.1 genoemde testen zijn relatief onbekend. Daarom wordt in paragraaf 3.1 en 3.2 per test een korte beschrijving gegeven. Tevens wordt de uitvoering van de testen in tabel 3.2 samengevat.

3.1. Reproductietesten

In vrijwel alle reproductietesten, met uitzondering van de testen met copepoden en nematoden, wordt naast de reproductie ook groei als parameter meegenomen.

Reproductie- en groeitest met de worm *Capitella capitata*

Chapman & Fink (1984) beschrijven een test met de polychaete marine worm *Capitella capitata*. *C. capitata* is een opportunistische soort, die de mogelijkheid heeft om snel in aantal toe te nemen, zelfs bij een hoge larvale sterfte. De test omvat een complete levenscyclus, te beginnen bij het trochofore larvale stadium. Chapman & Fink (1984) beschrijven twee testopzetten. Bij de ene testopzet worden de wormen blootgesteld aan elutriaat, bij de andere aan sediment. De elutriaat testen worden na 50 dagen beëindigd, de sedimenttesten na 35 dagen. Testparameters zijn overleving, aantal larven en juvenielen, eventuele afwijkingen, groeisnelheid (gemeten als lengte), tijd van het trochofore larvale stadium (één van de eerste embryonale ontwikkelingsstadia) tot aan reproductie en het aantal vrouwtjes met zichtbare eieren. Uit de resultaten blijkt dat de larven gevoeliger zijn dan de volwassenen en dat significante sterfte alleen plaatsvindt voordat de metamorfose compleet is. De testopzet maakt het tevens mogelijk om een abnormale larvale metamorfose, leidend tot sterfte, te detecteren.

Tabel 3.1.

Overzicht van chronische sediment bioassays.

Phylum	Taxon	Testduur	Referentie
Reproductie			
Annelida			
Polychaeta	<i>Capitella capitata</i>	35 dagen, 50 dagen	Chapman & Fink (1984)
	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	58 - 153 dagen	Pesch <i>et al.</i> (1991)
Arthropoda			
Amphipoda	<i>Ampelisca abdita</i> *	56 dagen	Scott & Redmond (1989)
Amphipoda	<i>Grandidierella lignorum</i> en	39-90 dagen	Connell & Airey (1979)
	<i>Grandidierella lutosa</i>		Connell & Airey (1982)
Amphipoda	<i>Leptocheirus plumulosus</i>	28-40 dagen	Schlekat <i>et al.</i> (1992)
			Emery <i>et al.</i> (1997)
			Mc Gee <i>et al.</i> (1993)
Amphipoda	<i>Corophium volutator</i>	49 dagen	Kooman (2002)
Copepoda	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	21 dagen	Strawbridge <i>et al.</i> (1992)
Copepoda	<i>Microarthridion littorale</i>	7 dagen	Chandler (1990)
Copepoda	<i>Paronychocampus wilsoni</i>	7 dagen	Chandler (1990)
Copepoda	<i>Nannopus palustris</i>	7 dagen	Chandler & Scott (1991)
Copepoda	<i>Pseudobradia pulchella</i>	7 dagen	Chandler & Scott (1991)
Nematoda			
	<i>Chromadorina germanica</i>	14 dagen	Tietjen & Lee (1984)
	<i>Diplolaimella punicea</i>	14 dagen	Tietjen & Lee (1984)
Groei			
Annelida			
Polychaeta	<i>Armandia brevis</i>	42 dagen	Meador & Rice (2001)
	<i>Neanthes arenaceodentata</i> ,	20 – 28 dagen	ASTM E1611 (1999)
	<i>Nereis/Neanthes spec.</i>		Dillon <i>et al.</i> (1993)
	<i>Streblospio benedicti</i>	7 dagen	Chandler & Scott (1991)
	<i>Arenicola marina</i>	50 dagen	Mond. med. CEFAS
Arthropoda			
Amphipoda	<i>Grandidierella japonica</i> *	28 dagen	Nipper <i>et al.</i> (1989)
Echinodermata			
	<i>Dendraster excentricus</i> *	28 dagen	Casillas <i>et al.</i> (1992)
	<i>Amphiodia urtica</i>	28 dagen	SCCWRP (1994c)
	<i>Lytechinus pictus</i>	49 - 60 dagen	Thompson <i>et al.</i> (1991)
			Thompson <i>et al.</i> (1989)
Mollusca			
Bivalvia	<i>Mulinia lateralis</i>	7 dagen	Burgess & Morrison (1994)
Bivalvia	<i>Mercenaria mercenaria</i>	7 dagen	Ringwood & Keppler (2002)
Bivalvia	<i>Scrobicularia plana</i>	36 dagen	Ruiz <i>et al.</i> (1994)

*Benchmarktype; organisme is toegewezen door de EPA of ASTM als gevoelig.

Tabel 3.2. Samenvatting van de karakteristieken van de beschreven testen.

Phylum / Klasse	soort	inheems / uitheems	testduur (dagen)	tempe- ratuur(°C)	replica's	verversen	voeden	testparameters	referentie	saliniteits- range' (promille)	sediment- typen
Reproductie											
Annelida											
Polychaeta	<i>Capitella capitata</i>	inheems	35-50	20	?	elutriaat 2x/week sedimenttest	2x/week ad libidum TetraMin en algen	overleving, aantal larven, juvenielen, vrouwtjes met zichtbaar ei, tijd tot volwassen	Chapman & Fink (1984)	±6 - 40	
Polychaeta	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	uitheems	58-153	20	2-4	niet doorstroom	3-5x/week garnalen- vlokken	overleving, groei, groot aantal reproductie- parameters	Pesch <i>et al.</i> (1991)	test bij 30 EPA; NC	
Arthropoda											
Amphipoda	<i>Ampelisca abdita</i>	uitheems	56	20	2	doorstroom	continu algen	life-cycle: groot aantal parameters	Scott & Redmond (1989)	EPA; NC	
Amphipoda	gemengde cultuur van <i>Grandidierella lignorum</i> en <i>Grandidierella lutosa</i>	uitheems	39-90	23 - 25	2	5% elke 20 min	visvoer dagelijks	aantal & lengte volwassenen, aantal juvenielen, eieren per vrouwtje	Connell & Airey (1979, 1982)§		
Amphipoda	<i>Leptocheirus plumulosus</i>	uitheems	28	23	5	semi-statisch, frequentie en aandeel wisselend	3x/week TetraMin	overleving, groeisnelheid per sexe, aantal juvenielen	Emery <i>et al.</i> (1997); McGee <i>et al.</i> (1993); Schlekat <i>et al.</i> (1992)	5-20, kan 0- 33 tolereren (zie tekst)	fijn zand tot ziltige klei (zie tekst)
Amphipoda	<i>Corophium volutator</i>	inheems	49	17	4	3x/week	3x/week visvoer	overleving, aantal juvenielen	Kooman (2002)	4 – 40	fijn zand tot ziltige klei (zie tekst)

Tabel 3.2. Vervolg

Phylum / Klasse	soort	inheems / uithoems (dagen)	test- duur (°C)	tempe- ratuur	replica's verversen	voeden	Testparameters	referentie	saliniteits- range ¹ (promille)	sediment- typen
Reproductie (vervolg)										
Arthropoda										
Copepoda	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	uithoems	21	22	4 wekelijks 80%	2x/week algen	overleving, aantal mannetjes, vrouwtjes, copepodites en nauplii	Strawbridge et al. (1992)		
Copepoda	<i>Microarthridion littorale</i> & <i>Paronychocamptus wilsoni</i>	uithoems	7	18	>80% elke 2 dagen	2x/week algen	aantal bevruchte vrouwtjes, eieren per eipakket	Chandler (1990)		
Copepoda	<i>Nannopus palustris</i> & <i>Pseudobradya pulchella</i>	uithoems	7	?	>80% elke 2 dagen		overleving, aantal bevruchte vrouwtjes	Chandler & Scott (1991)	EPA: E	
Nematoda	<i>Chromadorina germanica</i> & <i>Diplolaimella punicea</i>	inheems & onbekend	14	25	3 statisch	10 ⁶ bact./ testvat (mengsel)	intrinsieke populatiegroei snelheid (dagelijkse toename in aantallen)	Tietjen & Lee (1984)	EPA: E NC & E	geen invloed (zie tekst)
Larvale groei										
Annelida										
Polychaeta	<i>Armandia brevis</i>	uithoems	42	13	? hele systeem na 21 dagen	-	overleving, groei	Meadows & Rice (2001)		
Polychaeta	<i>Nereis/Neanthes</i> (Hediste); <i>Capitella capitata</i> ; <i>Nereis virens</i>	inheems	20 of 28	20	5 semi-statisch	1x/week TetraMin en/of alfalfa	overleving, groei	ASTM E1611 (1999)	Divers <i>N. virens</i> : 15 - 36	
Polychaeta	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	uithoems	21-84	w.s. 21	wisse- lend 1x elke 1-3 weken	TetraMin + alfalfa (1:1)	overleving, groei	Dillon et al. (1993)	>20 (zie tekst)	groei lager in zand (zie tekst)
Polychaeta	<i>Streblospio benedicti</i>	inheems	7	?	4 w.s. statisch	?	overleving, kolonisatie, vermijdingsgedrag, groei	Chandler & Scott (1991)	0 tot >40	

Tabel 3.2. Vervolg

Phylum / Klasse	soort	inheems / uitheems (dagen)	test-duur (°C)	tempe-ratuur	replica's	verversen	voeden	testparameters	referentie	saliniteits-range ¹ (promille)	sediment-typen
Larvale groei vervolg											
Annelida											
Polychaeta	<i>Arenicola marina</i>	inheems	50	?	?	wekelijks 80%	ja?	overleving, excretie-snelheid, evt. groei	mondelinge mededeling CEFAS	±12 - 40	
Arthropoda											
Amphipoda	<i>Grandidierella japonica</i>	uitheems	28	19	3	doorstroom g 4-6x het. volume per dag	10% [≈] Tetramin suspensie elke week	overleving, groei; andere te parameters eenvoudig in te bouwen	Nipper <i>et al.</i> (1989)	EPA: NC	groei lager in klei (zie tekst)
Echinodermata											
	<i>Dendraster excentricus</i>	uitheems	28	13	2 - 5	doorstroom (500ml/u)	ad libidum	overleving, groei (lengte), DNA- en eiwitgehalte	Casillas <i>et al.</i> (1992)		
	<i>Amphiodia urtica</i>	uitheems	28	12	2x4	doorstroom (2-4 ml/min)	visvoer? 2x/week Tetramin	overleving, groei (mondwijde, arm regeneratie)	SCCWRP (1994c)		
	<i>Lytechinus pictus</i>	uitheems	49	15	3	doorstroom 1x elke 2-3 dagen	?	vermijdingsgedrag, conditie, sterfte, gonadeproductie	Thompson <i>et al.</i> (1991)		
	<i>Lytechinus pictus</i>	uitheems	60	12	3	doorstroom	elke 2 dgn Tetramin	sterfte, gonadeproductie, bioaccumulatie	Thompson <i>et al.</i> (1989)		
Mollusca											
Bivalvia	<i>Mulinia lateralis</i>	uitheems	10	21	6	statisch of elke dag volledige waterfase	dagelijks algen	overleving, groei	Burgess & Morrison (1994)	7 tot >32	grootte range heeft geen invloed
Bivalvia	<i>Mercenaria mercenaria</i>	uitheems	7	22-25	4	statisch	dag 1, 3 & 6 algen	overleving, groeisnelheid	Ringwood & Keppler (2002)	11 - 35?; groei neemt toe met saliniteit	grootte range heeft geen invloed
Bivalvia	<i>Scrobicularia plana</i>	inheems	36	15	2	1/3 elke 3e dag	elke 3 dgn algen	overleving, groei,	Ruiz <i>et al.</i> (1994) graafactiviteit	8 - 30	

¹ De EPA heeft voor een aantal testorganismen hun zouttolerantie aangegeven. Hierbij staat N voor "Near Coastal" (saliniteit ≥ 25 ‰) en E voor "Estuarine" (1-25 ‰).

Gedeeltelijk life-cycle test met de polychaet *Nereis (Neanthes) arenaceaodontata*

De polychaet *Nereis (Neanthes) arenaceaodontata* is een kosmopoliet die algemeen geaccepteerd is als testorganisme, onder andere door de EPA. De levenscyclus is goed bekend en vindt nagenoeg geheel in het sediment plaats.

Pesch *et al.* (1991) beschrijven een test waarin de overleving, groei en reproductie van de worm wordt onderzocht. In deze gedeeltelijke life-cycle test worden de wormen in een doorstroom sediment-water systeem gedurende maximaal 153 dagen blootgesteld. Tot en met dag 49 worden de wormen drie keer per week gevoed met commercieel verkrijgbare garnalenvlokken, daarna vijf keer per week. Het experiment startte met 20 replica's met elk 28 juveniele wormen. Op dag 58, 75, 95, 110, 131 en 153 werden 2 tot 4 replica's beëindigd. Bij beëindiging van de test werden een groot aantal parameters bepaald, te weten 1) (leeftijdsspecifieke) overleving; 2) grootte van de dieren op basis van het drooggewicht en het aantal segmenten; 3) het aantal broedsels alsmede het aantal eieren dan wel larven per broedsel; 4) het aantal juvenielen; 5) de geschatte tijd tot eileggen; 6) de leeftijdsspecifieke vruchtbaarheid en 7) de populatiegroeisnelheid. In vergelijking met andere testorganismen blijkt de beschreven life-cycletest niet erg gevoelig te reageren op verontreinigde sedimenten (Pesch *et al.*, 1991).

Life cycle test met de amphipode *Ampelisca abdita*

In deze test, die door Scott & Redmond (1989) beschreven wordt, wordt zowel de groei van de amphipode als de intrinsieke populatiegroeisnelheid bepaald. Bij de intrinsieke populatiegroeisnelheid worden de leeftijdsspecifieke overleving en alle facetten van de reproductie geïntegreerd, waaronder leeftijd op het moment van reproductieve rijpheid, aantal juvenielen per broedsel, reproductiefrequentie en reproductieve periode.

In de test worden de amphipoden gedurende 56 dagen bij 20°C blootgesteld aan een suspensie van sediment. Het testvat van circa 4,5 liter is gevuld met 0,75 liter referentiesediment (5 cm diep) en wordt doorstroomd met verschillende concentraties van een in zeewater gesuspenseerd mengsel van referentiesediment en verontreinigd sediment (samen 50 mg/l, 20 ml/min). Deze suspensie wordt continue aangemaakt in aparte mix- en verdelingsvaten. Amphipoden die uit het testvat stromen worden opgevangen in een overstroomval. De amphipoden worden continu gevoerd met algen (1 ml/min). De test kan zowel onder aerobe omstandigheden als onder anaerobe omstandigheden worden uitgevoerd. In het laatste geval wordt in de mixvaten argongas injectie gebruikt om het sediment anaeroob te houden. De testorganismen worden in het veld verzameld. De test wordt in viervoud uitgevoerd met 15 eidragende vrouwtjes per replica. Gedurende de test wordt dagelijks het aantal en de sexe van de amphipoden in het water in de overstroomval gescoord. Levende amphipoden worden teruggezet. Halverwege de test worden twee replica's gezeefd en wordt de overleving, de sexe, de gemiddelde grootte en het aandeel volwassen amphipoden bepaald. Daarnaast wordt in elk bevrucht vrouwtje het aantal eieren geteld en het ontwikkelingsstadium bepaald. Aan het eind van de test wordt behalve deze parameters ook het totaal aantal juvenielen geteld. Tezamen worden deze parameters gebruikt om de intrinsieke groeisnelheid (r) uit te rekenen met behulp van de Euler vergelijking.

De soort *Ampelisca abdita* is een amphipode die gangen van 3-4 cm in het oppervlak van het sediment graaft. De soort komt voor in de Verenigde Staten, van Maine tot Louisiana, en vanaf bij eb droogvallende gebieden tot aan een diepte van 60m. De amphipode voedt zich met deeltjes afkomstig van het bodemoppervlakte of met zwevend materiaal. De paring vindt in het water plaats waarna de vrouwtjes met de bevruchte eieren terugkeren naar het sediment. Na circa twee weken worden de juvenielen in de omgeving vrijgelaten. Elk vrouwtje reproduceert waarschijnlijk slechts eenmalig. In laboratoriumpopulaties is de levensduur 6 tot 8 weken.

Life cycle testen met de amphipoden *Grandidierella lutosa* en *Grandidierella lignorum*

Connell & Airey (1979, 1982) beschrijven een test met een gemengde populatie van twee soorten gravende amphipoden, *Grandidierella lutosa* en *Grandidierella lignorum*. Beide soorten zijn inheems en algemeen voorkomend in brakke wateren en estuaria in Zuid Afrika. Ze kunnen bij een brede range in saliniteit voorkomen. *G. lignorum* wordt zelfs gevonden in zoetwater. Beide soorten zijn eenvoudig te kweken in het laboratorium. Er is enige kennis over de biologie en de temperatuurtoleranties van *G. lignorum*.

In Connell & Airey (1982) worden een aantal verschillende proefopzetten beschreven die gebruikt zijn om de toxiciteit van een stof, in dit geval fluoride, in zeewater voor een gemengde populatie van *G. lutosa* en *G. lignorum* te testen. De proefopzetten verschillen onder andere in het aantal organismen waarmee wordt gestart (5 of 20 vrouwtjes, wel of geen mannetjes) en de blootstellingsduur (39 of 90 dagen). Uiteindelijk is een proefopzet gebruikt waarin 20 eidragende vrouwtjes en 10 volwassen mannetjes worden gehouden in een sediment-water systeem van 10 liter zeewater met een laag van 0,5 tot 1 cm sediment op de bodem. Het betreft een semi-doorstroomsysteem waarbij elke 20 minuten 500 ml vers zeewater in de tank stroomt. De amphipoden worden dagelijks gevoerd met visvoer. De test wordt uitgevoerd in duplo en duurt 90 dagen, hetgeen circa drie levenscycli omvat. Aan het einde van de test worden het aantal vrouwtjes, mannetjes, juvenielen en eieren bepaald, alsmede de gemiddelde lengte van de volwassenen en het aantal eieren per volwassen vrouwtje. De lengte en het aantal eieren per volwassen vrouwtje blijken behalve door de verontreiniging ook beïnvloed te worden door andere factoren zoals de populatiedichtheid en zijn dus waarschijnlijk minder geschikt als testparameter. Er kan echter ook overwogen worden om de testduur in te korten, zodat die slechts één levenscyclus omvat. Hierdoor kunnen dergelijke problemen wellicht verkleind worden.

Groei en reproductie van de amphipode *Leptocheirus plumulosus*

Er zijn diverse onderzoekers die een chronische test met de amphipode *Leptocheirus plumulosus* beschrijven waarbij zowel de groei als de reproductie wordt onderzocht. De testduur varieert van 28 dagen (Schlekat *et al.*, 1992; Emery *et al.*, 1997) tot 40 dagen (McGee *et al.*, 1993). De testmethoden lijken verder zeer sterk op elkaar. Daar waar ze afwijken is in de omschrijving de meest recente testmethode (die van Emery *et al.*, 1997), aangehouden.

In deze 28-daagse test, beschreven door Emery *et al.* (1997), worden estuarine amphipoden van de soort *Leptocheirus plumulosus* bij 23°C blootgesteld in een sediment-water systeem van 2 cm sediment en 500ml zeewater (20‰). De test wordt in vijfvoud uitgevoerd met 20 amphipoden per testvat. De testorganismen worden verkregen door

sediment te zeven, waarbij de zeeffractie van 425-600 µm wordt gebruikt (overeenkomend met dieren van 7-14 dagen oud). Het is niet eenduidig omschreven of en hoeveel water ververst wordt, maar waarschijnlijk dagelijks 60% van het bovenstaande water. De dieren worden drie keer per week gevoerd met TetraMin. Bij aanvang van de test wordt het drooggewicht van de ingezette organismen bepaald. Aan het einde van de test worden de overleving, het aantal mannetjes en vrouwtjes, groei per sexe en reproductie (als het aantal juvenielen per overlevend vrouwtje) bepaald. Schlek et al. (1992) en McGee et al. (1993) bepaalden de groei op basis van lengte en keken naast overleving en het aantal juvenielen additioneel naar seksuele ontwikkeling, dat wil zeggen het aantal zwangere vrouwtjes.

De invloed van allerlei factoren die het testresultaat kunnen beïnvloeden is voor *Leptocheirus plumulosus* goed onderzocht. Er is onder andere gekeken naar de invloed van de grootte van de testorganismen bij aanvang van de test, de dichtheid aan organismen, het type en de hoeveelheid voedsel, het type kunstmatig zeewater, de deeltjesgrootte, de saliniteit en het organisch stofgehalte. De soort kan een grote range aan saliniteiten tolereren, van 0 tot 33 promille (Schlek et al., 1992), hoewel bij hoge en lage saliniteit de groei en reproductie, maar niet de overleving, wordt beïnvloed. Emery et al. (1997) geven aan dat de soort geschikt is voor testen bij een saliniteit van 5 tot 20 promille. Verder kan de soort in een groot aantal sedimenten voorkomen, van fijn zand tot siltige klei. Alleen extreem fijne (>75% klei) of extreem grove (>75% zand) sedimenten beïnvloeden overleving, groei en reproductie significant.

In Schlek et al (1992) wordt geconcludeerd dat de saliniteit, de deeltjesgrootte en het organisch stof gehalte geen significant effect hebben op de overleving, maar wel op reproductie (gemeten als sexeverdeling, aantal zwangere vrouwtjes, aantal juvenielen en aantal embryo's).

Groei en reproductie van de amphipode *Corophium volutator*

Binnen het RIKZ wordt sinds enkele maanden gewerkt aan een chronische reproductie test met de inheemse amphipode *Corophium volutator*. Alhoewel deze test op dit moment nog volop in ontwikkeling is, zien de eerste resultaten er zeer positief uit (Kooman, 2002). Hieronder is daarom de gebruikte methode op hoofdlijnen weergegeven, waarbij gerealiseerd moet worden dat deze nog aan veranderingen onderhevig kan zijn, naarmate de ontwikkeling van deze test voortschrijdt. De testen worden gestart met jonge dieren van circa 2 mm groot. Deze dieren kunnen in het veld verzameld worden maar kunnen ook afkomstig zijn van een kweek in het laboratorium. In bekerglazen van 1 liter wordt een bodem van 200 ml sediment aangebracht. Hier bovenop komt 600 ml gefiltreerd zeewater met een saliniteit van ongeveer 32 ‰. Per sediment-water systeem worden 20 dieren ingezet bij een testtemperatuur van 17 °C. De dieren worden 3 keer per week gevoerd met Yadi visvoer (30 mg per 20 slijkgarnalen). Het bovenstaande water wordt 3 keer per week ververst met natuurlijk zeewater, dat gefiltreerd wordt over 8 µm om aanwezige organismen te verwijderen. Na 6 tot 7 weken worden de testen beëindigd, waarbij naast de overleving en de groei vooral gelet wordt op het aantal geproduceerde jongen. Toekomstig onderzoek zal zich onder andere gaan richten op het verschil in gevoeligheid tussen deze testmethode en de standaard 10-daagse test en over de mate van variatie tussen behandelingen als mede in de tijd.

Reproductie testen met copepoden

Meiobenthos (benthische metazoën die door een 0,5 mm zeef gaan maar achterblijven op een 0,1 mm zeef), waaronder copepoden, hebben een aantal eigenschappen die ze zeer geschikt maken voor studies naar de effecten van verontreinigingen in sediment. Zo kunnen ze in hoge dichtheid voorkomen en staan ze in nauw contact met het sediment (mede door de benthische larven en een sessiele levensstijl). In de literatuur worden er testen beschreven met meerdere soorten copepoden, die hieronder kort worden toegelicht.

Amphiascus tenuiremis. In deze test, beschreven in Strawbridge *et al.* (1992), worden volwassen copepoden gedurende 21 dagen bij 22°C blootgesteld in een sediment-water systeem. De test wordt in viervoud uitgevoerd met honderd copepoden per testvat. Elk testvat bevat 7 cm³ sediment en 200 cm³ zeewater. Elke week wordt 80% van het zeewater ververs. Gedurende de test worden de copepoden twee keer per week gevoerd met de alg *Isochrysis galbana*. Na 21 dagen worden de copepoden uit het sediment gespoeld, gekleurd en wordt de overleving en reproductie bepaald. Hiertoe wordt zowel het aantal volwassen mannetjes, volwassen vrouwtjes, juvenielen in het copepodiet stadium en het aantal juvenielen in het nauplius-stadium geteld. *Amphiascus tenuiremis* heeft een generatietijd van circa drie weken en kent 6 nauplius-stadia, gevolgd door 6 copepodiet stadia. De gekozen testduur van 21 dagen blijkt in de praktijk (Strawbridge *et al.*, 1992) te kort om de levenscyclus volledig te voltooien en zou dus iets verlengd kunnen worden.

Microarthridion littorale en *Paronychocamptus wilsoni*. Chandler (1990) beschrijft sedimenttesten met onder andere twee soorten benthische copepoden, te weten *Microarthridion littorale* en *Paronychocamptus wilsoni*. In de testen worden volwassen vrouwtjes gedurende 7 dagen bij 18°C blootgesteld aan 1 gram nat sediment en 50 ml steriel zeewater. Om de andere dag wordt tenminste 80% van het zeewater ververs. De copepoden worden tweemaal gevoerd met 2 ml fytoplankton (>2 x 10⁶ cellen per ml), dat door middel van hitte gedood is. Na 7 dagen wordt de reproductie gescoord op basis van zowel het aantal vruchtbare vrouwtjes dat eieren heeft geproduceerd als het aantal eieren per eipakket.

Pseudobradia pulchella en *Nannopus palustris*. Door Chandler & Scott (1991) wordt een sedimenttest met twee soorten benthische harpactoïde copepoden beschreven, die zeer sterk lijkt op de hierboven beschreven test uit Chandler (1990). In tegenstelling tot de testmethode uit Chandler (1990) worden nu 75 niet bevruchte vrouwtjes en 30 mannetjes (*Pseudobradia pulchella*) of 35 niet bevruchte maar spermatofoor-dragende vrouwtjes (*Nannopus palustris*) per bakje ingezet. Er wordt niet vermeld of de copepoden worden gevoerd. Na 7 dagen worden het aantal levende dan wel dode copepoden geteld, waarbij tevens bekeken wordt op de levende copepoden al dan niet zijn bevrucht. Verder wordt opgemerkt dat in de test met *N. palustris* géén reproductie werd waargenomen, ook niet in de controle. Dit heeft wellicht te maken met de gekozen proefopzet, waarbij de test niet is gestart met zwangere maar met spermatofoor dragende vrouwtjes. Dit zou in de toekomst nader onderzocht kunnen worden.

Populatiegroei van de nematoden *Chromadorina germanica* en *Diplolaimella punicea*

In deze door Tietjen & Lee (1984) beschreven test worden twee soorten vrijlevende nematoden, *Chromadorina germanica* en *Diplolaimella punicea* gebruikt. De levensgeschiedenis en de voedingsgewoonten van deze soorten zijn bekend. De soort *Diplolaimella punicea* heeft een hogere groeipotentie dan de soort *Chromadorina germanica*.

De nematoden worden twee weken in driefoud geïncubeerd bij 25°C in een statisch sediment-water systeem met een verhouding 1:1 of 10:1 (v/v water-sediment). Ze worden gevoerd met bacteriën. Aan het einde van de test worden de monsters gefixeerd en gekleurd met een 5% formaline oplossing waaraan bengalsroze is toegevoegd. Hierna kunnen de monsters bewaard worden of direct geteld worden. Met behulp van het aantal nematoden wordt de intrinsieke populatiegroeisnelheid berekend, dat wil zeggen de dagelijkse toename in het aantal nematoden.

Tietjen & Lee (1984) concluderen dat het sediment zelf geen invloed lijkt te hebben op de prestaties in de bioassays, omdat het effect niet afhankelijk is van de aan- of afwezigheid van sediment en van het verdunningsmedium (water of zand).

Er zijn nog enkele andere onderzoekers die reproductietesten met nematoden uitvoeren.

Vranken & Heip (1986) beschrijven bijvoorbeeld een reproductietest met een *Diplolaimella* spec. in zeewater, waarbij ze concluderen dat de reproductie significant negatief beïnvloed wordt bij koperconcentraties zoals die in sommige delen van de Noordzee worden gevonden. Verder wordt er bij diverse instellingen binnen Europa, voornamelijk in Duitsland maar ook bij AquaSense, momenteel gewerkt aan een reproductietest in sediment met de nematode *Caenorhabditis elegans*. Alhoewel de ervaring met deze nematode in Nederland tot nu toe vrij beperkt is, zeker voor het testen van veldmonsters, maakt de mogelijke toepassing in brak water gebieden (tot mogelijk 20%, mondelijke mededeling mevr. Heise, TU Technologie, Hamburg) deze soort ook voor het RIKZ interessant.

3.2. Larvale groeitesten

In vrijwel alle larvale groeitesten wordt naast de groei ook eventuele sterfte als parameter meegenomen.

Groei van de polychaet *Armandia brevis*

Deze 42-daagse groeitest wordt beschreven in Meadow & Rice (2001). In de test worden juveniele wormen blootgesteld in een statisch sediment-water systeem (verhouding 1:9 v/v). Na 21 dagen wordt de overleving en het gewicht van de wormen per replica bepaald, wordt een nieuw sediment-water systeem gemaakt en worden de wormen nogmaals 21 dagen blootgesteld. Na in totaal 42 dagen wordt opnieuw de overleving en het gewicht bepaald. Uit de gegevens wordt tevens de groeisnelheid bepaald. Meadow & Rice (2001) onderzochten de toxiciteit van TBT voor *Armandia brevis*. Uit eerdere studies was gebleken dat deze soort op TBT reageert door uit het sediment te kruipen en zich, alvorens te sterven, ongeveer twee dagen op het oppervlak bevindt. Daarom werd aanvullend elke dag het aantal aan de oppervlakte zichtbare wormen geteld en de sterfte van deze wormen gescoord.

Armandia brevis heeft volgens Meadow & Rice (2001) een aantal eigenschappen die de polychaet geschikt maakt voor het testen van sedimenten. De soort neemt niet selectief sediment in, hoeft gedurende de test niet gevoerd te worden, wordt tevens blootgesteld aan poriewater en heeft een relatief lage metabolische activiteit van milieuvreemde stoffen. Een groot aantal studies hebben sterke en consistente relaties aangetoond tussen verontreinigingen in sediment en (sub)lethale effecten (Meadow & Rice, 2001 en diverse referenties daarin).

Groei van de polychaet *Nereis (Neanthes) arenaceodentata*

Er zijn diverse onderzoekers die sedimenttesten beschrijven, waarin de overleving en groei van de polychaet *Nereis (Neanthes) arenaceodentata* wordt bepaald, waaronder Reish & LeMay (1988), Johns *et al.* (1991) en Dillon *et al.* (1993). Deze testmethoden zijn geïntegreerd in de ASTM richtlijn E1611 (1999). Onderstaande beschrijving gaat uit van deze ASTM-richtlijn.

Deze test maakt gebruik van hetzelfde testorganisme als in de gedeeltelijke life-cycle test, die door Pesch *et al.* (1991) wordt beschreven (zie hierboven), maar de testopzet is eenvoudiger en het aantal bepaalde parameters beperkter. De testmethode kan ook met andere soorten polychaeten worden uitgevoerd, bijvoorbeeld met *Nereis virens* of *Capitella capitata* (ASTM, 1999) maar omdat deze soorten verschillen in grootte kan het noodzakelijk zijn de grootte van het testvat, de hoeveelheid sediment, de testtemperatuur, de saliniteit en dergelijke aan te passen. Naast de hierboven genoemde testen met *Nereis c.q. Neanthes* soorten worden ook min of meer vergelijkbare testen met enkele andere soorten beschreven.

De testopzet uit de ASTM-richtlijn betreft een 20 tot 28 daagse semi-statische test. In een sediment-watersysteem met 2 tot 3 cm sediment worden in vijfvoud vijf juveniele wormen (2 tot 3 weken post-emergence) bij 20°C geplaatst. Voorafgaand aan de test wordt van een subsample het begingewicht van de wormen bepaald. Tijdens de test wordt periodiek water verversd en worden de wormen eens per week gevoerd met 1,5 tot 2,5g voer, bijvoorbeeld Tetramin en/of alfalfa. Na 20 tot 28 dagen wordt de overleving en het drooggewicht van de wormen bepaald. De groei wordt uitgedrukt als groeisnelheid, dat wil zeggen toename in drooggewicht per dag. In de test wordt ter controle een referentiesediment meegenomen, waarin de gemiddelde overleving >90% moet zijn en in de individuele replica's >80%. Er zijn een groot aantal stoffen als referentiestof mogelijk. Ook bestaat er een grote database met toxiciteitsgegevens voor dit organisme. Volgens de ASTM (1999) is de soort gevoelig in zowel aquatische testen als sedimenttesten. Dit wordt tegengesproken door Plesch *et al.* (1991) en Anderson *et al.* (1998), hoewel dit volgens Anderson *et al.* (1998) vooral een gevolg is van het testdesign en de daarmee samenhangende statistische power. In aanvulling op deze algemene richtlijn is er veel, meer specifieke literatuur voorhanden over deze test. Zo is er door Dillon *et al.* (1993) onder andere gekeken naar de invloed van dichtheid (aantal wormen per pot), deeltjesgrootte, saliniteit, ammoniumgehalte en waterstofsulfidegehalte. Ook de leeftijd van de gebruikte wormen (0-6 weken), de blootstellingsduur (3-12 weken) en het aantal testorganismen en replica's verschilden per experiment. De overleving van de wormen blijkt binnen een grote range van deeltjesgroottes (5-100% zand) niet te worden beïnvloed. Ook de groei wordt niet significant beïnvloed door de deeltjesgrootte. Er is echter wel een

duidelijke trend waarneembaar, waarbij de groei bij langere blootstellingsduur (vanaf zes weken na 'emergence') afneemt met toenemende deeltjesgrootte. Het effect van de saliniteit is door Dillon et al. (1993) onderzocht door de wormen zonder acclimatisatie over te zetten vanuit 30 promille naar een andere saliniteit. Tot 20 promille werd geen effect op overleving of groei waargenomen. Bij de daarop volgende geteste saliniteit van 15 promille (en lager) gaan de wormen dood. Onduidelijk is of de wormen bij acclimatisatie wel tegen lagere saliniteit kunnen. Dit is in tegenspraak met ASTM E1611 (1999), waarin staat dat de soort een ondergrens voor saliniteit heeft van 28 promille. Ammonium beïnvloedt de overleving en de groei van de wormen reeds bij 0,68 mg NH₃/l licht, maar nog niet significant.

Kolonisatie en larvale groei van de polychaet *Streblospio benedicti*

In Chandler & Scott (1991) wordt een sedimenttest met larven van de kosmopolitische, euryhaline polychaet, *Streblospio benedicti* beschreven. Deze soort is een facultatieve oppervlakte deposit feeder. Deze test wordt uitgevoerd in een 4x4 multiwell plaat met in elke well 3 gram nat sediment. De monsters inclusief een controle worden ad random verdeeld over de multiwell plaat. Elke plaat wordt omgeven met glas en bedekt met 500 ml steriel zeewater. In de waterkolom worden *Streblospio* larven uit het laatste planktonische stadium losgelaten, die 24 uur de kans krijgen om de sedimenten te koloniseren. Hierna worden de larven die in de waterkolom zijn achtergebleven verwijderd. Gedurende de test kunnen de larven zich vrij verplaatsen van de ene naar de andere well. In deze test wordt daarmee niet alleen de mate van kolonisatie maar tevens eventueel vermijdingsgedrag bepaald. Na 7 dagen wordt het aantal larven per well alsmede hun lengte bepaald. Het is niet duidelijk of de wormen tijdens de test worden gevoerd. Wel wordt in Chandler & Scott (1991) melding gemaakt van verminderde foerageeractiviteit onder invloed van endosulfan, gebaseerd op waarnemingen aan het aantal uitgescheiden faeces hoopjes. De testsoort is onder andere bekend uit South Carolina maar ook uit het Noordzeekanaal en kan daar zeer hoge dichtheden bereiken. De soort kan bijna volledige zuurstofloosheid doorstaan en een grote range in saliniteit, van zoet water tot boven de 40 promille.

Activiteit en groei van de polychaete borstelworm *Arenicola marina*

Een nog niet gepubliceerde, maar mogelijk wel interessante test is een 50-daagse test met de worm *Arenicola marina*. De test is enkele malen uitgevoerd bij het CEFAS in Engeland (mond. Mededeling Y. Allen). Alhoewel de ervaringen hiermee vooralsnog redelijk zijn, is de ervaring te beperkt om over een goed ontwikkelde test te spreken. In de test wordt de excretiesnelheid en de overleving van de wormen bepaald. Hoewel de groei van de wormen nog niet in de huidige opzet is opgenomen, kan deze eenvoudig worden meegenomen. Daarnaast biedt de test mogelijkheden om ook de parameter bioaccumulatie te incorporeren.

De worm *Arenicola marina* wordt veelvuldig in ecotoxicologisch onderzoek gebruikt, waardoor er veel ervaring en kennis beschikbaar is. Dit betreft echter veelal een 10-daagse test. Ten opzichte van deze 10-daagse test wordt de 50-daagse test vooral gekenmerkt door een vergroting van de testsystemen. Door te kiezen voor een blootstelsysteem van 5 wormen in 4 kg sediment, is er voldoende voedsel voor de wormen beschikbaar. Hierdoor zijn de overleving en activiteit gedurende de testperiode voldoende gewaarborgd. Verder wordt de test semi-statisch uitgevoerd, waarbij elke week circa 80%

van het bovenstaand water (een laag van 4 cm) wordt vervangen. Als gevolg van de grote hoeveelheid sediment, kunnen al snel problemen met de zuurstofvoorziening ontstaan. Om dit te voorkomen worden de testen permanent belucht. De controle sterfte in referentie sediment is normaliter kleiner dan 10%.

Groeitest met de amphipode *Grandidiella japonica*

In Nipper *et al.* (1989) wordt een groeitest met de amphipode *Grandidiella japonica* beschreven. In deze test worden juveniele amphipoden gedurende 28 dagen bij 19°C blootgesteld in een doorstroom sediment-water systeem. Dit systeem bestaat uit 1 liter bekers met een 2 cm dikke laag sediment en 700 ml bovenstaand zeewater. De test wordt in drievoud uitgevoerd met 15 juveniele (<48u oude) amphipoden per replica. Voorafgaand aan de test wordt de lengte gemeten. Wekelijks worden de amphipoden gevoerd met visvoer (Tetramin). Aan het einde van de test wordt de overleving en de lengte bepaald.

In hetzelfde artikel (Nipper *et al.*, 1989) wordt tevens een 10-daagse acute test beschreven, waarin aan het einde van de test behalve naar overleving ook naar de ingraafoactiviteit wordt gekeken als maat voor de conditie. Deze ingraafoactiviteit wordt gedefinieerd als het aantal amphipoden dat zich binnen een uur ingraaft en kan op eenvoudige wijze ook bij de chronische test ingebouwd worden. Indien de testduur van de chronische test iets wordt verlengd kan volgens Nipper *et al.* (1989) tevens naar aanvullende reproductieparameters gekeken worden, zoals de aanwezigheid en het aantal eieren in vrouwtjes. Bij 19°C is de generatietijd van *G. japonica* 30 dagen. Aangezien deze testprocedure nog niet is uitgetoetst is de test vooralsnog onder de groeitesten opgenomen.

De testsoort komt algemeen voor in kusthabitats in zuid California, VS. De soort is daar geïntroduceerd van elders en komt van oorsprong uit Japan. De soort komt voor in een groot aantal sedimenttypen. De overleving en de ingraafoactiviteit worden niet beïnvloed door de korrelgrootteverdeling van het sediment. De groei wordt echter wel degelijk beïnvloed met een beduidend lagere groei in fijne sedimenten. Het effect van fijne sedimenten op de groei is mogelijk afhankelijk van de grootte van de gebruikte testorganismen, waarbij het effect af lijkt te nemen als met grotere testorganismen wordt gestart. Dit is echter nog onvoldoende onderzocht.

Groei van de zee-egel *Dendraster excentricus*

Dendraster excentricus is een platte zee-egel, die onder andere aan de oostkust van Amerika heel talrijk is. Opmerkelijk is dat hij niet plat op de bodem ligt maar half ingegraven in het zand staat, alsof je een muntje in het zand steekt. In de Noordzee komen ze niet voor.

In de bioassay, beschreven door Casillas *et al.* (1992), worden zee-egels gedurende 28 dagen blootgesteld aan een sediment-watersysteem, dat doorstroomd wordt met zeewater. De test wordt uitgevoerd in twee- tot vijfvoud met 20 juveniele zee-egels per replica. Hoewel niet expliciet vermeld doet de context vermoeden dat de zee-egels tijdens de test ad libitum worden gevoerd met visvoer. Dagelijks wordt de mortaliteit gescoord. Aan het begin en aan het einde van de test wordt de lengte van de organismen gemeten. Aan het eind wordt tevens het natgewicht bepaald alsmede het totale DNA- en het eiwitgehalte, als biochemische

maat voor de groei. Deze resultaten worden in een eiwit:DNA ratio uitgedrukt, hetgeen een maat is voor DNA-gestuurde groei-activiteit.

De zee-egels bestaan voornamelijk uit een uitwendig kalkrijk skelet, bedekt door een dun laagje huid. Dit kalkrijke skelet vormt de basis voor de lengte meting en bepaald voor >90% het gewicht. De gemeten biochemische parameters, DNA- en eiwitgehalte, zijn een maat voor het aantal cellen, van met name de zachte lichaamsdelen. In de door Casillas et al. (1992) onderzochte sedimenten bleken beide methoden van groeimeting echter even gevoelig te reageren.

Chronische test met de 'red brittlestar' *Amphiodia urtica*

Door de Southern California Coastal Water Research Project Authority (SCCWRP), een overheidsinstelling voor marine milieu-onderzoek, is vrij veel onderzoek uitgevoerd naar de 'red brittlestar' *Amphiodia urtica*. Onderzoek van de SCCWRP wordt gepubliceerd in jaarverslagen, die op internet beschikbaar zijn (www.sccwrp.org). Het betreft onder andere onderzoek naar in het veld verzamelde brittlestars. Hierbij zijn bijvoorbeeld reproductieparameters (o.a. grootte van de oocyten in de gonaden van vrouwtjes) bepaald (SCCWRP, 1994a,b zijnde: Schiff & Bergen, 1994; Thompson & Bergen, 1994).

Bay & Greenstein (SCCWRP, 1994c) tonen aan dat het goed mogelijk is de soort gedurende langere tijd in het laboratorium te houden. Zij beschrijven ook een groeitest met *Amphiodia urtica*. In deze test worden de brittlestars in een doorstroom sediment-water systeem met 2 cm sediment en 700 ml zeewater gedurende 28 dagen blootgesteld. Per monster zijn 8 replica's met elk 5 dieren, waarvan er 4 gebruikt worden voor het meten van de breedte van de mond en 4 voor het bepalen van de arm regeneratie. Beide parameters zijn een maat voor de groei. Voor het bepalen van de arm regeneratie wordt aan het begin van de bioassay bij elke zeester een van de armen afgesneden bij het 10^e segment. Tevens wordt de overleving bepaald.

In SCCWRP (1994c) wordt geconcludeerd dat de mondbreedte de meest gevoelige parameter is, maar tevens de parameter met de grootste spreiding (CV 55%). Deze spreiding kan mogelijk gereduceerd worden door nauwkeuriger (onder een microscoop) te meten (SCCWRP, 1994c). De arm regeneratie is minder gevoelig maar wel nauwkeuriger (CV 9%). De groei van *Amphiodia urtica* blijkt in vergelijking met groeitesten met andere soorten maar dezelfde sedimenten een van de gevoeligste bepalingen te zijn.

Chronische test met de zeester *Lytechinus pictus*

De zeester *Lytechinus pictus* is de meest voorkomende megafaunasoort in onvervuilde zandbanken langs het vasteland van zuid Californië, VS. Ze komen meestal voor in grote groepen van wel honderden m². Ze bewonen een groot aantal verschillende sedimenttypen, van rotsachtige lagen, tot zand en fijne ziltige klei. Ze eten voornamelijk sediment (tot 85 vol.% van de darminhoud), maar ook vele verschillende organische delen, ongewervelden, larven, kelp bedden of zelfs andere zeesterren. In verontreinigde sedimenten nabij rioollozingen worden ze niet aangetroffen. Thompson *et al.* (1991) toonden aan dat de aanwezigheid van waterstofsulfide hierbij mogelijk (mede) een rol speelt.

In de test worden volwassen zeesterren gedurende 49 dagen in een doorstroomsysteem blootgesteld aan sediment (Thompson *et al.*, 1991). De test wordt uitgevoerd in drievoud met 15 zeesterren per bak. De bakken zijn vermoedelijk 24 bij 15,5 cm en bevatten circa 4 cm sediment. Door de bak stroomt circa 18 ml zeewater / min, waarbij het waterniveau zo is ingesteld dat de zeesterren met 1,5 tot 2 cm water wordt bedekt. Dit bevordert het contact met het sediment. Uit Thompson *et al.* (1991) wordt niet duidelijk of de zeesterren gedurende de test worden gevoerd. Ook is niet duidelijk bij welke temperatuur ze worden blootgesteld. Acclimatisatie vindt plaats bij 15°C. Tijdens de test worden de volgende parameters bepaald:

- Vermijdingsgedrag (dagelijks). Zeesterren proberen blootstelling te voorkomen door aan de zijkant van het aquarium te gaan zitten;
- Sterfte (na 49 dagen);
- Conditie. Gezonde zeesterren kunnen zich binnen een minuut omdraaien. Na 49 dagen wordt de tijd die de zeesterren nodig hebben om zich omdraaien bepaald, met een maximale waarnemingstijd van 5 minuten;
- Groei. Aan het begin en het einde van de test wordt de diameter en het natgewicht van de zeesterren bepaald;
- Gonadeproductie in zowel mannetjes (testis) als vrouwtjes (ovarium). Aan het begin wordt bij een representatieve steekproef van 15 dieren het natgewicht van de gonaden bepaald. Na 49 dagen wordt bij alle overlevende zeesterren het natgewicht van de gonaden bepaald. Overige reproductieparameters, zoals de grootte van de eieren, het aantal eieren en de rijping wordt niet meegenomen in deze test (maar hier zijn waarschijnlijk wel mogelijkheden voor).

Een min of meer vergelijkbare test wordt beschreven door Thompson *et al.* (1989), met het verschil dat de test 60 dagen duurde bij een testtemperatuur van zo'n 12°C. Tijdens deze test worden de zeesterren om de andere dag gevoerd met Tetramin (visvoer). In deze test werd het gedrag en de conditie van de zeesterren niet gemeten, maar werd de bioaccumulatie van stoffen in de zeesterren bepaald.

Groeitest met het schelpdier *Mulinia lateralis*

In deze 7-daagse test, beschreven door Burgess & Morrison (1994), worden juveniele bivalven *Mulinia lateralis* blootgesteld in een sediment-watersysteem bestaande uit 1 cm sediment en 100 ml water met een saliniteit van 30‰. Er zijn twee testopzetten. De een is statisch. Bij de andere opzet wordt het bovenstaande water dagelijks geheel verversd. In beide gevallen worden de bivalven dagelijks gevoerd met fytoplankton. Na 7 dagen wordt de overleving en de groei op basis van drooggewicht bepaald. De groei in het referentiesediment is acceptabel als deze 2 tot 3 keer het begingewicht is.

Met deze proefopzet werden 65 verontreinigde sedimenten getest. De soort blijkt erg gevoelig voor metaalverontreinigingen, maar vrij ongevoelig voor organische pesticiden.

De soort is een kleine opportunistische tweekleppige, die onder andere in slibrijke sedimenten voorkomt. De reproductie wordt niet beïnvloed bij een saliniteit van 7 tot >32‰. De soort komt voor in zowel zandige als slibrijke sedimenten en kan eenvoudig gekweekt worden in het laboratorium. De korrelgrootte lijkt geen effect op de groei te hebben.

Groeitest met het schelpdier *Mercenaria mercenaria*

Deze 7-daagse test, beschreven door Ringwood & Keppler (2002), lijkt sterk op de bovenbeschreven test met *Mulinia lateralis*. In de test

worden juveniele *Mercenaria mercenaria* blootgesteld in een sediment-watersysteem bestaande uit 50 ml sediment en 150 ml zeewater met een saliniteit van 25‰. Op dag 1, 3 en 6 worden de larven gevoerd met twee soorten fytoplankton. Na 7 dagen wordt de overleving en de groei (versgewicht en drooggewicht) bepaald. Uit het drooggewicht wordt de groeisnelheid bepaald.

Deze bioassay heeft een aantal voordelen, die het tot een geschikte test maken (Ringwood & Keppler, 2002). Omdat de tweekleppigen snel groeien kan de testduur kort blijven. Ze kunnen eenvoudig gekweekt worden en hebben weinig testvolume nodig, zodat het benodigde monstermateriaal beperkt blijft. De tweekleppigen kruipen door het sediment en voeden zich op de grens van sediment en water. Experimenten met sedimenten van meer dan 150 lokaties laten zien dat de bioassay gevoeliger reageert dan een 10-daagse acute bioassay met twee amphipodensoorten. De test is toepasbaar met zowel zandige als slibrijke sedimenten. Ringwood & Keppler (2002) geven aan dat de groei positief wordt beïnvloed door toenemende saliniteit en pH en in mindere mate door het zuurstofgehalte. De korrelgrootte en het organisch stof gehalte hebben (binnen de geteste range) geen invloed. Voorts treedt bij ammoniagehalten boven de 16 mg/l sterfte op (Ringwood & Keppler, 2002). Ringwood & Keppler (2002) voerden een vergelijkend veld- en laboratoriumonderzoek uit op 13 verontreinigde lokaties. In het veld werden de tweekleppigen in het veld uitgehangen. Over het algemeen werden negatieve effecten op de groei van de tweekleppigen in het veld eerder waargenomen dan in het laboratorium.

Overlevings- en groeitest met de mossel *Scrobicularia plana*

In deze test, beschreven door Ruiz *et al.* (1994), worden mosselen gedurende 36 dagen onder continue beluchting in een sediment-watersysteem blootgesteld. De verhouding water:sediment is 6:1, dat wil zeggen ca. 1 cm sediment, met een totaal volume van 240ml. Het bovenstaande water bestaat uit gefiltreerd zeewater met een saliniteit van 24‰. Om de drie dagen wordt een derde van de bovenstaande vloeistof verversed en wordt gevoerd met flagellaten. De test wordt uitgevoerd in duplo, waarbij aan het begin en elke 6^e dag de overleving en de graafactiviteit wordt onderzocht. Dit gebeurt door gedurende 1 uur op verschillende intervallen het aantal mosselen, dat niet volledig is ingraven, te tellen. Elke 6^e dag worden de mosselen uit het sediment gespoeld, wordt het aantal dode mosselen bepaald en worden de overlevenden overgezet in een nieuw sediment-watersysteem, waarbij wederom de graafactiviteit wordt bepaald. Op dag 36 wordt tevens de groei (gewicht en lengte) bepaald.

De testorganismen zijn deposit feeders, die in het veld verzameld worden. Hierdoor wordt het seizoen waarin testen kunnen worden uitgevoerd beperkt, vooral in Noordelijke gebieden waar de soort maar één keer per jaar reproduceert. De testorganismen zijn wel eenvoudig in het laboratorium te houden. Wellicht dat bovengenoemde beperking opgelost kan worden door de mosselen te kweken.

4. Bodemdieren in de Noordzee en kustzone

Bij het ontwikkelen en toepassen van bioassays wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van inheemse dieren, die een belangrijke schakel in de benthische voedselketens vormen. De term 'belangrijk' kan op meerdere manieren beoordeeld worden. Als eerste is gekeken naar aantallen en biomassa van de benthische macrofauna. In § 4.1. wordt hiertoe een korte karakterschets gegeven van de benthische macrofauna in een aantal typische brakke en mariene ecotopen in Nederland. Een andere insteek is om te kijken naar de manier waarop de dieren worden blootgesteld. Benthische detritivoren hebben daarbij de voorkeur boven benthische omni- of carnivoren, doordat de blootstelling aan (verontreinigd) sediment intensiever is. Aanvullend kan een experiment met bijvoorbeeld carnivoren een duidelijke meerwaarde hebben, als de risico's op doorvergiftiging in de voedselketens onderzocht dienen te worden. In § 4.2 wordt een overzicht gegeven van brakke en mariene benthische detritivoren. Naast de reeds genoemde macrofauna gaat hierbij ook aandacht uit naar de meiofauna. Meiofauna heeft over het algemeen een kortere generatietijd in vergelijking tot macrofauna (waardoor de mogelijkheden voor reproductie testen groter worden). Aan de andere kant levert het kleine formaat van deze dieren praktische problemen op zodra er veldsedimenten getest moeten worden, waar deze dieren van nature in voorkomen.

4.1 Macrofauna in de Noordzee en de kustzone

Allereerst moet opgemerkt worden dat de samenstelling van het bodemleven in de Noordzee en kustgebieden sterk samenhangt met factoren als sedimentsamenstelling, zoutgehalte en waterdiepte. Ook factoren als temperatuur, golfwerking en broedval beïnvloeden de aanwezigheid van soorten sterk. Afhankelijk van het detailniveau waarop gekeken wordt kan daarom een veelheid aan ecotopen, met elk een eigen specifieke samenstelling van het bodemleven, worden onderscheiden. De huidige paragraaf is echter vooral bedoeld om op hoofdlijnen de duidelijkste verschillen en kenmerkende soorten weer te geven. Er is daarom gekozen voor een onderscheid in 4 ecotopen met elk een verschillende opbouw van de bodemdieren populatie. Voor de Noordzee betreft dit een onderscheid tussen het Nederlandse Continentale Plat (NCP; > 20 m diep) en de kustzone (tussen 0 en 20 m diep), terwijl het voor de kustgebieden vooral gaat om een onderscheid tussen de sublitorale delen (altijd onder water) en litorale delen (droogvallend bij laagwater).

A. Nederlandse Continentale Plat (> 20 m diep)

In het algemeen geldt de stelregel dat naar mate men zich verder van de kust begeeft des te groter het aandeel stekelhuidigen in het bodemleven is (zie ook figuur 1). Ver van de kust domineren stekelhuidigen op basis van zowel hun biomassa en de aantallen. Het gaat daarbij vooral om de stekelhuidige *Amphiura filiformis* (Draadarmige slangster), die ten noorden van het Friese Front hoge

dichtheden bereikt. Naast de stekelhuidigen kunnen ook wormen, kreeftachtigen en/of mollusken in het diepe deel van de Noordzee lokaal een belangrijk aandeel in de biomassa en aantallen vormen. Van de polychaete wormen zijn hier voornamelijk *Glycera rouxi* (op Oestergronden), *Chaetopterus variopedatus* (in het noordelijke deel van het NCP) en *Pholoe minuta* aanwezig. Van de kreeftachtigen komen vooral *Callianassa subterranea* en *Harpina antennaria* voor, terwijl ook de mollusk *Mysella bidentata* (Tweetandschelp) veelvuldig wordt aangetroffen op de Noordzeebodem (Heinis *et al.*, 1995; Holtmann *et al.*, 1996). Een globaal overzicht van aantallen en biomassa's, waarin de betreffende soorten worden aangetroffen is weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1

Dichtheden en biomassa van de meest voorkomende soorten bodemdieren in de diepere delen van de Noordzee.

Groep	Soort	Aantallen (ind./m ²)	Biomassa (g AFDW/m ²)
Stekelhuidigen	<i>Amphiura filiformis</i>	>1.000	>7
Mollusken	<i>Mysella bidentata</i>	> 250	>0.1
Wormen	<i>Glycera rouxi</i>	tot 300	tot 20
	<i>Chaetopterus variopedatus</i>	> 50	> 8
	<i>Pholoe minuta</i>	ca. 100	ca. 4
Kreeftachtigen	<i>Callianassa subterranea</i>	> 100	> 4
	<i>Harpina antennaria</i>	> 60	> 0.02

B. Kustzone Noordzee (<20 m diep)

De benthische macrofauna in de kustzone van de Noordzee wordt zowel op basis van de biomassa (Heinis *et al.*, 1995) als op basis van aantallen (Holtmann *et al.*, 1996) gedomineerd door mollusken en wormen (voornamelijk Polychaeta; zie figuur 1). Ook kreeftachtigen kunnen lokaal, in de ondiepe kustzone, goed vertegenwoordigd zijn. De belangrijkste mollusken zijn *Spisula subtruncata* (Halfgeknotte strandschelp) en *Ensis directus* (Amerikaanse zwaardschede), terwijl ook *Macoma balthica* (Nonnetje) en *Tellina fabula* (Rechtsgestreepte platschelp) belangrijke soorten zijn. De belangrijkste wormen in de kustzone zijn vooral *Sphiophanes bombyx* en *Magelona papillicornis* en in mindere mate *Nephtys cirrosa* en *Scoloplos armiger* (Wapenworm). Van de kreeftachtigen zijn *Corophium volutator* (Slijkgarnaal) en *Urothoe poseidonis* (Buldozerkreeftje) veel voorkomende soorten in de ondiepe kustzone. Een globaal overzicht van aantallen en biomassa's waarin de betreffende soorten worden aangetroffen is weergegeven in tabel 4.2.

Tabel 4.2

Dichtheden en biomassa van de meest voorkomende soorten bodemdieren in de kustzone van de Noordzee.

Groep	Soort	Aantallen (ind./m ²)	Biomassa (g AFDW/m ²)
Mollusken	<i>Spisula subtruncata</i>	300 – 6.000	20 – 350
	<i>Ensis directus</i>		
	<i>Macoma balthica</i>	200 – 2.000	12 – 35
	<i>Tellina fabula</i>	60 – 1.000	00.6 – 18
Wormen	<i>Sphiophanes bombyx</i>	100 – 30.000	0.05 – 10
	<i>Magelona papillicornis</i>	100 – 10.000	0.3 – 36
	<i>Nephtys cirrosa</i>	60 – 350	00.2 – 2.4
	<i>Scoloplos armiger</i>	40 – 1.000	00.1 – 3.4
Kreeftachtigen	<i>Corophium volutator</i>	tot 200	
	<i>Urothoe poseidonis</i>	100 – 4.500	0.04 – 0.86

C. Kustgebieden (Waddenzee en Delta)

De bodemfauna in de kustgebieden wordt in de Delta en de Westelijke Waddenzee sterk gedomineerd door mollusken (zie figuur 1). In de Oostelijke Waddenzee domineren daarentegen veelal de wormen. Opvallend is verder dat in de Westerschelde de litorale delen hogere biomassa's vertonen dan de sublitorale delen, terwijl dit in de Oosterschelde meestal andersom is. In de Waddenzee wordt geen groot verschil aangetroffen tussen de biomassa's in de sublitorale en litorale delen (Heinis *et al.*, 1995).

De belangrijkste mollusken in de kustgebieden zijn *Macoma balthica* (Nonnetje), *Cerastoderma edule* (Kokkel), *Mytilus edulis* (Mossel), *Mya arenaria* (Strandgaper) en *Hydrobia ulvae* (Wadslakje), terwijl ook *Tellina tenuis* (Tere platschelp) regelmatig aangetroffen kan worden. De belangrijkste wormen zijn *Heteromastus filiformis* (Draadworm), *Marenzelleria wireni/virens* (Groenworm), *Pygospio elegans* (Zandkokerworm), *Arenicola marina* (Zeepier), *Nephtys hombergii* (Zandzager), *Capitella capitata* (Slangpier), *Paraonis fulgens* (Kurkentrekkerworm), *Eteone longa* (Groengele wadworm), *Nereis diversicolor* (Zeeduizendpoot) en *Scoloplos armiger* (Wapenworm). Ook de kreeftachtigen *Bathyporeia pilosa* (Kniksprietkreeft), *Corophium volutator* (Slijkgarnaal) en *Corophium arenarium* (Slijkgarnaal) kunnen veelvuldig worden aangetroffen (zie o.a. Dekker, 1992; 1995; 1998; 2000; Dekker & de Bruin, 1999; Essink, 1989). Een globaal overzicht van aantallen en biomassa's waarin de betreffende soorten kunnen worden aangetroffen is weergegeven in tabel 4.3.

Tabel 4.3

Dichtheden en biomassa van enkele van de meest voorkomende soorten bodemdieren in de kustgebieden (Delta en Waddenzee).

Groep	Soort	Aantallen (ind./m ²)	Biomassa (g AFDW/m ²)
Mollusken	<i>Macoma balthica</i>	tot 10	tot 4
	<i>Cerastoderma edule</i>		tot 45
	<i>Mytilus edulis</i>		tot 50
	<i>Mya arenaria</i>		tot 50
	<i>Hydrobia ulvae</i>	tot 1.500	tot 100
	<i>Tellina tenuis</i>	5 – 25	
Wormen	<i>Heteromastus filiformis</i>		tot 10
	<i>Marenzelleria wireni/virens</i>	tot > 10.000	tot > 10
	<i>Pygospio elegans</i>		
	<i>Arenicola marina</i>		tot 10
	<i>Nephtys hombergii</i>		tot 1
	<i>Capitella capitata</i>		tot 0.5
	<i>Paraonis fulgens</i>		
	<i>Eteone longa</i>	tot 300	tot 1.5
	<i>Nereis diversicolor</i>		2 – 6
	<i>Scoloplos armiger</i>	tot > 10.000	tot > 10
Kreeftachtigen	<i>Corophium volutator</i>		tot 8
	<i>Corophium arenarium</i>	tot 80	
	<i>Bathyporeia pilosa</i>		

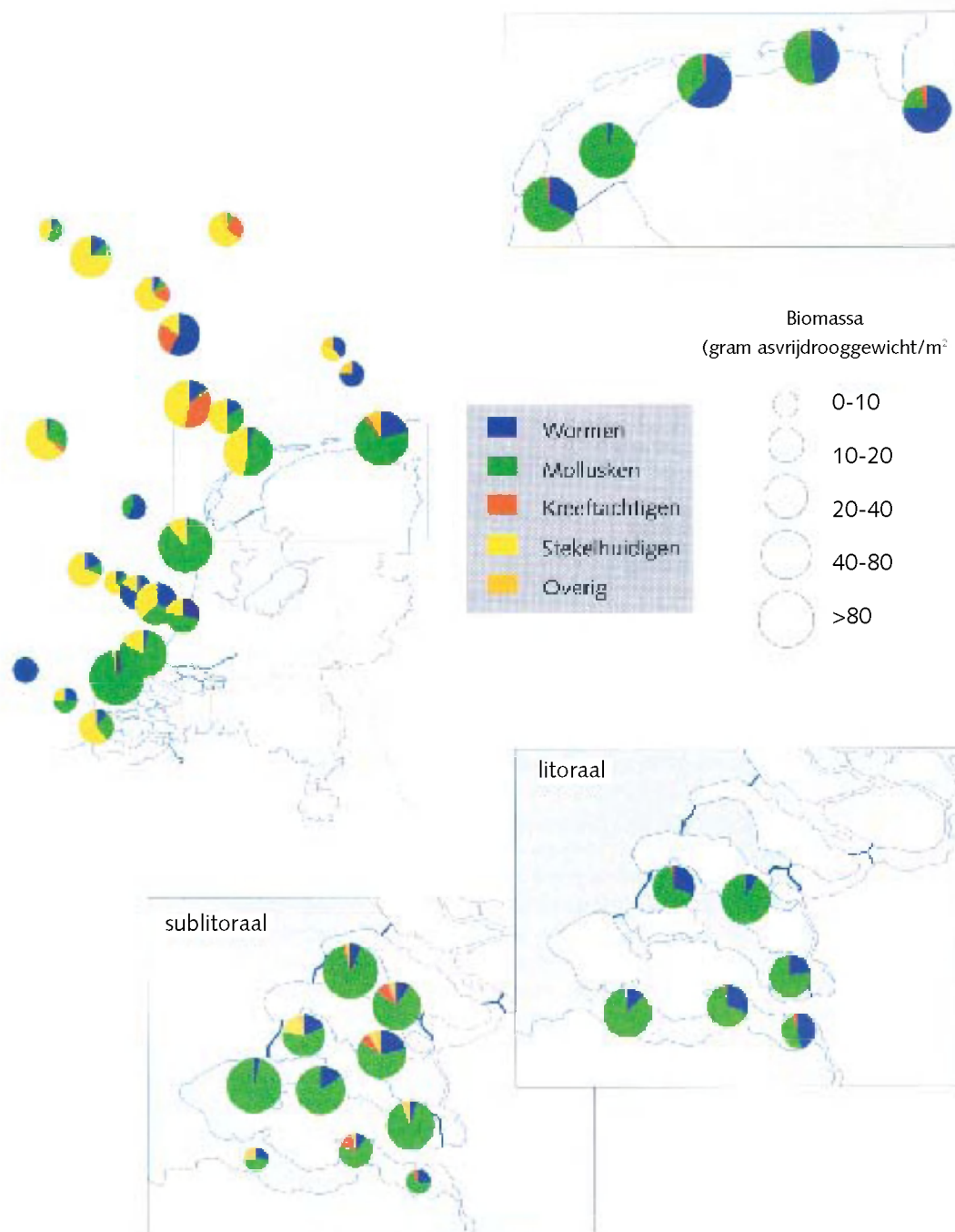
4.2 Detritivore fauna in brakke en mariene sedimenten

In aanvulling op bovenstaand overzicht van de dominante macrofauna groepen, is binnen de sedimentbewonende fauna specifiek gezocht naar soorten, die mogelijk geschikt zijn om op termijn toegepast te worden in bioassays. Deze selectie is daarmee strikt gebaseerd op de ecologie van de betreffende soort, daar het veelal dieren zijn die niet eerder in

ecotoxicologisch onderzoek zijn toegepast. Hierbij zijn de volgende criteria gebruikt:

- Algemene verspreiding in de zuidelijke Noordzee en relatief belangrijk op basis van dichtheden, biomassa of productie. Verspreiding in het hele Noordzeegebied en aangrenzende zeeën is gewenst (OSPAR!).
- De soort moet niet alleen het sediment bewonen maar ook een detritivore levenswijze hebben.
- Bij voorkeur representeren de soorten tezamen de voor de Noordzee belangrijke taxonomische groepen zoals tweekleppigen, borstelwormen, stekelhuidige en kreeftachtige.
- Om de bioassay breed toepasbaar te maken moet de soort liefst voor kunnen komen in zowel zandige als slibrijke bodems. De fauna, die het harde substraat bewoont, is bij voorbaat minder geschikt.

Figuur 1.
Overzicht van de verdeling van de biomassa bodemdieren in de Noordzee en kustgebieden (Heinis *et al.*, 1995)



- e) De dieren moeten vrij snel groeien, waardoor de groei in het laboratorium in een acceptabele tijd is vast te stellen. Bij voorkeur hebben ze een korte levenscyclus.
- f) Bij voorkeur is de ecologie van de soort in grote lijnen bekend. Verder is het een pre indien er vanuit het ecologische onderzoek reeds ervaring is met het hanteren en houden (of zelfs kweken) van de dieren onder laboratorium omstandigheden.

Hieronder is een korte kenschets gegeven van enkele soorten uit de verschillende hoofdtaxa, die zoveel mogelijk aan de bovengenoemde criteria voldoen.

A. *Ophiura albida* – de Kleine slangster (Echinodermata)

De Kleine slangster (grootte van de centrale schijf is max. 15 mm, armen tot 22 mm) komt voor in de gehele Noordzee maar ook in bijv. de Oosterschelde, met in de Noordzee een gemiddelde dichtheid van zo'n 3 individuen per m². De Kleine slangster is een belangrijke voedselbron voor platvis. De dieren hebben een voorkeur voor fijn zandige sedimenten, alwaar ze als depositfeeder foerageren op detritus. Daarnaast foerageren ze ook als carnivoor op meiofauna en juveniele macrofauna. De dieren hebben een pelagisch larvaal stadium met een duur van 26-40 dagen. De dieren groeien over het algemeen vrij snel en kunnen een leeftijd van 3 jaar bereiken.

Alhoewel de Grote slangster *Ophiura texturata* (ook wel *O. ophiura* genoemd) in hogere dichtheden voorkomt en daarmee makkelijker valt te verzamelen in bijv. de Oosterschelde verdient vooral de Kleine slangster de voorkeur, omdat de Grote slangster een uitgesproken carnivoor is.

Geschiktheid voor bioassays

Deze wordt als matig beoordeeld, maar de soort is onder de inheemse Echinodermen waarschijnlijk de meest geschikte vertegenwoordiger, indien het er om gaat om in bioassays effecten vast te stellen op de groei en/of reproductie.

Mogelijkervijze zijn zeekomkommers, en dan met name de soort *Cucumaria elongata*, ook geschikt voor toepassing in bioassays, maar over de ecologie van deze inheemse soorten is tot nu duidelijk minder bekend. *Cucumaria elongata* is een depositfeeder, die zich diep in het sediment ingraaft en vanuit deze levenswijze wel interessant is.

Referenties: Feder (1981); Dahm (1993); Holtmann *et al.* (1996).

B. *Corophium arenarium* – een slijkgarnaal (Crustacea, Amphipoda)

Naast de in Nederland veel gebruikte slijkgarnaal *Corophium volutator* is wellicht ook de nauw verwante soort *Corophium arenarium* een geschikte kandidaat. *Corophium arenarium* heeft een zeer vergelijkbare levenswijze en een deels overlappend verspreidingsgebied.. In veel studies is dan ook geen onderscheid gemaakt tussen *C. volutator* en *C. arenarium*. Kleine verschillen kunnen bijvoorbeeld gevonden worden in de gemiddelde broedselgrootte, die bij *C. volutator* gemiddeld groter is. Het voorkomen van *Corophium* wordt vooral bepaald door de deeltjesgrootte van het sediment (mits ook het zoutgehalte geschikt is). *C. volutator* heeft een sterke voorkeur voor slibrijke sedimenten met een ruime hoeveelheid detritus, maar zonder bovenmatige hoeveelheden organische stof. In sedimenten met een gemiddelde korrelgrootte van meer dan 150µm zijn hoge dichtheden echter ongewoon. *C. arenarium* heeft daarentegen juist een voorkeur voor

zandige sedimenten. *C. arenarium* bereikt echter niet zulke hoge dichtheden als *C. volutator*. Juist voor de zandige sedimenten, waarvoor *C. volutator* een minder geschikt testorganisme is (AquaSense, 2002a), zou *C. arenarium* daarom een geschikt testorganisme kunnen zijn.

Mochten testen met *Corophium arenarium* niet geschikt blijken, dan is wellicht de vlokreeft *Bathyporeia elegans* een geschikte kandidaat. Gezien de ervaring die er reeds met *Corophium spec.* is opgebouwd, dient dit als tweede keus gezien te worden. Mocht bijvoorbeeld om wat voor reden dan ook chronische testen met *Corophium* uiteindelijk afvallen, dan zou naar deze *Bathyporeia* uitgeweken kunnen worden. Ook in het verleden zijn wel enkele bioassays met *Bathyporeia* (maar dan *B. sarsi*) uitgevoerd. *Bathyporeia elegans* is ongeveer 6 mm lang. Hij komt in de gehele Noordzee voor (met uitzondering van de Oestergronden). Ook in de Waddenzee en Oosterschelde treft men deze soort veelvuldig aan, waarbij de soort een voorkeur heeft voor de fijn-zandige sedimenten. Hun gemiddelde dichtheid in de Noordzee bedraagt circa 50 individuen per m², waarmee de soort een belangrijke voedselbron vormt voor jonge platvis en grondels. Het foerageertype van de dieren wordt omschreven als 'selectief depositfeeder'. Hij krabt onder andere biofilms (micro-organismen en detritus) van zandkorrels af. In het veld worden er vrouwtjes met eieren aangetroffen in de periode tussen mei en augustus. De jonge dieren hebben direct een bentische levenswijze. De paartijd wordt waarschijnlijk door de temperatuur gereguleerd. De jongen dieren groeien zeer snel en worden waarschijnlijk maximaal 2 jaar oud.

Geschiktheid voor bioassays

Gezien de ervaring met *Corophium volutator* lijkt de nauw verwante soort *Corophium arenarium* zeer geschikt, met name als vervanging voor *C. volutator* in zandige sedimenten.

Ook *Bathyporeia elegans* lijkt zeer geschikt. Eventueel kan er ook gewerkt worden met aanverwante soorten als *Bathyporeia tenuipes*, die een voorkeur heeft voor diepe, slibrijke gebieden zoals de Oestergronden. Voor beide soorten geldt echter, dat de geschiktheid van de soort vergeleken moet worden met die van *Corophium volutator*, waarbij de ervaring met *Corophium* een zeer belangrijke factor is.

Referenties: Watkin (1939); Fincham (1971); Nicolaisen & Kannevorf (1969); Holtmann *et al.* (1996); Chapman *et al.* (1992); Van der Hurk *et al.* (1992); AquaSense (2000b).

***C. Pseudocuma longicornis*– een kommakreeftje (Cumacea)**

Pseudocuma heeft een max. lengte van circa 4 mm en zit daarmee een beetje tussen de typische meiofauna en macrofauna in. Het dier heeft een wijde verspreiding en wordt aangetroffen in de Noordzee, Skagerak, Oostelijke Atlantische Oceaan, Middellandse Zee als mede de Zwarte zee. Ze komen hierbij voor op een diepte variërend van 0 – 130 m. Hun gemiddelde dichtheid in de Noordzee is circa 12 individuen per m². Cumacea vormen een belangrijke voedselbron voor juveniele vis en mobiele epibenthos (garnalen, krabben en kreeften). Het zijn selectieve depositfeeders, die in en op de zeebodem micro-organismen en detritus opeten.

De dieren hebben geen pelagisch levensstadium. Net als amphipoden bezitten ook de cumaceen een marsupium. De eieren worden hierbij aan de buikzijde megedragen en de juveniele dieren komen compleet uit het ei. In de Noordzee worden vrouwtjes met eieren gedurende het gehele jaar aangetroffen. Hun maximale leeftijd ligt rond één jaar.

Geschiktheid voor bioassays

Deze soort lijkt zeer geschikt, vooral door de potentie tot het ontwikkelen van een test gebaseerd op reproductie. Weliswaar is er tot nu toe weinig ervaring met het kweken van deze soort (wel met andere Cumacea soorten en dan vooral de iets kleinere), maar Cumacea komen vrij algemeen in allerlei aquaria voor, wat duidt op de mogelijkheid tot kweken. Misschien zijn ook nauw verwante soorten Cumacea geschikt, zoals de iets grotere *Diastylis bradyi*.

Referenties: Jones (1976); Holtmann *et al.* (1996).

D. *Scoloplos armiger* – Wapenworm (Polychaeta, Orbiniidae)

De Wapenworm heeft een lengte variërend van 80 – 120 mm en is een echte kosmopoliet, die tot op een diepte van 2 km kan worden aangetroffen. De soort heeft een voorkeur voor fijn zandige tot slibrijke (zelfs anoxische) sedimenten, waarin hij zich meestal tot een diepte van 10-15 cm ingraaft. Hun gemiddelde dichtheid in de Noordzee bedraagt zo'n 50 individuen per m² en de Wapenworm vormt een belangrijke voedselbron voor bodemvissen. In het Waddengebied wordt er ook door vogels op deze Wapenworm gepredeerd.

De Wapenworm is een niet selectieve depositfeeder en daarmee een geschikte kandidaat voor mogelijke effecten van verontreinigde sedimenten. In de Noordzee vindt er voortplanting plaats in de periode tussen maart en mei. Hierbij worden er op het bodemoppervlak door de vrouwtjes tot 2 cm grote peervormige eipakketten gedeponeerd met daarin een variërend aantal eieren oplopend tot 5000. De eerste ontwikkeling vindt voor een groot deel in dit eipakket plaats. Na 10 – 26 dagen (afhankelijk van de temperatuur) komen de larven uit en zoeken ze direct de bodem op. De dieren worden gekenmerkt door een snelle groei, waarbij ze in hun tweede levensjaar paaïen. Hun maximale leeftijd ligt zo rond de 4 jaar.

Geschiktheid voor bioassays

Deze soort lijkt zeer geschikt. In tegenstelling tot de wadpier (*Arenicola marina*) is de Wapenworm ook in het diepere water van de Noordzee thuis. Bovendien is de ontwikkeling, door het afleggen van de goed zichtbare eipakketten en de directe overgang naar het bodemleven, goed te volgen.

Referenties: Kirkegaard (1978); Hartmann-Schröder (1996); Holtmann *et al.* (1996).

E. *Abra alba* – Witte dunschaal (Mollusca, Scrobiculariidae)

De Witte dunschaal heeft een lengte oplopend tot circa 25 mm. Hij komt in de gehele Noordzee voor, maar wordt ook aangetroffen in de Baltische zee en van Noorwegen tot aan de Afrikaanse kust. De Witte dunschaal heeft een voorkeur voor fijn zandige tot slibrijke sedimenten tot aan de 60 m diepte lijn. De dieren graven zich over het algemeen enkele centimeters in het sediment in. In de Noordzee bedraagt hun gemiddelde dichtheid zo'n 20 dieren per m². Ze vormen daarmee een belangrijke voedselbron voor bodemvissen, zoals voor de schol (*Pleuronectes platessa*) en juveniele kabeljauw (*Gadus morhua*).

De Witte dunschaal is een depositfeeder, die met behulp van een sifon detritus in en op de bodem verzameld. In beperkte mate kan de Witte dunschaal ook suspensiefeeder zijn.

Voortplanting vindt in de Noordzee plaats van mei tot augustus.

Postlarvale stadia gaan bij een lengte van 0.2 tot 0.3 mm over van een

pelagisch voorkomen naar een benthische levenswijze. De Witte dunschaal kan zeer snel groeien en bereikt in het eerste levensjaar reeds een lengte van 12-14 mm. Het is een echte opportunist, die bijvoorbeeld vaak koloniseert op sediment in verstoorde gebieden en op dicht slibbende zandwinputten.

Geschiktheid voor bioassays

Deze soort lijkt geschikt, maar er is voor zover bekend geen ervaring met het kweken van dit dier. Een andere mogelijk zeer geschikte kandidaat met soortgelijke levenswijze is het nonnetje *Macoma balthica*. Deze wordt op dit ogenblik op het NIOZ succesvol gekweekt. Ook de autecologie van deze soort is in detail bekend. Ten opzichte van de Witte dunschaal is het nadeel van het Nonnetje dat deze bij voorkeur suspensiefeeder is, maar dit nadeel weegt wellicht op tegen de duidelijk ruimer voorhanden zijnde ervaring.

Als andere alternatieve kandidaat onder de weekdieren, die aan een slibrijke habitat verbonden zijn, kan de Glanzende parelmoerneut (*Nucula nitidosa*, t/m 13 mm lang) genoemd worden. Deze soort is uitsluitend een depositfeeder en leeft dicht onder de oppervlakte van het sediment, vooral in slibrijke gebieden in de hele zuidelijke Noordzee. Ze vormen een belangrijke voedselbron voor bodemvis. Helaas is er weinig bekend over de ecologie van deze soort en waarschijnlijk groeien ze relatief langzaam.

Referenties: Bachelet & Cornet (1981); Bosselmann (1991); Rees & Dare (1993); Holtmann *et al.* (1996).

F. *Hydrobia ventrosa* – Opgezwollen brakwaterhoren (Mollusca, Gastropoda)

Dit slakje, met een lengte tot 6mm, komt voor langs de Atlantische kusten van Europa en mogelijk ook langs de Noord-Amerikaanse oostkust. Vóór de afsluiting van de Zuiderzee was *H. ventrosa* algemeen in de omgeving van deze brakke binnenzee vertegenwoordigd. Als zoutgehalte wordt een range van 0,6 tot 29 ‰ opgegeven, alhoewel zeker bij de hele lage zoutgehalten betwijfeld moet worden op de soort hier nog tot een goede reproductie in staat is. De soort verdraagt in ieder geval geen volledig zeewater. *H. ventrosa* is daarmee een meer typische brakwatersoort dan het Wadslakje *H. ulvae*. Ook het Wadslakje kan bij lagere zoutgehalten voorkomen, maar wel in mindere mate. *H. ventrosa* heeft waarschijnlijk een optimaal voorkomen bij zoutgehalten van 10 – 15 ‰, terwijl *H. ulvae* zoutgehalten van boven de 15-20 ‰ prefereert. Het voedsel van *H. ventrosa* bestaat uit diatomeeën, kleine algen, detritus en bacteriën die van het oppervlakte van het sediment worden geschraapt. De eiafzetting vindt in april/mei – augustus plaats. De eikapsels bevatten gewoonlijk één ei, maar ook wel twee of drie. Uit de eikapsels komen kruipende slakjes met doorzichtige schelpjes (schelphoogte 0,2-0,3 mm). Eventueel kan overwogen worden om de gehele range aan zoutgehalten af te gaan dekken met slakken. In het zoete water zou daarvoor *Potamopyrgus antipodarum* een geschikte kandidaat zijn (waarvan trouwens als zoutgehalte een range tot ±20‰ wordt opgegeven), *H. ventrosa* voor de brakke sedimenten en *H. ulvae* voor de mariene sedimenten. Hierbij dient te worden opgemerkt dat er binnen Nederland onder andere door de UvA (Dr. J. Dorgelo) veel onderzoek (deels ecotoxicologisch) met *Potamopyrgus* is uitgevoerd.

Geschiktheid voor bioassays

Vooral met het oog op het toepassen van weekdieren als testorganisme in brakke sedimenten lijkt deze soort mogelijkheden te bieden, maar er

is voor zover bekend vrijwel geen ervaring met het uitvoeren van testen met dit dier. Er zal dus nog veel onderzoek nodig zijn. De brede tolerantie voor saliniteit vormt een groot voordeel van dit organisme, terwijl de naar verwachting vrij lage groeisnelheid waarschijnlijk een van de grotere struikelblokken kan vormen.

Referenties: Wolff (1973).

5. Selectiecriteria

Om te komen tot een testbatterij van (te ontwikkelen) chronische sediment bioassays voor het brakkewater en het mariene milieu, zal op basis van de informatie uit de vorige hoofdstukken een selectie gemaakt moeten worden. Om deze selectie zo eenduidig mogelijk te laten geschieden wordt in dit hoofdstuk ingegaan op de selectiecriteria die daarbij gebruikt kunnen worden. In de literatuur zijn meerdere bronnen beschikbaar, die ingaan op de vraag naar welke criteria gebruikt moeten worden bij het selecteren van bioassays. Elk voorstel heeft zo zijn eigen doelstelling. Ondanks deze kleine verschillen blijkt, dat de criteria op hoofdlijnen redelijk overeenkomen. Voor het huidige document is daarom besloten om slechts een tweetal bronnen te bespreken, omdat daarmee reeds een goed overzicht wordt gegeven. Dit betreft allereerst een studie van Léon & van Gestel (1994), die in opdracht van het ministerie van VROM een testbatterij bioassays hebben samengesteld voor het beoordelen van effecten van stoffen in terrestrische ecosystemen. Daarnaast is gekeken naar een studie uitgevoerd in opdracht van STOWA (1996). Een verschil tussen deze laatste selectie en die van Léon & van Gestel (1994) is dat voor de selectie in STOWA (1996) meer vanuit de praktijksituatie is gedacht. Het hebben van ervaring met de specifieke test in Nederland is voor STOWA (1996) bijvoorbeeld een zeer zwaarwegend criterium geweest, terwijl dit voor de huidige studie minder het geval is.

5.1 Een testbatterij gericht op de effecten van stoffen in terrestrische systemen

De door Léon & van Gestel (1994) voorgestelde selectie was gericht op een testbatterij bioassays voor het beoordelen van de effecten van stoffen in terrestrische ecosystemen. In dat rapport worden zowel criteria voor de selectie van individuele bioassays als criteria voor de selectie van een testbatterij besproken. Deze selectiemethode is kwantitatief. Dat wil zeggen dat de criteria objectief én op een gestructureerde manier worden gewogen teneinde tot de uiteindelijke selectie van de testbatterij te komen. Hoewel de methode in eerste instantie bedoeld is voor selectie van een testbatterij terrestrische testen, is de methode ook bruikbaar voor aquatische testen. Om de selectie echter ook kwantitatief te kunnen uitvoeren is een goede kennis van de betreffende bioassay vereist. Aangezien het voor het brakkewater en mariene milieu juist gaat om een testbatterij, die nog moet worden ontwikkeld, is het op dit moment niet goed mogelijk om de selectie op een vergelijkbare manier kwantitatief te onderbouwen. Onderstaand overzicht is daarom beperkt tot de gebruikte selectiecriteria.

De onderzoeksdoelen van Léon & van Gestel (1994) waren:

1. Het ontwikkelen van een methode waarmee op een objectieve en gestructureerde manier gestandaardiseerde testen kunnen worden geselecteerd, die geschikt zijn voor de eerste (screenings)fase van effect beoordeling.

NB. Bij de huidige selectie voor mariene en/of brakwater bioassays zal minder aandacht besteed worden aan het item "gestandaardiseerd". Alhoewel het prettig is als testen reeds gestandaardiseerd zijn, gaat het om een lange termijnvisie, waarbij

het niet perse erg is als bepaalde testen en/of aspecten nog verder ontwikkeld moeten worden.

2. De methode moet antwoord geven op de vraag hoeveel en welke bioassays nodig zijn voor een realistische effect beoordeling.
3. De methode moet antwoord geven op de vraag of de bestaande testen, die gebruikt worden in (EU) teststrategieën, een ecologisch realistische effect beoordeling mogelijk maken.

In tabel 5.1 worden de gebruikte selectiecriteria weergegeven. Deze worden in §5.3 verder toegelicht. Voor aanvullende details wordt verwezen naar Léon & van Gestel (1994). Bij het lezen van de toelichting moeten een aantal kanttekeningen in het achterhoofd gehouden worden:

1. De methode richtte zich uitsluitend op bioassays voor stoftesten, maar de methodiek is ook geschikt voor de selectie van testen voor verontreinigde milieumonsters.
2. Ook zonder dat de kwantitatieve uitwerking, dat wil zeggen de weging en integratie van de selectiecriteria wordt meegenomen, geeft het rapport van Léon & van Gestel (1994) goed inzicht in welke selectiecriteria van belang zijn voor de keuze van een testbatterij bioassays.
3. De keuze van bioassays is behalve van de genoemde criteria ook sterk afhankelijk van het doel van het onderzoek en de verontreinigingssituatie (Hill *et al.*, 1993). Bij een lokatiespecifiek onderzoek kunnen bepaalde criteria zwaarder wegen in vergelijking tot een meer vergelijkend onderzoek voor geheel Nederland of de Noordzee landen.
Ook het (verwachte) concentratieniveau en de aard van de aanwezige verontreinigingen bepaald of het zinvol is bepaalde bioassays in te zetten.
4. Wanneer getracht wordt om een relatie te leggen met veldwaarnemingen dan worden bij voorkeur inheemse organismen gekozen die voorkomen in het Nederlandse (water)bodemmilieu of soorten die daarmee sterk verwant zijn.

5.2 Een testbatterij gericht op bioassays voor regionale wateren

Een ander voorbeeld van selectiecriteria voor (een testbatterij van) bioassays wordt beschreven in STOWA (1996). Bij de Nederlandse waterbeheerders bleek een grote behoefte te bestaan aan praktische, biologische testsystemen voor het beoordelen van de actuele kwaliteit van het oppervlaktewater. In STOWA (1996) wordt een keuzesysteem beschreven, waarmee waterbeheerders voor specifieke situaties technieken kunnen selecteren voor de actieve biologische monitoring van bestrijdingsmiddelen en zware metalen (in de praktijk de belangrijkste probleemstoffen) in oppervlaktewateren. Het keuzesysteem richt zich met name op biologische technieken, waarmee directe effecten van verontreinigingen kunnen worden aangetoond en waarmee dus een actuele risicobeoordeling mogelijk is. Hierbij is uitsluitend naar actieve biomonitoringstechnieken gekeken, dat wil zeggen monitoring waarbij een experimentele opstelling, in het laboratorium of in het veld, wordt gebruikt. Het betreft zowel laboratorium bioassays als veldbioassays en biologische bewakingssystemen. In het kader van het project werd een inventarisatie van beschikbare biologische monitoringstechnieken gemaakt, waaruit in drie selectieronden geschikte technieken werden geselecteerd.

Een eerste selectie van meest bruikbare technieken werd gemaakt op basis van de vraag of er in Nederland ervaring met deze techniek is dan wel (in geval het een vrij nieuwe techniek betreft) of de techniek veelbelovend is (wordt als veelbelovend aanbevolen in (inter)nationale review publicaties).

Voor de tweede selectieronde werden (met name zoet)waterbeheerders geënquêteerd over onder andere de wensen en criteria ten aanzien van de in te zetten biomonitoringstechnieken. Als selectiecriteria, waaraan toegepaste technieken moeten voldoen, werden door de waterbeheerders 17 criteria genoemd. Alhoewel de omschrijving van deze criteria anders is verwoord dan in Léon & van Gestel (1994) zijn deze lijsten eenvoudig met elkaar te vergelijken (zie tabel 5.1). Voor de oorspronkelijke lijst met criteria wordt daarom verwezen naar STOWA (1996). Verder kan worden vermeld, dat in de STOWA methodiek de verschillende criteria een wegingsfactor kende. Aangezien een dergelijke wegingsfactor nu niet voor ogen staat, is dit overzicht niet opgenomen.

In de derde selectieronde werd de uiteindelijke testbatterij geselecteerd. De hiervoor gebruikte criteria zijn:

- verschillende trofische niveaus zijn vertegenwoordigd (minimaal één producent, destruent en consument)
- de techniek is toxiciteit- of effectgericht
- geschikt voor het monitoren van zoet oppervlaktewater
- bij zeer vergelijkbare lab- en veldbioassays is gekozen voor de techniek waarmee de meeste ervaring is opgedaan
- de selectie van biologische bewakingssystemen is gebaseerd op de aanbevelingen van de projectgroep 'Wirkungstests Rhein'.

Tabel 5.1

Criteria voor de selectie van een testbatterij bioassays. Weergegeven zijn de criteria zoals die worden genoemd door Léon & van Gestel (1994) en door STOWA (1996). Daarnaast zijn ook de voorgestelde selectiecriteria voor chronische in vivo bioassays gericht op een sediment beoordeling uit brakke en/of mariene milieus, weergegeven.

Selectiecriteria	Léon & van Gestel (1994)	STOWA (1996)	Chronische brakke en/of mariene sediment bioassays
Selectiecriteria voor individuele testen			
1 Praktische toepasbaarheid			
a Praktische uitvoerbaarheid		X	X
b Kosteneffectiviteit		X	X
c Doorlooptijd		X	(X)
d Toepasbaar voor allerlei type monsters			X
2 Aanvaardbaarheid			
a Standaardisatie		X	*1
b Reproduceerbaarheid		X	X
c Statistische geldigheid		X	(X)
d Good Laboratory Practice		X	
e Bruikbaar voor een brede groep van stoffen		X	X
f Beschikbaarheid toxiciteitsdata / literatuur			X
g Gevoelig			X
h Eenduidig te begrijpen effect			(X)
i Testsoort moet aanspreken / PR-waarde		X	
3 Ecologische relevantie			
a Ecologisch realisme		X	X
b Biologische geldigheid		X	X
Selectiecriteria voor een testbatterij			
4 Representatieve soort voor het ecosysteem	X	X	X
a Representatief voor levensstrategieën	X		X
b Representatief voor functionele groepen	X	X	X
c Representatief voor taxonomische groepen	X		X
d Representatief voor blootstellingsroute	X		X
5 Vertaling van single species toets naar ecosysteem effecten	X	X	X
6 Vergelijkbaarheid van testen onderling	X		

¹: criterium vooralsnog niet meegenomen omdat het om een lange termijnvisie gaat. Uiteindelijk wel van groot belang.

Toelichting op tabel 5.1.

Ad 1: Praktische toepasbaarheid

Dit aspect omvat onder andere de praktische uitvoerbaarheid, de kosteneffectiviteit en de doorlooptijd.

Bij praktische uitvoerbaarheid moet gedacht worden aan de verkrijgbaarheid en handelbaarheid van testorganismen, de kennis en ervaring die nodig is voor het uitvoeren van de testen, de eenvoud waarmee het gekozen eindpunt in de bioassay te bepalen is en hoe eenvoudig de respons vertaald kan worden naar ecologische consequenties.

De doorlooptijd wordt bepaald door de snelheid waarmee het te meten toxisch effect tot uiting komt. Kortdurende testen, waarin

bijvoorbeeld naar sterfte of (enzym)activiteit gekeken wordt, geven snel resultaat maar zijn vaak relatief ongevoelig, minder ecologisch relevant voor organismen met een lange levensduur en/of moeilijk door te vertalen naar effecten op populatieniveau. Het belang van de doorlooptijd bij de keuze van bioassays wordt mede bepaald door de onderzoeksvraag. Voor de huidige selectie is dit criterium van minder belang, omdat deze zich specifiek op chronische testen richtte (maar kan binnen die groep weer wel van belang zijn).

Voor sedimentmonsters heeft het, voor een brede praktische toepasbaarheid van de bioassay, bovendien de voorkeur dat het testorganisme een brede range van fysisch chemische sedimentkarakteristieken kan tolereren (Hill *et al.*, 1993). In dat geval kunnen veel verschillende sedimenttypen getest worden met hetzelfde testorganisme, wat de onderlinge vergelijkbaarheid van de toxiciteit in verschillende sedimenten ten goede komt. Indien een testorganisme géén brede tolerantie voor fysisch chemische sedimentkarakteristieken heeft, is het voor de interpretatie van het testresultaat van belang om te weten te weten wat de randvoorwaarden van het testorganisme voor bijvoorbeeld pH, saliniteit, organisch stof of lutumgehalte zijn. Of met andere woorden: vanaf welke waarde van bijvoorbeeld de pH of saliniteit beïnvloeding van het testresultaat verwacht mag worden.

Ad 2: Aanvaardbaarheid

Een bioassay voor effectbeoordeling moet gestandaardiseerd, reproduceerbaar en statistisch gevalideerd zijn. Voor het testen van stoffen wordt het tevens belangrijk gevonden dat de test uitgevoerd wordt volgens de OECD Principles of Good Laboratory Practice (OECD, 1982). Voor testen met sedimenten is dit minder van belang, omdat dit door de huidige wetgeving niet wordt vereist. Verder heeft het de voorkeur als een bioassay gevoelig is voor de effecten van een brede range van stoffen of stofgroepen.

Het criterium standaardisatie richt zich onder andere op het testorganisme, inclusief het kweken en synchroniseren, de testopzet en de testomstandigheden. Bij de huidige selectie van mariene en/of brakwater bioassays is standaardisatie voornamelijk niet als selectieparameter meegenomen omdat het om een lange termijnvisie gaat. De gekozen bioassays dienen op termijn natuurlijk wel gestandaardiseerd te worden, maar allereerst wordt vooral op inhoudelijke argumenten voor een bepaalde bioassay gekozen. Het criterium statistische geldigheid is voor de huidige selectie ook van minder belang. De bioassay zal uiteindelijk ook statistisch gevalideerd moeten worden, maar bij een lange termijn visie hoeft die statistische validatie nog niet te zijn voltooid. Wel is het een pre als de statistische gevoeligheid van de test bekend is, zodat er beoordeeld kan worden of de test gevoelig genoeg is voor het aantonen van geringe effecten. Het criterium gevoeligheid levert trouwens enkele verschillen tussen de methoden op. Léon & van Gestel (1994) vinden het van belang, dat de test niet te ongevoelig én niet te gevoelig is, terwijl in STOWA (1996) de nadruk vooral wordt gelegd op het feit, dat de test niet te ongevoelig mag zijn. Hierbij wordt de wens geuit, dat de test effecten moet laten zien bij concentraties, die ook op basis van chemische normering overschrijdingen zouden laten zien. Een erg gevoelige test wordt hierbij minder als bezwaar beoordeeld.

De beschikbaarheid van wetenschappelijke achtergrondinformatie over het testorganisme wordt gezien als een belangrijke pré, omdat dat de interpretatie van bioassay resultaten vereenvoudigt. Door de regionale waterbeheerders (STOWA, 1996) werd aanvullend de wens geuit, dat het effect en het type test eenvoudig moet zijn te begrijpen en uit te leggen. Hierdoor vereenvoudigd de communicatie met betrokkenen.

Ad 3: Ecologische relevantie

Tussen verschillende soorten testorganismen kunnen grote verschillen in gevoeligheid voor specifieke toxicanten bestaan. Een factor 10.000 verschil in gevoeligheid tussen soorten is niet onrealistisch (Brils & den Besten, 1995). De gevoeligheid van een bepaalde soort voor een specifieke toxicant is sterk afhankelijk van de opnamekinetiek, die bepalend is voor de interne (residu)concentratie na een bepaalde blootstellingduur, en het werkingsmechanisme van de toxicant (effecten op enzymsystemen, zenuwstelsel, organen, mobiliteit, reproductie e.d.). Een bepaald testorganisme kan dus voor de ene toxicant zeer gevoelig zijn en voor een andere juist helemaal niet. Er bestaat dus niet zoiets als "het meest gevoelige testorganisme". Elk organisme heeft zijn eigen specifieke gevoeligheid.

Een bioassay dient ecologisch realistisch te zijn. Dit houdt in dat de bioassay de volgende karakteristieken zou moeten hebben (zie Léon & van Gestel, 1994):

- Het testorganisme moet een rol spelen in het ecologische functioneren van het ecosysteem
- Het testorganisme moet bij voorkeur inheems zijn
- Het testorganisme moet een goede vertegenwoordiger zijn van de betreffende taxonomische groep. Dat houdt in dat de soort niet te veel verschilt van de andere soorten binnen dezelfde taxonomische groep wat betreft ecologische, morfologische en fysiologische eigenschappen.
- Het gemeten eindpunt moet ecologisch relevant en indicatief zijn voor de fitheid van het individu en zijn functioneren in ecologische processen. Eijsackers & Løkke (1992) noemen overleving, groei, mobiliteit, voedselconsumptie en reproductie als relevante eindpunten. Hiervan zijn overleving en reproductie het meest direct gerelateerd aan het populatieniveau. Onderzoek van Kammenga & Riksen (1996) heeft echter aangetoond dat een effect op een individuele levensparameter niet altijd direct vertaald kan worden naar een effect op populatieniveau. Zij demonstreerden dit aan de hand van de reactie van twee nematodensoorten op koper. Bij de ene soort werd een groot aantal levensparameters, waaronder de dagelijkse reproductie, sterk negatief beïnvloed. Dit werd echter gecompenseerd door de reproductieve periode te verlengen. Het effect op populatieniveau bleef daardoor vergelijkbaar met een andere soort, waarbij de individuele levensparameters minder negatief beïnvloed werden. Dit verschijnsel wordt plasticiteit genoemd.
- De blootstellingstijd moet relevant zijn met betrekking tot het gemeten eindpunt. Als bijvoorbeeld reproductie wordt gemeten, dient de blootstellingsduur een substantieel deel van het reproductieve leven van de soort te beslaan. In sommige gevallen wordt de reproductie indirect verlaagd doordat de tijd tot aan het volwassen stadium en/of de eerste reproductie toeneemt. Deze vertraging zou daarom bij voorkeur meegenomen moeten worden in de test.

- De abiotische en biotische factoren moeten zoveel mogelijk vergelijkbaar zijn met die in het natuurlijk milieu van de soort. Op deze wijze zijn de aanwezige stoffen de enige stressfactor en kan de toxische potentie van deze stoffen beter bepaald worden. Het gaat hier om een lange lijst met allerlei factoren. Speciale aandacht zou zich voor het RIKZ moeten richten op het zoutgehalte. Onder invloed van een wisselend zoutgehalte kan namelijk de biologische beschikbaarheid (m.n. van metalen) veranderen. Men kan hiervoor echter twee kanten op redeneren. Wilt men het liefst een landelijk geldend systeem dan is standaardisatie van het zoutgehalte aan te raden, terwijl men voor lokatiespecifieke studies juist beter met het op die lokatie aanwezige zoutgehalte zou kunnen testen.
- De blootstelling(sroute) moet lijken op de blootstellingsroute die in het veld verwacht wordt. De blootstelling hangt onder andere van de voedselstrategie van het testorganisme af.
- De biologische beschikbaarheid moet vergelijkbaar zijn met de natuurlijke situatie. Dit houdt in dat het monster bij voorkeur zo onveranderd mogelijk getest wordt en dat de testomstandigheden zoveel mogelijk op de natuurlijke situatie lijken. Dit houdt ook in dat testen met sedimenten de voorkeur hebben boven testen met poriewater of extracten van sedimenten. Voorbehandelingen zoals opslag, zeven, mengen en centrifugeren kunnen tot een (tijdelijke) verandering van de biologische beschikbaarheid van de verontreiniging leiden. Indien het te gebruiken testorganisme ook reeds van nature in de te testen sedimenten kan voorkomen, is de daardoor noodzakelijke voorbehandeling dus een complicerende factor.
- De blootstellingsconcentratie moeten ecologisch relevant zijn. NB. Dit is natuurlijk alleen voor stoftesten relevant en niet voor testen met veld monsters.
- De resultaten van een bioassay dienen altijd te voldoen aan de voor die test opgestelde biologische geldigheidscriteria. Deze criteria hebben betrekking op de prestaties van de testorganismen in een standaard testmedium, bijvoorbeeld een referentiesediment. De criteria betreffen bijvoorbeeld een minimale overleving, een minimaal aantal nakomelingen, een maximale spreiding in de testresultaten enzovoorts. De biologische geldigheidscriteria vormen een controle op testomstandigheden en de kwaliteit van de testorganismen.

Ad 4: Representatief voor het ecosysteem

De geselecteerde soorten binnen een testbatterij zouden representatief moeten zijn voor verschillende ecosystemen zowel voor wat betreft de ecologische functie, het trofische niveau, de taxonomische groepen, de anatomische bouw, de morfologische en fysiologische reactie op toxische stoffen, de levensstrategieën en blootstellingsroute.

Voor wat betreft levensstrategieën zou de testbatterij zo moeten worden samengesteld dat zowel soorten met een korte generatietijd, een hoge reproductiesnelheid en een hoge kolonisationsnelheid (r-strategisten) als soorten met een lange generatietijd, een lage reproductiesnelheid en een lage kolonisationsnelheid (K-strategisten) worden vertegenwoordigd. K-strategisten zouden gevoeliger voor verontreinigingen kunnen zijn dan r-strategisten, omdat ze niet zo snel kunnen compenseren voor verliezen van individuen. De testbatterij zou dus niet alleen uit algemeen voorkomende soorten kunnen bestaan, maar ook zeldzamere soorten moeten

vertegenwoordigen. Het incorporeren van testen met zeldzamere soorten kan op problemen stuiten omdat deze organismen niet altijd te verkrijgen of te kweken zijn. Ook andere aspecten van de levensstrategieën zijn van belang. Zo kan gezocht worden naar zowel geslachtelijke als ongeslachtelijke voortplanting.

De testbatterij zou alle belangrijke ecologische functies moeten omvatten om het complete ecosysteem te kunnen beschermen. Als het niet mogelijk is om verschillende functionele groepen te omvatten, dan zouden de gekozen testorganismen tenminste tot verschillende trofische niveau's moeten behoren. Het verschil tussen een functionele groep en een trofisch niveau is dat verschillende functionele groepen tot hetzelfde trofische niveau kunnen behoren maar verschillende voedselbronnen kunnen hebben of dezelfde voedselbronnen op een andere manier gebruiken.

De testbatterij zou organismen uit verschillende taxonomische groepen moeten bevatten. Hiervoor zijn twee belangrijke redenen. Allereerst omdat de effectbeoordeling zich op het effect op het hele ecosysteem richt. Daarnaast blijken taxonomisch nauw verwante soorten wat betreft gevoeligheid meer op elkaar te lijken dan minder verwante soorten (LeBlanc, 1984; Blanck, 1984).

De testbatterij zou tenslotte ook alle mogelijke blootstellingsroutes moeten omvatten. Voor sedimenten zijn dit (porie)water, zwevend stof, sediment en voedsel.

Ad 5: Vertaling van single species toets naar ecosysteem effecten

Het uiteindelijke doel van een effectbeoordeling is het beschermen van ecosystemen. In laboratoriumtesten worden testen uitgevoerd met soorten die representatief zijn voor functies binnen het te beschermen ecosysteem. Er wordt van uitgegaan dat wanneer de individuele soorten beschermd zijn, tevens hun functies binnen het ecosysteem worden beschermd. De resultaten van single species testen worden dus geëxtrapoleerd naar ecosysteemniveau. De responses in de single species testen zouden daarom op een bepaalde manier gerelateerd moeten zijn aan reacties op hoger ecosysteemniveau, bijvoorbeeld aan populaties, voedselketenrelaties, ecosysteemstructuur en processen binnen het ecosysteem.

Ad 6: Vergelijkbaarheid van testen onderling ook wel 'compatibility of test results' genoemd

Hiermee wordt bedoeld dat de testbatterij zo samengesteld zou moeten zijn dat alle testorganismen in de verschillende testsystemen aan hetzelfde blootstellingsmedium worden blootgesteld, zodat elk testorganisme aan dezelfde concentratie toxicant in dezelfde chemische vorm wordt blootgesteld. Dit aspect is vooral van belang voor stoftesten. Voor het testen van verontreinigde waterbodems speelt dit aspect geen rol, omdat de keuze van het testmedium niet vrij is: je hebt te maken met de fysisch chemische eigenschappen van het te testen sediment.

6. De te ontwikkelen testbatterij voor brakke en mariene sedimenten

6.1 Inkadering

Zoals gezegd is er bij het selecteren van beschikbare testen heel specifiek gezocht naar testen en/of organismen die een heel directe relatie met sediment hebben. Dieren (of planten) die wel in of op het sediment voorkomen maar voor wat betreft hun voedsel bijvoorbeeld sterk van de waterkolom afhankelijk zijn hebben dan ook minder de voorkeur en zijn in principe niet opgenomen. Toch is het voordat ingegaan wordt op de selectie voor chronische sediment testen wel aardig om hier nog even bij stil te staan. Zo komen er op de zeebodem een zeer groot aantal organismen en organisme-groepen voor die niet of nauwelijks aan de in dit rapport vermelde taxonomische groepen verwant zijn. Denk bijvoorbeeld aan anemonen, poliepen, krabben en kreeften etc. Ook worden hier bijvoorbeeld dieren aangetroffen die veel meer met ongeslachtelijke voortplanting te maken hebben. Op voorhand kan niet worden gesteld dat deze diversiteit aan organismen voldoende worden beschermd door een (beperkte) selectie van chronische sediment bioassays. Aan de andere kant is het huidige rapport specifiek gericht op de sediment fase. Indien in een later stadium ook een vergelijkbare exercitie voor de in de waterkolom aanwezige stoffen zou worden uitgevoerd, dienen deze organismen daar in meegenomen te worden.

Rekening houdend met hetgeen daarover in het rapport "Normstelling voor bioassays" (Maas *et al.*, 2003) is gezegd zou er uiteindelijk voor elk type sediment een set van (tenminste) 3 chronische bioassays beschikbaar moeten zijn. Dit betekent dat men bij de eerste selectie op een iets hoger aantal moet inzetten, zodat het uitvallen van testen die bij de ontwikkeling en implementatie toch negatief worden beoordeeld geen problemen hoeft op te leveren (zie bijv. de recente ervaringen met de bioassays voor de CTT-toetsing). De voornaamste reden achter het aanbevelen van een set bioassays is gelegen in het feit, dat de gevoeligheid van soorten voor individuele stoffen (sterk) kan verschillen. Voor het beoordelen van verontreinigde sedimenten met een zeer divers scala aan verschillende stoffen levert het werken met een set bioassays met representanten uit verschillende taxonomische groepen dus een belangrijke borging op.

Rekening houdend met het gebied dat onder de verantwoordelijkheid van het RIKZ valt zou een dergelijke set van chronische sediment bioassays in ieder geval voor de volgende drie type monsters beschikbaar moeten komen:

1. Havenslib

Belangrijke specifieke criteria waaraan een test zou moeten voldoen om voor havens toepasbaar geacht te worden zijn a) tolerantie voor hoge slibgehalten en b) tolerantie voor randvoorwaarden als lage zuurstofspanning en verhoogde ammonium concentraties.

2. Brakke sedimenten

Het belangrijkste selectie criterium voor deze gebieden is natuurlijk de range aan saliniteiten waarbij de bioassay kan worden uitgevoerd.

3. Mariene sedimenten (Noordzee en/of Waddenzee)

Deze gebieden worden allereerst gekenmerkt door in verhouding lage concentraties aan verontreinigingen (althans in bulksediment). Daarnaast zijn er enkele specifieke aandachtspunten bijvoorbeeld het vrij kale zand dat op zeer veel plaatsen wordt aangetroffen. Bij de selectie van bioassays is vooral op dit laatste punt specifiek gelet. Dit sediment type is daarom aangeduid als 'zandige mariene sedimenten'. Dit wil niet zeggen dat er niet ook slibrijke mariene sedimenten zijn, maar voor een testbatterij voor de meer slibrijke sedimenten kan eenvoudig gebruik gemaakt worden van hetgeen onder 'havenslib' en/of 'brakke sedimenten' wordt aangeduid.

Verder moet gerealiseerd worden dat dit niet een eensluidende opdeling is. Er zijn allerlei tussenvormen mogelijk zoals havens met brakwater. Ook speelt daarbij de vraag Wat is brakwater? Dergelijke aspecten zijn op dit moment echter minder van belang, omdat er altijd voor een specifieke studie gekozen kan worden uit alle testen die voor bepaalde gebieden zijn geselecteerd.

Tevens is het van belang om te realiseren, dat de genoemde testen in veel gevallen niet of nauwelijks (internationaal) zijn gestandaardiseerd en dat er ook aan andere kwaliteitsborging aspecten nog meer aandacht besteed zou moeten worden. Wel moet hierbij tevens gerealiseerd worden, dat er niet voor elke bioassay uitputtend is gezocht naar alle beschikbare en relevante informatie. Er is voldoende informatie verzameld om een selectie op te baseren. De geselecteerde testen en/of organisme(groepen) kunnen in een later stadium dan ook in meer detail worden bestudeerd.

6.2 Selectiecriteria

In het rapport Normstelling voor bioassays (Maas *et al.*, 2003) staat vermeld dat voor het vaststellen van het MTE (Maximaal Toelaatbaar Effect) drie chronische in vivo assays beschikbaar dienen te zijn, waarvan tenminste twee 'whole-sediment' testen zijn (bij voorkeur geen testen met gewervelde dieren). Aanvullend op deze criteria zijn voor de huidige selectie nog een drietal andere aspecten meegenomen:

- Zoals reeds in de inleiding is vermeld bestaat er een sterke voorkeur voor in vivo bioassays, waarbij de organismen direct aan het sediment worden blootgesteld;
- Voorkeur voor testen waarin reproductie als parameter wordt meegenomen. Indien een dergelijk test niet voor handen is, wordt een groeitest gekozen;
- Voorkeur voor inheemse soorten.

Zoals hierboven reeds vermeld zijn niet alle in hoofdstuk 5 genoemde selectiecriteria even goed te gebruiken door het ontbreken van gegevens. De praktische toepasbaarheid, dat wil zeggen aspecten als praktische uitvoerbaarheid, kosteneffectiviteit, doorlooptijd en toepasbaarheid voor allerlei sedimenttypen, bleken wel goed als selectie criterium bruikbaar. De selectiecriteria met betrekking tot de aanvaardbaarheid (onder andere de mate van standaardisatie, reproduceerbaarheid, bruikbaar voor een brede groep van stoffen e.d.) bleken afzonderlijk niet goed toepasbaar omdat er in de bestudeerde

literatuur vaak onvoldoende informatie over te vinden was. De aanvaardbaarheid is echter wel meegenomen in de selectie, maar hierbij is vooral uitgegaan van expert judgement. Zo is de mate van standaardisatie en de beschikbaarheid van toxiciteitsgegevens enigszins in te schatten op basis van het aantal referenties waar naar wordt verwezen. Voor de ecologische relevantie, alsmede de representativiteit voor het ecosysteem is, naast de informatie uit de bestudeerde literatuur, gebruik gemaakt van de informatie weergegeven in hoofdstuk 4, waarmee de relevante taxa en soorten voor de Nederlandse situatie in zowel de zee, als havens en brakke gebieden zijn afgeleid.

Bij het selecteren van bioassays zijn, naast bovengenoemde criteria, tevens enkele andere overwegingen van belang, zoals de overgang van zoet naar zout. Om bioassay resultaten zo goed mogelijk onderling te kunnen vergelijken, zou men het liefst zowel zoete, brakke als mariene sedimenten met hetzelfde organisme of (daar dit over het algemeen niet mogelijk is) althans met zo verwant mogelijk soorten willen testen. Aan de andere kant hebben soorten, die representatief zijn voor de lokale faunagemeenschap ook de voorkeur. Dit zijn soms tegenstrijdige belangen. Als naar de meest dominante benthische macrofaunagroepen in de zoete rijkswateren wordt gekeken dan betreft dat over het algemeen insecten (vooral chironomiden larven), oligochaeten en schelpdieren. In zoute sedimenten zijn naast de schelpdieren echter met name polychaeten en kreeftachtigen van belang. Voor de selectie van chronische sedimenttesten is daarom vooral gelet op soorten, die representatief zijn voor het milieu van waaruit de monsters afkomstig zijn.

6.3 Selectie van relevante taxa

Havenslib

Belangrijkste macrofaunagroepen in de Nederlandse brakke en mariene havens zijn (zowel op basis van biomassa als op basis van aantallen) wormen (met name polychaeta) en mollusken. Lokaal kunnen kreeftachtigen ook goed vertegenwoordigd zijn, vooral in de ondiepe delen. Van de genoemde soorten en geslachten is voor de slijkgarnaal *Corophium volutator* en de worm *Nereis virens* een (voorlopige) chronische test beschreven. Het tevens genoemde nonnetje (*Macoma balthica*) wordt aanbevolen in de ASTM richtlijn E1688-97 (ASTM, 1997) als testorganisme om bioaccumulatietesten in sediment mee uit te voeren.

Mariene sedimenten

Voor de zee (en dan vooral de zandige sedimenten) is uitgegaan van de soort(groep)en die voor het continentale plat zijn beschreven (zie §4.1). Dominante soorten op open zee zijn vooral de stekelhuidigen, met name de soort *Amphiura filiformis* (draadarmige slangster). Daarnaast kunnen ook polychaete wormen, kreeftachtigen en/of mollusken in het diepe deel van de Noordzee een belangrijk aandeel vormen. Voor geen van de in § 4.1 genoemde soorten of geslachten bestaan echter chronische bioassays. De Kleine Slangster (*Ophiura albida*) is in Denemarken gebruikt voor 6-daagse sedimenttesten waarin naar de overleving en vermijdingsgedrag wordt gekeken (Pedersen *et al.*, 2001). Zij bevelen de soort aan omdat deze gevoelig reageert op verontreinigingen in het sediment, met name het vermijdingsgedrag. Verder wordt opgemerkt dat naar mate de te bemonsteren lokatie dichter onder de kust gelegen zijn eerder kan worden uitgeweken naar soorten, die geselecteerd worden voor 'havenslib' dan wel 'brakke

sedimenten'. Dit geldt bijvoorbeeld ook voor de Waddenzee en wordt vooral gestuurd door de korrelgrootte verdeling van de te testen sedimenten.

Brakke sedimenten

Voor brakke gebieden is uitgegaan van de soort(groep)en die voor de kustgebieden van de Waddenzee en de Delta zijn beschreven (zie §4.1). Brakke gebieden worden in de Delta en de westelijke Waddenzee sterk gedomineerd door mollusken en in de oostelijke Waddenzee door wormen (polychaeten). Ook kreeftachtigen worden natuurlijk veelvuldig aangetroffen. Voor deze gebieden bestaan er groeitesten met de inheemse wormensoorten *Arenicola marina*, *Capitella capitata* en *Nereis diversicolor*. Daarnaast bestaat er een (voorlopige) reproductietest met de inheemse kreeftachtige *Corophium volutator*. Van de genoemde mollusken wordt het nonnetje (*Macoma balthica*) aanbevolen door de ASTM voor bioaccumulatiestudies (ASTM, 1997). De mossel (*Mytilus edulis*) is een van de aanbevolen soorten voor een 2-daagse test met bivalven, waarbij naar de embryonale ontwikkeling wordt gekeken (ASTM, 1998). De soort wordt ook aanbevolen voor bioaccumulatiestudies van in water opgeloste stoffen (ASTM, 1994), maar is vanuit zijn voedingspatroon minder geschikt voor sediment studies.

Een algemeen aandachtspunt voor alle bioassays met brakke sedimenten is dat de saliniteitspreferenties van de soort goed bekend moeten zijn. Zeker als gestreefd wordt naar chronische testen met gevoelige parameters als groei en reproductie, kan het onderscheid tussen een 'echte' brakwatersoort en een mariene soort, die ook in het brakke water kan voorkomen, van groot belang zijn. Naast de vraag waar een soort ecologisch gezien optimaal functioneert, gaat het bij dit onderscheid ook om bijvoorbeeld aspecten als de resistentie tegen periodieke schommelingen in het zoutgehalte.

6.4 Selectie van soorten

Zoals hierboven is aangegeven zijn voor alle drie de lokatietypen een drietal macrofauna groepen van belang, namelijk de polychaete wormen, schelpdieren en kreeftachtigen, terwijl aanvullend voor de open zee stekelhuidigen een belangrijke rol spelen. Bij het selecteren van testorganismen is daarom allereerst naar deze vier groepen gekeken. Daarnaast is aanvullend ook gekeken naar de toepasbaarheid van de andere in tabel 3.1 weergegeven testen.

Polychaete wormen

Zoals uit tabel 3.1 kan worden opgemaakt zijn er met twee soorten polychaete wormen reproductie testen beschreven (*Capitella capitata* en *Neanthes arenaceodentata*), terwijl aanvullend voor nog eens vijf soorten groei testen bekend zijn (*Nereis virens*, *N. diversicolor*, *Arenicola marina*, *Armandia brevis* en *Streblospio benedicti*). De wens om met inheemse dieren te werken beperkt de keuze vooralsnog tot een vijftal soorten (*Arenicola marina*, *Capitella capitata* en *Nereis virens*, *N. diversicolor*, *Streblospio benedicti*), waarbij *Capitella capitata* de enige is waarmee op dit moment een reproductie test is beschreven. Verder moet vermeld worden, dat op basis van ecologische eigenschappen als mede zijn voorkomen ook de Wapenworm (*Scoloplos armiger*) een mogelijk geschikt testorganisme is. Aangezien er dus vele inheemse soorten zijn die reeds als bioassay gebruikt worden of daarvoor mogelijk geschikt zijn, wordt de selectie toegespitst op uitsluitend inheemse soorten.

Refererend aan de in hoofdstuk 5 genoemde selectiecriteria, zijn vooral de volgende overwegingen bepalend geweest bij het opstellen van een selectie:

- A) Dieren die direct en veelvuldig detritus/sediment eten (zoals de Wadpier en de Wapenworm) hebben in principe de voorkeur boven dieren die (ook) andere voedseltypen gebruiken (zoals de verschillende *Nereis* soorten);
- B) Als een soort over een zeer brede range aan zoutgehalten kan voorkomen (zoals *N. diversicolor* en *Streblospio benedicti*) heeft deze de voorkeur in verband met een bredere toepasbaarheid;
- C) Een reproductie test (zoals met *Capitella capitata* en wellicht ook de Wapenworm) heeft de voorkeur boven een groeitest;
- D) Om reeds aanwezige kennis en ervaring zo goed mogelijk te gebruiken heeft het voorkeur om te werken met soorten waarmee reeds ervaring mee bestaat. Ervaring in Nederland wordt hierbij als extra voordeel gezien;
- E) In verband met de praktische toepasbaarheid heeft het voorkeur om te werken met op het oog zichtbare en makkelijk te hanteren soorten, die door hun grootte ook mogelijkheden bieden om bioaccumulatie als aanvullende parameter op te nemen.

Schematisch weergegeven als:

Soort	Overweging					Totaal aantal 'X'
	A	B	C	D	E	
<i>Arenicola marina</i>	X			X	X	3
<i>Capitella capitata</i>	X	(X) ($\pm 6 - 40\%$)	X	(X)		3
<i>N. diversicolor</i>		X (2-32%)		X	X	3
<i>N. virens</i>				X	X	2
<i>Streblospio benedicti</i>	X	X (0-40%)	(X)	(X)		3
<i>Scoloplos armiger</i>	X	X (2-32%)	(X)		X	3,5

Interpretatie

Zoals gezegd zou een reproductie test in principe de voorkeur hebben boven een groeitest. Er zijn in bovenstaand overzicht een drietal mogelijke organismen genoemd.

De beschreven reproductietest met *Capitella capitata* is voldoende interessant om eens ervaring mee op te doen, bijvoorbeeld middels een stage. Het feit, dat er op dit moment nog geen enkele ervaring mee bestaat in Nederland is echter een belangrijk argument om de ontwikkeling van deze test niet op de korte maar eerder op de (midden)lange termijn te voorzien. Er zijn bijvoorbeeld op voorhand enkele praktische problemen die niet direct en eenvoudig kunnen worden opgelost. Zo komt *C. capitata* in zeer veel sedimenten in Nederland voor. Dit maakt het een geschikt organisme inzake de relevantie, maar dit betekent tevens een praktisch probleem. Dit dier is namelijk vrij klein en kan daarom zeer moeilijk uit de te onderzoeken sedimenten verwijderd worden. De van nature voorkomende organismen kunnen zo het testresultaat beïnvloeden. Daarnaast lijkt uit vrij recente literatuur (Gamenick *et al.*, 1998) afgeleid te kunnen worden, dat de soort '*Capitella capitata*' uit een aantal verschillende (sub)soorten bestaat. Zolang dit taxonomisch dispuut niet is opgelost wordt de toepassing van deze soort in bioassays bemoeilijkt, daar verwacht kan worden dat allerlei fysiologische, ecotoxicologische en ecologische kenmerken zullen verschillen tussen de nog te benoemen 'nieuwe' soorten. Ook een tweetal andere genoemde polychaeten (*S. benedicti* en *S. armiger*) bieden echter mogelijkheden tot het ontwikkelen van een reproductie test.

De soort *Streblospio benedicti* is een estuarine, opportunistische kosmopoliet, die zeer talrijk kan voorkomen, onder andere in het Noordzeekanaal (Van Haren & van Wieringen, 1997; AquaSense, 2002b). Er zijn verder enkele studies uitgevoerd, waarbij deze soort in bioassays en/of bioaccumulatieonderzoek is toegepast (Chandler & Scott, 1991; Chandler *et al.*, 1997; Ferguson & Chandler, 1998). Volgens Chandler & Scott (1991) en Chandler *et al.* (1997) is de soort goed te kweken in het laboratorium. Alhoewel er geen reproductietesten met deze soort zijn beschreven, zou het kunnen kweken ons inziens betekenen dat reproductietesten in principe opgezet zouden kunnen worden. De zeer ruime tolerantie voor saliniteit (0-40‰) is een belangrijk voordeel van de soort, die de toepasbaarheid verhoogt. Er is echter op dit moment nog onvoldoende informatie over de sedimentvoorkeur en de gevoeligheid voor verontreinigingen van de soort om te kunnen beoordelen of de soort breed toepasbaar is. De soort is in ieder geval niet bekend van zandige marine sedimenten (persoonlijke communicatie dhr. T. van Haaren, AquaSense). Volgens Hartmann-Schröder (1996) moet de soort vooral als brakwaterorganisme worden gezien, die voorkomt op slibrijke bodems, onder andere in sterk vervuilde havens. Ze worden echter ook wel in zandige sedimenten aangetroffen. Een nadeel van deze polychaet is echter dat de soort vrij klein is (<1 cm lang). Zo bereikt de worm na een groei van 2 weken een lengte van circa 2 mm (Zobrist & Coull, 1994). Alhoewel dit het meten van effecten op de groei niet perse uitsluit, betekent het wel dat er aanvullende apparatuur voor benodigd is.

Scoloplos armiger is vooral een zandminnende soort (Hartmann-Schröder, 1996), zodat deze soort wellicht vooral bruikbaar is voor zandige marine sedimenten. Verder kan de soort ook zeer lage zoutgehaltes weerstaan (tot aan oligohalien). Het is echter niet een typische brakwatersoort en hij heeft een duidelijke voorkeur voor de euryhaline regio (ca. 30‰). De tolerantie voor verlaagde zoutgehaltes zo daarom aanvullend gekarakteriseerd moeten worden.

Samenvattend betekent dit dat voor slibrijke sedimenten de voorkeur uit gaat naar hetzij *C. capitata* hetzij *S. benedicti*, terwijl voor zandige sedimenten *S. armiger* de voorkeur heeft. Een meer definitieve keuze tussen *C. capitata* of *S. benedicti* kan op dit moment niet goed gemaakt worden. Beide soorten hebben zo hun voor- en nadelen. Het opzetten van een reproductietest zal eerder een kwestie van de middenlange tot lange termijn dan van de korte termijn zijn. Om de benodigde set bioassays ook op de korte termijn te ontwikkelen gaat vooralsnog de voorkeur uit naar een groeitest. Zoals uit bovenstaand overzicht blijkt komen hier vooral *Arenicola marina* en *Nereis diversicolor* voor in aanmerking. Voor *A. marina* komt dit vooral doordat er met dit dier reeds veel ervaring bestaat (alhoewel het hier vooralsnog om 10-daagse testen gaat) en doordat het een echte sediment-eter is. De toepasbaarheid van *N. diversicolor* wordt vooral hoog geacht doordat dit organisme tot in ieder geval een zoutgehalte van 2‰ gebruikt kan worden.

Conclusies

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
Korte en midden-lange termijn (<2006)			
1 ^{ste} keus	<i>Arenicola marina</i>	<i>Nereis diversicolor</i>	<i>Arenicola marina</i>
2 ^{de} keus	<i>Nereis diversicolor</i>		<i>Nereis diversicolor</i>
3 ^{de} keus			
Lange termijn			
en/of eens	<i>Streblospio benedicti</i>	<i>Streblospio benedicti</i>	<i>Scoloplos armiger</i>
uitproberen	<i>Capitella capitata</i>	<i>Capitella capitata</i>	

Kreeftachtigen

Zoals uit tabel 3.1 kan worden opgemaakt zijn er met zes verschillende amphipoden (*Ampelisca abdita*, *Grandidierella lignorum*, *G. lutosus*, *G. japonica*, *Leptocheirus plumulosus* en *Corophium volutator*) en vijf verschillende copepoden testen beschreven. Opvallend genoeg hebben vrijwel al deze testen betrekking op de reproductie. Dit is een duidelijk verschil met bovengenoemde polychaete wormen. Verder valt op, dat de testen met de copepoden allemaal door één onderzoeksgroep zijn opgeschreven, terwijl met veel van de genoemde amphipoden soorten een zeer ruime ervaring bestaat. Deze laatste groep verdienen (zeker op korte termijn) dan ook zeker de voorkeur. Daarnaast vormen de amphipoden een zeer belangrijke voedselbron voor allerlei organismen. In aanvulling op de reeds genoemde amphipoden soorten waarmee bioassays zijn uitgevoerd, is in hoofdstuk 4 aangegeven dat ook gekeken zou kunnen worden naar testen met *Corophium arenarium* of *Bathyporeia* soorten, bijvoorbeeld *B. elegans*, *B. tenuipes*, *B. sarsi* of *B. pelagica*. Ten opzichte van de veel gebruikte *Corophium volutator* is het voordeel van met name *C. arenarium* en mogelijk ook *Bathyporeia* soorten vooral gelegen in het feit, dat *Corophium volutator* minder geschikt is voor typisch zandige sedimenten. Hoewel de ervaring met bioassays voor *Bathyporeia* soorten alsmede *C. arenarium* beperkt (of zelfs afwezig) is, lijken de genoemde soorten in principe geschikt om chronische bioassays mee te ontwikkelen.

Refererend aan de in hoofdstuk 5 genoemde selectiecriteria, zijn vooral de volgende overwegingen bepalend geweest bij het opstellen van een selectie:

- A) Inheemse dieren (zoals *Corophium* en *Bathyporeia*) hebben de voorkeur;
- B) Als een soort over een brede range aan zoutgehalten kan voorkomen (zoals *C. volutator*) heeft deze de voorkeur in verband met een bredere toepasbaarheid;
- C) Om reeds aanwezige kennis en ervaring zo goed mogelijk te gebruiken heeft het voorkeur om te werken met soorten waarmee reeds ervaring mee bestaat. Ervaring in Nederland wordt hierbij als extra voordeel gezien;
- D) Een reproductie test heeft de voorkeur boven een groeitest;

Schematisch weergegeven als:

Soort	Overweging				Totaal aantal 'X'
	A	B	C	D	
<i>Ampelisca abdita</i>				X	1
<i>Bathyporeia spec.</i>	X		(X)		1,5
<i>Corophium volutator</i>	X	X (4-40%)	X	X	4
<i>Corophium arenarium</i>	X	X (15-25%) ¹			2
<i>Grandidierella lignorum</i>		?		X	1
<i>Grandidierella lutosa</i>		?		X	1
<i>Grandidierella japonica</i>					0
<i>Leptocheirus plumulosus</i>		X (5-30%)		X	2

¹: range verdient nadere aandacht

Interpretatie

Uit bovenstaand schema blijkt overduidelijk dat voor de huidige situatie het verder ontwikkelen van de chronische test met *Corophium volutator* veruit de voorkeur verdient. Verder zou *Corophium arenarium* op de iets langere termijn op geschiktheid moeten worden onderzocht, vooral doordat deze soort meer geschikt is voor zandige sedimenten. Mochten chronische testen met *C. volutator* en *C. arenarium* in de nabije toekomst om wat voor reden dan ook toch ongeschikt blijken te zijn (althoewel het er vooralsnog met *C. volutator* zeer hoopvol uitziet), dan zou uitgeweken kunnen worden naar *Bathyporeia* soorten. Mochten ook deze organismen niet geschikt blijken, dan kan uitgeweken worden naar een uitheems organisme. In dat geval heeft *Leptocheirus* op voorhand de voorkeur, vooral in verband met de saliniteitstolerantie.

Conclusies

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
Korte en middenlange termijn (<2006)			
1 ^{ste} keus	<i>C. volutator</i>	<i>C. volutator</i>	<i>C. arenarium</i>
2 ^{de} keus			<i>Bathyporeia spec.</i>
3 ^{de} keus			
Lange termijn en/of eens uitproberen			

Schelpdieren (Tweekleppigen en slakjes / weekdieren)

Alhoewel er met meerdere soorten tweekleppigen fertilisatie en/of embryonale ontwikkelingstesten zijn ontwikkeld, bestaan er vooralsnog geen testen waar het gehele reproductieproces een integraal onderdeel van de bioassays uitmaakt. Gezien de wijze van reproducen (het vrijlaten van grote hoeveelheden gameten in het zeewater) zal dit ook moeilijk te realiseren zijn. Voor deze diergroep zal men zich daarom vooralsnog moeten richten op chronische testen, die zich richten op het waarnemen van effecten op de groeisnelheid. Over het algemeen groeien tweekleppigen echter vrij traag, waardoor dit een moeilijk te bepalen parameter is. Eventueel kan aanvullend ook gekeken worden naar andere parameters als de filtratiesnelheid of de zogenaamde "scope for growth". Er zijn echter enkele soorten die sneller groeien. De soorten die nu gebruikt zijn in chronische groeitesten behoren tot deze laatste categorie. Dit betreft *Mulinia lateralis*, *Mercenaria mercenaria* en *Scrobicularia plana* (zie tabel 3.1). Binnen deze drie soorten is *Scrobicularia plana* de enige inheemse soort. Aanvullend is in paragraaf 4.2 gezocht naar andere inheemse schelpdieren die wellicht geschikt kunnen zijn als testorganisme in bioassays. Dit resulteerde in een

tweetal tweekleppigen namelijk de Witte dunschaal *Abra alba* en het Nonnetje *Macoma balthica*. Alternatieve soorten zoals de brakwaterkokkel *Cerastoderma glaucum* en de exoot maar inmiddels veel in Nederland voorkomende oester *Crassostrea gigas* verdienen niet de voorkeur omdat beide soorten suspensiefeeders zijn en dus niet representatief voor blootstelling via het sediment. Verder is in hoofdstuk 4 aandacht besteed aan enkele slakjes. Vooral *Hydrobia ventrosa* is een mogelijk zeer geschikte kandidaat. Alhoewel dit natuurlijk geen tweekleppige is, is het binnen de schelpdieren wellicht een meer geschikte kandidaat voor brakke sedimenten dan de genoemde tweekleppigen, aangezien deze laatste toch meestal meer typisch mariene soorten zijn, die ook in brakke systemen kunnen voorkomen. *H. ventrosa* kan daarentegen als een meer typische brakwater soort gezien worden met een optimaal voorkomen bij zoutgehalten van circa 10 – 15‰. Punt van aandacht bij deze soort zal de naar verwachting vrij lage groeisnelheid snel, waardoor testen wellicht vrij lang zullen moeten duren.

Refererend aan de in hoofdstuk 5 genoemde selectiecriteria, zijn vooral de volgende overwegingen bepalend geweest bij het opstellen van een selectie:

- A. Inheemse dieren (zoals *Scrobicularia plana* en *Macoma balthica*) hebben de voorkeur;
- B. Als een soort over een brede range aan zoutgehalten kan voorkomen, heeft deze de voorkeur in verband met een bredere toepasbaarheid;
- C. Het heeft de voorkeur om te werken met een soort waarmee een groeitest reeds is uitgevoerd;
- D. Om reeds aanwezige kennis en ervaring zo goed mogelijk te gebruiken heeft het voorkeur om te werken met soorten waarmee (liefst in Nederland) reeds ervaring mee bestaat;
- E. Aangezien gestreefd moet worden naar een test, die zo mogelijk het hele jaar gebruikt kan worden, wordt kennis en praktijk ervaring in het kweken van de dieren in het laboratorium als sterk voordeel gezien;
- F. Een 'echte' sediment eter heeft de voorkeur boven een facultatieve deposit feeder dan wel een filterfeeder;

Schematisch weergegeven als:

Soort	Overweging						Totaal aantal 'X'
	A	B	C	D	E	F	
<i>Abra alba</i>	X					X	2
<i>Cerastoderma glaucum</i>	X	X (7 - 32‰)					2
<i>Crassostrea gigas</i>	X			X	X		3
<i>Hydrobia ventrosa</i>	X	X (1 - 29‰) ¹				X	3
<i>Macoma balthica</i>	X	X (<15 - >30‰)	X	X	X	(X)	4,5
<i>Mercenaria mercenaria</i>		X (11 - 35‰)	X		X	(X)	3,5
<i>Mulinia lateralis</i>		X (7 - >32‰)	X		X	?	3
<i>Scrobicularia plana</i>	X	X (8 - 30‰)	X			(X)	3,5

¹ : range verdient nadere aandacht

Interpretatie

Op basis van ruime ervaring in het buitenland met acute testen, bioaccumulatietesten en testen waarin naar het ingraaf- en vermijdingsgedrag is gekeken (o.a. McGreer, 1979) alsmede de ecologische relevantie voor het Nederlandse ecosysteem lijkt met name het nonnetje (*Macoma balthica*) geschikt om een chronische sediment test mee te ontwikkelen. Daarnaast speelt hierbij ook als voordeel, dat

de soort op dit ogenblik op het NIOZ succesvol wordt gekweekt en dat de autecologie van deze soort in detail bekend is. Ten opzichte van de Witte dunschaal *A. alba* is het nadeel van het Nonnetje dat deze bij voorkeur suspensiefeeder is, maar dit nadeel weegt a) op tegen de duidelijk ruimer voorhanden zijnde ervaring en kan b) verkleind worden door er in de proefopzet rekening mee te houden en niet teveel fytoplankton als voedsel aan te bieden. *A. alba* wordt wel reeds gebruikt in acute testen (Strömgen *et al.*, 1993; PARCOM-richtlijn, beschreven in Bowmer (1993).

Naast *Macoma balthica* biedt ook *Scrobicularia plana* goede mogelijkheden. Het voordeel van *S. plana* boven *M. balthica* is dat er met *S. plana* in het verleden reeds chronische groeitesten zijn uitgevoerd. *S. plana* is verder zeer talrijk in slibrijk sediment en ook dicht langs de kust komt ze voor. Op zandige sedimenten wordt *S. plana* veel minder vaak aangetroffen. Dit in tegenstelling tot het Nonnetje, die voorkomt op zowel slibrijke als zandige sedimenten, hoewel de soort ook een lichte voorkeur lijkt te hebben voor de wat meer slibrijke sedimenten (www.marlin.ac.uk). Net zoals het Nonnetje is ook *S. plana* een facultatieve deposit feeder. Dit wil zeggen dat de soort, als het aanbod aan fytoplankton laag is, overschakelt op sediment als voedselbron. Zoals gezegd kan dit nadeel verkleind worden door er bij het opzetten van experimenten rekening mee te houden. Een beperkende factor voor de toepasbaarheid van *S. plana* zou de verkrijgbaarheid kunnen zijn. Het is onbekend of de soort gekweekt kan worden. Indien dit niet mogelijk is, kan de soort in het veld verzameld worden, maar volgens Ruiz *et al.* (1994) wordt de toepasbaarheid vooral in de noordelijke wateren beperkt, omdat de soort daar slechts eenmaal per jaar reproduceert en juveniele individuen slechts enkele maanden per jaar verzameld kunnen worden. Verder geldt als punt van zorg dat de soort bekend staat als een 'typische zee bewoner'. Het feit dat de soort ook in brakke gebieden blijkt voor te komen, kan betekenen dat het hier om aangepaste populaties gaat of dat deze dieren daar onder een vrij continue stress van zout leven. Dit verdient nadere aandacht.

Voor de brakke wateren biedt het slakje *Hydrobia ventrosa* wellicht betere mogelijkheden dan een aantal tweekleppigen om op de lange termijn testen mee te ontwikkelen. *H. ventrosa* is een veel voorkomende soort, die als voordeel heeft dat zij een brede tolerantie voor saliniteit en sedimenttypen heeft, hetgeen de toepasbaarheid vergroot. Bovendien is de soort een deposit feeder. Een nadeel is dat er voor zover bekend geen ervaring is met testen met dit slakje (maar wel met een vergelijkbare slakje uit het zoete water, *Potamopyrgus*).

Concluderend lijkt het goed om in eerste instantie de aandacht op het ontwikkelen van een groeitest met het nonnetje *Macoma balthica* te richten. Van belang is te onderzoeken wat de toepasbaarheidsgrenzen wat betreft saliniteit en sedimenttype zijn. De toepasbaarheid voor brakke wateren is waarschijnlijk beperkt. Voor deze gebieden is *Hydrobia ventrosa* wellicht meer geschikt, maar voor deze soort bestaat nog geen ervaring met het uitvoeren van testen. Een ander alternatief zou de soort *Scrobicularia plana* kunnen zijn. Met deze soort zijn wel reeds testen uitgevoerd, maar er geldt in sterke mate dat de toepasbaarheidsgrenzen onder andere ten aanzien van de saliniteit en het sedimenttype verder onderzocht dienen te worden.

Conclusies

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
Korte en midden-lange termijn (<2006)			
1ste keus	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>
2de keus	<i>Scrobicularia plana</i>	<i>Hydrobia ventrosa</i>	<i>Abra alba</i>
3de keus		<i>Scrobicularia plana</i>	
Lange termijn en/of eens uitproberen			

Stekelhuidigen

Zoals uit tabel 3.1 kan worden opgemaakt zijn er met een drietal soorten stekelhuidigen testen beschreven waarbij de groei van de dieren als (een van de) parameters wordt meegenomen. Dit betreft in alle drie de gevallen uitheemse dieren, namelijk *Dendraster excentricus*, *Amphiodia urtica* en *Lytechinus pictus*. De ervaring met stekelhuidigen in Nederland heeft vooral betrekking op een drietal soorten namelijk de Zeeklit *Echinocardium cordatum*, de Zeester *Asterias rubens* en de Kleine zeeappel *Psammechinus miliaris*. Experimenten met de Kleine zeeappel hebben betrekking op fertilisatie testen en zijn daarmee minder bruikbaar voor een chronische sedimenttest. De zeeklit heeft een ruime tolerantie ten aanzien van sedimenttypen (van slib tot grof zand), terwijl het voorkomen van de zeester zich beperkt tot grof zand en harde substraten (gravel en rotsen). Verder heeft de Zeeklit *E. cordatum* ten opzichte van *A. rubens* als groot voordeel dat deze soort een meer directe relatie met het sediment heeft en zijn voedsel uit het sediment haalt, terwijl de zeester een stuk hoger in de voedselketen zit. Zo eet de zeester bijvoorbeeld veel mosselen, die wellicht (aangezien het in veel gevallen filter feeders betreft) meer direct aan de waterkwaliteit zijn te relateren. De ervaring met de Zeeklit beslaat op dit moment vooral de 14 daagse overleving en conditie test (RIKZ-Specie 03). Er is echter ook wel eens een test van enkele weken uitgevoerd. Een praktisch probleem bij de Zeeklit is de verkrijgbaarheid van de dieren. Naast het feit, dat de dieren niet altijd op dezelfde plekken verzameld kunnen worden, zijn er ook jaren met een zeer lage dichtheid van Zeeklitten van een voor de testen geschikte maat. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat de in de Noordzee aanwezige dieren gemiddeld 2-3 keer per tien jaar reproduceren. Bij selectie van de Zeeklit als mogelijk geschikt testorganisme verdient het daarom aanbeveling om te kijken naar de mogelijkheden om dit organisme te kweken. Een ander punt van aandacht voor testen met de Zeeklit is het opmerkelijke regionale verschil in respons bij op het oog vrij vergelijkbare sedimenten (qua sedimentstructuur en verontreinigingsgraad; zie AquaSense, 2002a). Aanvullend is gekeken naar mogelijk andere geschikte, inheemse stekelhuidigen. Dit betreft dan vooral de Kleine slangster *Ophiura albida*. Deze dieren hebben een voorkeur voor fijn zandige sedimenten, alwaar ze als depositfeeder foerageren op detritus. De dieren groeien over het algemeen vrij snel en kunnen een leeftijd van 3 jaar bereiken. De testopzet van testen met stekelhuidigen als de Kleine slangster zou vergelijkbaar kunnen zijn met de in tabel 3.1 beschreven testopzet voor uitheemse soorten (Thompson *et al.* 1989; 1991), waarin overleving, groei en gonadeproductie wordt bepaald. Als aanvullende parameter kan de conditie bepaald worden, gemeten als de snelheid waarmee de dieren zich omdraaien als ze ondersteboven worden gelegd. Ook is het mogelijk naar vermijdingsgedrag te kijken zoals door Thompson *et al.*

(1991) en Pedersen *et al.* (2001) is gedaan. Voor wat betreft de parameter gonadeproductie bestaat binnen Nederland reeds ervaring met de soort *Asterias rubens* (Den Besten *et al.*, 2001). Het betreft hier onder meer fertilisatietesten met in het veld verzamelde dieren. Dergelijke fertilisatietesten zijn naar verwachting ook bruikbaar voor andere soorten zoals de Kleine slangster.

Refererend aan de in hoofdstuk 5 genoemde selectiecriteria, zijn vooral de volgende overwegingen bepalend geweest bij het opstellen van een selectie:

- A) Inheemse dieren (zoals *Echinocardium* en *Ophiura*) hebben de voorkeur;
- B) Om reeds aanwezige kennis en ervaring zo goed mogelijk te gebruiken heeft het voorkeur om te werken met soorten waarmee (liefst in Nederland) reeds ervaring mee bestaat;
- C) Stekelhuidigen hebben diverse voedselstrategieën. Een voedselstrategie waarbij het contact met het sediment maximaal is wordt als voordeel gezien.

Stekelhuidigen hebben vooral een dominant voorkomen in de open zee en zijn minder van belang voor brakwatergebieden. Zouttolerantie van de organismen is daarmee juist als een minder essentieel kenmerk gezien.

Schematisch weergegeven als:

Soort	Overweging			Totaal aantal 'X'
	A	B	C	
<i>Amphiodia urtica</i>		(X)	(X) ?	1
<i>Asterias rubens</i>	X	X		2
<i>Dendraster excentricus</i>		(X)	(X) ?	1
<i>Echinocardium cordatum</i>	X	X	X	3
<i>Lytechinus pictus</i>		(X)	(X)	1
<i>Ophiura albida</i>	X		X	2

Interpretatie

Op dit moment bestaat er te weinig ervaring met inheemse stekelhuidigen om reeds vergaande conclusies te doen over de mogelijkheden voor het uitvoeren van chronische sediment testen. In onderstaand schema is toch de voorkeur aan inheemse dieren gegeven. Mocht dit in de nabije toekomst niet zijn te realiseren, dan zou gekeken kunnen worden naar de mogelijkheden tot het implementeren van testen met uitheemse dieren. Gezien het feit, dat ook in het buitenland de benodigde dieren veelal in het veld worden verzameld, zal dit praktisch gezien echter niet erg eenvoudig zijn.

Conclusies

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
Korte en midden lange termijn (<1996)			
1 ^{ste} keus	<i>Echinocardium cordatum</i>	Niet perse noodzakelijk	<i>Echinocardium cordatum</i>
2 ^{de} keus			
3 ^{de} keus			
Lange termijn en/of eens uitproberen	<i>Ophiura albida</i>		<i>Ophiura albida</i>

Andere organismen / restgroep

Zoals uit tabel 3.1 kan worden opgemaakt zijn er naast de hierboven genoemde taxonomische groepen ook testen beschreven met nematoden. Dit is een interessante groep organismen, vooral omdat er met deze dieren reproductie testen zijn uit te voeren. Binnen AquaSense wordt op dit moment gewerkt aan een chronische sediment test voor zoetwater monsters, waarbij gebruik wordt gemaakt van *Caenorhabditis elegans*. Dit is mogelijk interessant omdat op basis van een mondelinge mededeling van mevr. Heise van de TU Hamburg deze soort wellicht bruikbaar is tot 20%. Het lijkt op dit moment aan te bevelen om de ervaring vanuit het zoete water te gebruiken om de haalbaarheid van een zoutwater tegenhanger te beoordelen. Zeker op de iets langere termijn zou dit echter een punt van aandacht kunnen worden.

Verder is nog aandacht besteed aan *Cumacea*, zoals het kommakreeftje. Ook deze groep organismen biedt mogelijkheden tot het ontwikkelen van een reproductietest. Er bestaat tot nu toe echter geen ervaring met deze groep organismen, zodat een eventuele test 'van de grond af aan' moet worden ontwikkeld.

6.5 De te ontwikkelen testbatterij

De selectie van soorten, die in paragraaf 6.4 is uitgevoerd, leidt tezamen tot de selectie van een te ontwikkelen testbatterij. In de onderstaande tabel wordt de keuze voor de testbatterij samengevat, waarbij zowel de eerste keus als de mogelijk alternatieve soorten worden aangegeven.

Uit de tabel blijkt dat in principe (mochten alle 'eerste keus' testen goed uitvoerbaar blijken) met zes soorten alle mogelijke sedimenttypen getest kunnen worden met tenminste drie whole-sediment testen per sedimenttype. Dit betreft vooralsnog vooral groeitesten, terwijl bij de kreeftachtigen ook reproductie als testparameter wordt meegenomen. De onder 2^{de} keus genoemde organismen omvatten enkele soorten, die meer mogelijkheden bieden tot het ontwikkelen van een test gericht op de reproductie. Dit betreft dan vooral enkele polychaete wormen als *Capitella* of *Streblospio* dan wel nematoden.

De onder de 1^{ste} keus genoemde testen zijn niet allemaal even ver ontwikkeld. De op dit moment verst ontwikkelde test is de groeitest met *Nereis* soorten (vooral *N. virens* maar steeds meer ook *N. diversicolor*). Deze kan met vrij grote zekerheid op korte termijn operationeel zijn (in ieder geval voor 2006), alhoewel de testmethode zoals die nu is beschreven (RIKZ, 2000) op enkele punten zal moeten worden aangepast (zie ook de recent in opdracht van het RIKZ uitgevoerde evaluatie van bestaande bioassays; AquaSense, 2002a). Ook de reproductie test met *C. volutator* begint in een redelijk ver ontwikkeld stadium te komen. Zeker gelet op de goed gestandaardiseerde en veel toegepaste acute test met *C. volutator* (zie ook de recent uitgevoerde evaluatie; AquaSense, 2002a), heeft het ontwikkelen van een chronische test met dit organisme veel voordelen. Voordat de test geïmplementeerd kan worden zal echter nog veel onderzoek nodig zijn. Dit zal zich in eerste instantie moeten richten op aspecten als het verschil in gevoeligheid t.o.v. de 10-daagse test, de variatie in testresultaat tussen replica's en testen, eventuele seizoensafhankelijke reproductie en de verkrijgbaarheid van juvenielen in de winter. Gezien de overeenkomstige levensstijl van *C. arenarium* lijkt het ontwikkelen van een chronische test met deze *Corophium* soort in principe ook goed mogelijk. Logischerwijs zal men hiermee pas beginnen, nadat de test

met de beter bekende *C. volutator* een stadium verder in de ontwikkeling is. Chronische testen met *Macoma* dan wel *Echinocardium* zijn nog niet ontwikkeld en zullen dus nog veel aandacht nodig hebben wil implementatie voor 2006 gerealiseerd kunnen worden. Voor *Macoma* zal in eerste instantie vooral aandacht besteed moeten worden aan het jaarrond verkrijgen van relatief kleine exemplaren, het vaststellen van de groeisnelheid en de zouttolerantie. Ook voor *Echinocardium* is de verkrijgbaarheid van kleine exemplaren op dit moment een van de grootste praktische problemen, die moeten worden opgelost wil implementatie mogelijk zijn. Aandacht zou zich daarom moeten richten op de mogelijkheden om deze dieren in het laboratorium te kweken.

Binnen de onder 2^{de} keus vermelde organismen verdienen vooral de testen met de polychaete wormen (maar dan gericht op reproductie) en nematoden aandacht, omdat deze er voldoende kansrijk uitzien om op middenlange termijn een tweede whole-sediment reproductie test te implementeren. De exacte testopzet, alsmede de randvoorwaarden ten aanzien van onder andere saliniteit en sedimenttype, zijn aspecten die hierbij onderzocht moeten worden.

	Havenslib	Brakke sedimenten	Zandige mariene sedimenten
1^{ste} keus			
(verdere ontwikkeling op korte termijn wenselijk; implementatie van tenminste 3 beoogd < 2006)			
Wormen	<i>Arenicola marina</i>	<i>Nereis diversicolor</i>	<i>Arenicola marina</i>
Kreeftachtigen	<i>Corophium volutator</i>	<i>Corophium volutator</i>	<i>Corophium arenarium</i>
Weekdieren	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>	<i>Macoma balthica</i>
Stekelhuidigen	<i>Echinocardium cordatum</i>	-	<i>Echinocardium cordatum</i>
Overig			
2^{de} keus			
(mogelijk geschikte organismen, indien in bovenstaand overzicht organismen / testen komen te vervallen)			
Wormen	<i>Streblospio benedicti</i>	<i>Streblospio benedicti</i>	<i>Scoloplos armiger</i>
	<i>Capitella capitata</i>	<i>Capitella capitata</i>	
Kreeftachtigen			<i>Bathyporeia spec.</i>
Weekdieren	<i>Scrobicularia plana</i>	<i>Hydrobia ventrosa</i>	<i>Abra alba</i>
Stekelhuidigen	<i>Ophiura albida</i>		<i>Ophiura albida</i>
Overig	Een nematodensoort	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Een nematodensoort



Slikgarnaal (*Corophium volutator*)



Zeeklit (*Echinocardium cordatum*)



Wadpier (*Arenicola marina*)



Zandzager (*Nereis diversicolor*)



Nonnetje (*Macoma balthica*)

Literatuur

- Anderson, B.S., J.W. Hunt, B.M. Phillips, S. Tudor, R. Fairey, J. Newman, H.M. Puckett, M. Stephenson, E.R. Long & R.S. Tjeerdema (1998). Comparison of marine sediment toxicity test protocols for the amphipod *Rhepoxynius abronius* and the polychaete worm *Nereis* (Neanthes) *arenaceodentata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(5): 859-866.
- American Society for Testing and Materials, ASTM (1991). Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs, In: Annual Book of ASTM Standards, Water and Environmental Technology, Vol.11.04. (Philadelphia: American Society for Testing and Materials). E724-89.
- American Society for Testing and Materials, ASTM (1994). Designation E1022-94. Standard guide for conducting bioconcentration tests with fishes and saltwater bivalve mollusks. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, PA, USA.
- American Society for Testing and Materials, ASTM (1997). Designation E1688-97. Standard guide for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, PA, USA.
- American Society for Testing and Materials, ASTM (1998). Designation E724-98. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, PA, USA.
- American Society for Testing and Materials, ASTM (1999). Designation E1611-94. Standard guide for conducting sediment toxicity tests with marine and estuarine annelids. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, PA, USA.
- AquaSense (1996). Ecotoxicologische monitoring van Loswal Noord. De aanvangssituatie. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee. AquaSense rapportnr. 0832.
- AquaSense (1998). Literatuur onderzoek naar *in vivo* testen voor mariene sedimenten. Projectnr. 1333. In opdracht van het Rijksinstituut voor Kust en Zee.
- AquaSense (1999). *In situ* bioassays met *Nereis virens*. Ontwikkeling en uitvoering. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ). AquaSense rapportnummer 99.1374.
- AquaSense (2000a). *In situ* bioassays met *Nereis virens* in de Waddenzee. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ). AquaSense rapportnummer 00.1455.
- AquaSense (2000b). Ecotoxicologisch profiel van de slijkgarnaal *Corophium volutator*. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ). AquaSense rapportnummer 00.1475.
- AquaSense (2001). Een ecotoxicologisch onderzoek met sediment uit het Kanaal door Walcheren. In opdracht van: Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling. AquaSense rapportnr. 1904.
- AquaSense (2002a). Evaluatie van bioeffectmetingen in veldsedimenten. Toepassing in havens, brak water en het mariene milieu. In opdracht van: RIKZ Veldlaboratorium Jacobahaven, in het kader van het project WONS*TOX-effect. Rapportnummer: 2002.1699.
- AquaSense (2002b). De relatie tussen bodemfauna en zuurstofarmoede in het Noordzeekanaal. Onderzoeksjaren 2000-2001. Nota ANW 01.01. In opdracht van Rijkswaterstaat Directie Noord-Holland. AquaSense rapportnummer 1829-2.

- Bachelet, G. and Cornet, M. (1981). Some data of the life history of *Abra alba* (Molusca, bivalvia) in the southern part of the bay of Biscay. Ann. Inst. Oceanogr. Paris 57: 111-123.
- Blanck, H. (1984). Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals. Ecology Bulletin 36: 107-119.
- Bosselmann, A. (1991). Recruitment and post larval growth of some macrozoobenthos species in the German Bight. Meeresforschung 33: 141-148.
- Bowmer, C.T. (1993). Method for the assessment of acute toxicity of contaminated sediment using the burrowing sea urchin *Echinocardium cordatum*. Test guideline for PARCOM sediment reworker ring test, TNO-IMW, Delft, The Netherlands.
- Brils, J.M. & P.J. den Besten (1995). Bioassays: het orakel van de ecotoxicologie? In opdracht van: Programma Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems (POSW) en Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA). AquaSense rapport 94.0681.
- Brongers, I., H. de Vries, J. van den Roovaart & C. van der Kleij (1998). Rijn- en Noordzeeactieplan: industriële emissies naar het oppervlaktewater 1985-1995. FWVO rapport 98.02.
- Burgess, R.M., K.A. Schweitzer, R.A. McKinney & D.K. Phelps (1993). Contaminated marine sediments: water column and interstitial toxic effects. Environmental Toxicology and Chemistry 12: 127-138.
- Burgess, R.M. & G.E. Morrison (1994). A short-exposure, sublethal, sediment toxicity test using the marine bivalve *Mulinia lateralis*: Statistical design and comparative sensitivity. Environmental Toxicology and Chemistry 13(4): 571-580.
- Carr, R.S. & D.C. Chapman (1992). Comparison of solid-phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine and estuarine sediments. Chem. Ecol. 7: 19-30.
- Casillas, E., D. Weber, C. Haley & S. Sol (1992). Comparison of growth and mortality in juvenile sand dollars (*Dendraster excentricus*) as indicators of contaminated marine sediments. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 559 – 569.
- Chandler, G.T. (1990). Effects of sediment-bound residues of the pyrethroid insecticide fenvalerate on survival and reproduction of meiobenthic copepods. Marine Environmental Research 29: 65-76.
- Chandler, G.T. & G.I. Scott (1991). Effects of sediment-bound Endosulfan on survival, reproduction and larval settlement of meiobenthic polychaetes and copepods. Environmental Toxicology and Chemistry 10: 375-382.
- Chandler, G. T., M. R. Shipp & T. L. Donelan (1997). Bioaccumulation, growth and larval settlement effects of sediment-associated polynuclear aromatic hydrocarbons on the estuarine polychaete, *Streblospio benedicti* (Webster). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 213: 95-110.
- Chapman, P.M. & R. Fink (1984). Effects of Puget sound sediments and their elutriates on the life cycle of *Capitella capitata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 33: 451-459.
- Chapman, P.M., R.C. Swartz, B. Roddie, H.L. Phelps, P. van den Hurk & R. Butler (1992). An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. Marine Ecology Progress Series 91: 253-264.
- Connell, A.D. & D.D. Airey (1979). Life-cycle bioassays using two estuarine amphipods, *Grandidierella lutosa* and *G. lignorum*, to determine detrimental levels of marine pollutants. South African Journal of Science 75: 313-314.
- Connell, A.D. & D.D. Airey (1982). The chronic effects of fluoride on the estuarine amphipods *Grandidierella lutosa* and *G. lignorum*. Water Res. 16: 1313-1317.

- Dahm, C. (1993). Growth, production and ecological significance of *Ophiura albida* and *O. ophiura* (Echinodermata: Ophiuridae) in the German Bight. *Marine Biology* 116: 431-437.
- De Graaf, P.J.F., M. Tonkes, E.V. ten Kate & J. Graansma (2000a). Handreiking bepaling acute toxiciteit van effluënten. FWVO-nota 00.06. FWVO Functionele werkgroep Verontreiniging Oppervlaktewateren, Rijkswaterstaat.
- De Graaf, P.J.F., J. Graansma, E.V. ten Kate, M. Tonkes & H. Maas (2000b). Toetsing van voorlopige handreiking toepassing acute toxiciteitstesten. Resultaten van landelijk onderzoek. FWVO rapport 00.03.
- Dekker, R. (1992). Het macrozoobenthos op negen raaien in de Waddenzee en de Eems-Dollard in 1992. NIOZ-Rapport 1993-3. 42 pp.
- Dekker, R. (1995). Het macrozoobenthos op twaalf raaien in de Waddenzee en de Eems-Dollard in 1994. NIOZ-Rapport 1995-1. 53 pp.
- Dekker, R. (1998). Het macrozoobenthos op twaalf raaien in de Waddenzee en de Eems-Dollard in 1997. NIOZ-Rapport 1998-3. 53 pp.
- Dekker, R. & W. de Bruin (1999). Het macrozoobenthos op twaalf raaien in de Waddenzee en de Eems-Dollard in 1998. NIOZ-Rapport 1999-2. 53 pp.
- Dekker, R. (2000). Het macrozoobenthos op twaalf raaien in de Waddenzee en de Eems-Dollard in 1999. NIOZ-Rapport 2000-8. 73 pp.
- Den Besten, P.J., J.F. Postma, S. de Valk, M. Dubbeldam & J.M. Everaarts (2001). Environmental monitoring in the North Sea by combining biomarker studies in the sea star *Asterias rubens* with sediment quality assessment based on sea urchin bioassays. In: Biomarkers in marine organisms: a practical approach, eds Ph. Garrigues, H. Barth, C.H. Walker & J.-F. Narbonne, Elsevier Publishers, Amsterdam, 2001. pp 279-330.
- De Zwart, D., Rutgers, M. & J. Notenboom (1999). Bepaling van het lokatiespecifieke ecologische risico van bodemverontreiniging: een opzet voor een beoordelingssystematiek. RIVM rapport 711701011.
- Dillon, T.M., D.W. Moore & A.B. Gibson (1993). Development of a chronic sublethal bioassay for evaluating contaminated sediment with the marine polychaete *Nereis* (Neanthes) *arenaceodentata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 589-605.
- Dinnel, P.A., Q.J. Stober, S.C. Crumbley & R.E. Nakatani (1982). Development of a sperm cell toxicity test for marine waters. In: Aquatic and Hazard Assessment. Fifth Conference. J.G. Pearson, R.B. Foster, and W.E. Bishop (Eds.) ASTM STP 766 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. pp. 82-98.
- Emery, V.L., D.W. Moore, B.R. Gray, B.M. Duke, A.B. Gibson, R.B. Wright & J.D. Farrar (1997). Development of a chronic sublethal sediment bioassay using the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* (Shoemaker). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(9): 1912-1920.
- ENDS report (2000). Toxicity based regulation of effluent a "complete succes". ENDS report march 2000, Issue No. 302. ENDS Environmental Data Services, London UK. www.ends.co.uk.
- Essink, K (1989). Het ondiepe sublitoraal van de westelijke Waddenzee. Rijkswaterstaat, Dienst getijdewateren, Haren.
- Eijsackers, H. & H. Løkke (1992). SERAS - Soil Ecotoxicological Risk Assessment System. National Environmental Research Institute, Silkeborg. Report from a workshop held in Silkeborg, Denmark, 13-16 January 1992.
- Feder, H.M. (1981). Aspects of feeding biology of the brittle star *Ophiura ophiura*. *Ophelia* 20: 215-235.
- Ferguson P.L. & G.T. Chandler (1998). A laboratory and field comparison of sediment PAH bioaccumulation by the cosmopolitan

- estuarine polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). *Journal of Marine Environmental Research* 45: 387-403.
- Fincham, A.A. (1971). Ecology and population studies of some intertidal and sublittoral sand-dwelling amphipods. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 51: 471-488.
- Gamenick, I., B. Vismann, M. K. Grieshaber & O. Giere (1998). Ecophysiological differentiation of *Capitella capitata* (Polychaeta). Sibling species from different sulfidic habitats. *Marine Ecology Progress Series* 175: 155-166.
- Hartmann-Schröder, G. (1996). Polychaeta – Annelida, Borstenwürmer. *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*, no. 58, pp 645.
- Heinis, F., I. Akkerman, K. Essink, F. Colijn & M.J. Latuhihin (1995). Biologische monitoring zoute rijkswateren 1990 –1993. Rapport RIKZ-95.059.
- Hill, I.R., P. Matthiessen & F. Heimbach (eds.) (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the 'workshop on sediment toxicity assessment', held at Slot Moermond congresscentrum, Renesse, The Netherlands, 8-10 november 1993. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europa (SETAC-Europe).
- Holtmann, S.E., A. Groenwold, K.H.M. Schrader, J. Asjes, J.A. Craeymeersch, G.C.A. Duineveld, A.J. van Bostelen & J. van der Meer (1996). Atlas of the zoöbenthic of the Dutch Continental Shelf. Ministry of Transport, Public Works and Water Management, North Sea Directorate, Rijswijk, 1 - 244 pp.
- Hooftman, R.N. (1999). Onderzoek naar de beschikbaarheid van toetsen voor het vaststellen van de chronische toxiciteit van effluenten. Fase 1: inventarisatie van methodieken. TNO rapport V99.165.
- ICES (2001). Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment, 2001. ICES Cooperative Research Report No. 248.
- Johns, D.M., R.A. Pastorok & T.C. Ginn (1991). A sublethal sediment test using juvenile *Neanthes* sp. (Polychaete:Nereidae). In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 14th Symposium, ASTM STP 1124, pp 280-293, Eds Mayes, M.A. & M.G. Barron. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- Jones, N.S. (1976). British Cumaceans. Synopsis of British Fauna (new series no. 7). Academic Press, pp 66.
- Kammenga, J.E. & J.A.G. Riksen (1996). Comparing differences in species sensitivity to toxicants: phenotypic plasticity versus concentration-response relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(9): 1649-1653.
- Kater, B.J. & A. Hannewijk (2000). Protocol sedimenttesten met *Nereis virens*. Versie 1.2. RIKZ rapport OS-2000.867x, Kamperland.
- Kater, B.J., J. Jol & A. Hannewijk (1999). Bioassays Waddensurvey. RIKZ rapport OS-99.802.x, Kamperland.
- Kater, B.J., A. Hannewijk & P. Schout (2000). Bioassays op zeven analyse vakken uit het Zeehavenkanaal. RIKZ rapport OS-2000.845x, Kamperland.
- Kirkegaard, J.B. (1978). Settling, growth and life span of some common polychaetes from Danish waters. *Meddr. Danm. Fisk. og Havunders* 7: 447-496.
- Kooman, H. (2002). Ontwikkeling van een chronische bioassay met de amphipode *Corophium volutator*. Een onderzoek naar de optimale temperatuur, verversingsregime, voedseltype en voedselregime voor een chronische test. In opdracht van het Rijksinstituut voor Kust en Zee. Afstudeerrapport voor de Hogeschool van Zeeland. Afstudeerbegeleider: Johan Jol (RIKZ).
- LeBlanc, G.A. (1984). Interspecies relationship in acute toxicity of

- chemicals to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 47-60.
- Legierse, K. (2001). *In vitro* bioassays. Visie, profiel & status binnen RIKZ-projecten. WT*2-BCI en WB*2-BIOSYST. Werkdocument RIKZ/OS/2001.856x.
- Léon, C.D. & C.A.M. van Gestel (1994). Selection of a set of laboratory ecotoxicity tests for the effects assessment of chemicals in terrestrial ecosystems. Discussion paper. Department of Ecology and Ecotoxicology, Vrije Universiteit, Amsterdam. Report no. D94004. Commissioned by the Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and Environment.
- Meadow, J.P. & C.A. Rice (2001). Impaired growth in the polychaete *Armandia brevis* exposed to tributyltin in sediment. *Marine Environmental Research* 51: 113-129.
- McGee, B.L., C.E. Schlekat & E. Reinhartz (1993). Assessing sublethal levels of sediment contamination using the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 577-587.
- McGreer, E.R. (1979). Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on the bivalve *Macoma balthica* (L.). *Marine Pollution Bulletin* 10(9): 259-262.
- Møhlenberg, F. & T. Kiørboe (1983). Burrowing and avoidance behaviour in marine organisms exposed to pesticide-contaminated sediment. *Mar. Poll. Bull.* 14: 57-60.
- Nicolaisen, W. & Kanneworff, E. (1969). On the burrowing and feeding habits of the amphipods *Bathyporei pilosa* and *Bathyporeia sarsi* Watkin. *Ophelia* 6: 231-250.
- Nipper, M.G., D.J. Greenstein & S.M. Bay (1989). Short- and long-term sediment toxicity test methods with the amphipod *Grandidierella japonica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:1191-1200.
- OECD (1982). Good Laboratory Practice in the testing of chemicals. Final report of the group of experts on Good Laboratory Practice. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- Pedersen, F., C. Helweg, H.B. Rasmussen & E. Bjørnstad (2001). Karakterisering af havnesediment ved hjælp af biotest. Miljøprojekt Nr. 629. Miljøstyrelse, DHI, Institut for Vand og Miljø.
- Pesch, C.E., W.R. Jr. Munns & R. Gutjahr-Gobell (1991). Effects of a contaminated sediment on life history traits and population growth rate of *Neanthes arenaceodentata* (Polychaeta: Nereidae) in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 805-815.
- Phelps, H.L. (1989). Clam burrowing bioassay for estuarine sediment. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 43: 838-845.
- Reish, D.J., & J.A. LeMay (1988). Bioassays manual for dredged materials. U.S.Army Corps of Engineers, Los Angeles District, Los Angeles, CA, Technical Report DACW-09-83R-005.
- Rees, H.L. & Dare, P.J. (1993). Sources of mortality and associated life-cycle traits of selected benthic species: a review. Maff Directorate of Fisheries Research, Fisheries data report no. 33, pp 36.
- Ringwood, A.M. & C.J. Keppler (2002). Comparative in situ and laboratory sediment bioassays with juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(8): 1651-1657.
- Ruiz, J.M., G.W. Bryan & P.E. Gibbs (1994). Bioassaying the toxicity of tributyltin (TBT)- polluted sediment to spat of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Marine Ecology Progress Series* 113(1-2): 119-130.
- Rutgers, M., J.J. Bogte, E.M. Dirven-van Breemen & A.J. Schouten (2001). Lokatiespecifieke ecologische risicobeoordeling - praktijkonderzoek met een Triade-benadering. RIVM rapport 711701026.

- SCCWRP (1994a). Impact of wastewater on reproduction of *Amphiodia urtica*. In: J.N. Cross, C. Francisco and D. Hallock (eds.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1992-93. Westminster, CA.
- SCCWRP (1994b). Population biology of the brittlestar *Amphiodia urtica*. p121-129 In: J.N. Cross, C. Francisco and D. Hallock (eds.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1992-93. Westminster, CA.
- SCCWRP (1994c). Sediment toxicity test methods for the brittlestar *Amphiodia urtica*. pp. 130-135 In: J.N. Cross, C. Francisco and D. Hallock (eds.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1992-93. Westminster, CA.
- Schlekat, C.E., B.L. McGee, & E. Reinharz (1992). Testing sediment toxicity in Chesapeake Bay using the amphipod *Leptocheirus plumulosus*: an evaluation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 225-236.
- Scott, K.J., & M.S. Redmond (1989). The effects of a contaminated dredged material on laboratory populations of the tubicolous amphipod *Ampelisca abdita*. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Twelfth Volume, ASTM STP 1027*, U.M. Cowgill, and L.R. Williams, Eds. (Philadelphia: American Society for Testing and Materials 1989, 289-303p.).
- Slooff, W., D. de Zwart, M. Tonkes, M. Rutgers & C. van de Guchte (2001). Basis voor effectgerichte beoordeling? RIVM rapport nr. 601503.021. RIZA werkdocument nr 2001.048x.
- STOWA (1996). Biomonitoringstechnieken voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 1: Inventarisatie en selectie van geschikte technieken. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Zoetermeer.
- Strawbridge, S., B.C. Coull & G.T. Chandler (1992). Reproductive output of a meiobenthic copepod exposed to sediment-associated fenvalerate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23: 295-300.
- Strömberg, T., M.V. Nielsen & L.O. Reiersen (1993). The effect of hydrocarbons and drilling fluids on the faecal pellet production of the deposit feeder *Abra alba*. *Aquatic Toxicology* 24: 275-286.
- Stronkhorst, J & S. de Jong (1999). Beleidskader, onderzoek en procedures voor de verspreiding van baggerspecie in de Nederlandse zoute wateren. In RIKZ handboek Toxiciteitstesten voor zoute baggerspecie. Schipper en Stronkhorst (1999). RIKZ nota 99.012., ISBN 90-369-3493-1.
- Stronkhorst, J., C.A. Schipper, J. Honkoop & K. van Essen (2001). Baggerspecie in Zee; hoe regelen we dat verantwoord? Een nieuw effectgericht beoordelingsstelsel. RIKZ nota 2001.030.
- Thain, J. & S. Bifield (1993). A sediment bioassay using the polychaete *Arenicola marina*. Test guideline for PARCOM sediment reworker ring test. MAFF fisheries Laboratory, Burnham-on-Crouch, UK.
- Thompson, B.E., S.M. Bay, J.W. Anderson, J.D. Laughlin, D.J. Greenstein & D.T. Tsukada (1989). Chronic effects of contaminated sediment on the urchin *Lytechinus pictus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 629-637.
- Thompson, B.E., S. Bay, D. Greenstein & J. Laughlin (1991). Sub-lethal effects of hydrogen sulfide in sediments on the urchin *Lytechinus pictus*. *Marine Environmental Research* 31: 309-321.
- Tietjen, T.H. & J.J. Lee (1984). The use of free-living nematodes as a bioassay for estuarine sediments. *Marine Environmental Research* 11: 233-251.
- U.S.EPA (1990). Conducting the sea urchin larval development test. ERL-Narragansett standard operating procedure 1.03.007.

- Maas, J.L., van de Plassche, A. Straetmans, A.D. Vethaak & A. Belfroid. (2003). Normstelling voor Bioassays. Uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodems. RIZA/RIKZ rapport 2003.007.
- Van den Brink P.J. & B.J. Kater (2000). Bioassays en chemische metingen, is er een relatie? Multivariate analyse van chemische en biologische waarnemingen aan sedimenten van de Waddenzee en het Zeehavenkanaal. Alterra rapport 186.
- Van den Hurk, P., P.M. Chapman, B. Roddie & R.C. Swartz (1992). A comparison of North American and West European infaunal amphipod species in a toxicity test on North Sea sediments. Marine Ecology Progress Series 91: 237-243.
- Van Dessel, B. (1989). Ecologisch herstel van de Rijnmakrofauna. Publikaties en rapporten van het project 'Ecologisch herstel Rijn' Publicatie no. 14.
- Van Elswijk, M. (2000). Richtlijn Nader Onderzoek. Ernst- en urgentiebepaling van verontreinigde waterbodems. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling. Nota in voorbereiding.
- Van Haren, J.C.M. & M. van Wieringen (1997). De ecologie van het Noordzeekanaal. Evaluatie ecologisch onderzoek en aanzet tot ecologische doelstelling. Rijkswaterstaat Directie Noord-Holland. Nota ANW 97.01.
- Vranken, G. & C. Heip (1986). Toxicity of copper, mercury and lead to a marine nematode. Marine Pollution Bulletin 17(10): 453-457.
- Watkin, E.E. (1939). The pelagic phase and life history of the amphipod genus *Bathyporeia*. J. mar. Biol. Ass. U.K. 23: 467-481.
- Wolff, W.J. (1973). The estuary as a habitat. An analysis of data on the soft-bottom macrofauna of the estuarine area of the rivers Rhine, Meuse and Scheldt. Zoologische verhandelingen no. 126. Uitgegeven door het Rijksmuseum van natuurlijke historie te Leiden.
- Zobrist, E.C. & B.C. Coull (1994). Meiofaunal effects on growth and survivorship of the polychaete *Streblospio benedicti* Webster and the bivalve (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 175: 167-179.

