



ALTERRA

WAGENINGEN UR

Vervolgonderzoek Ecologische risico's Noorderbos

- rapportage fase 1 -

J.E. Groenberg

L. Bouwman

S. Kools

J. Bloem

W. Hendriks

Witteveen + Bos



Alterra-rapport 1413, ISSN 1566-7197

Witteveen + Bos

water
infrastructuur
milieu
bouw



Vervolgonderzoek Ecologische risico's Noorderbos

Vervolgonderzoek Ecologische risico's Noorderbos

- rapportage fase 1 -

J.E. Groenenberg
L. Bouwman
S. Kools
J. Bloem
Alterra Wageningen UR

W. Hendriks
Witteveen + Bos

Alterra-rapport 1413

Alterra, Wageningen, 2007

REFERAAT

Groenenberg, J.E., L Bouwman, S.Kools, J. Bloem, W. Hendriks, 2007. *Vervolgonderzoek Ecologische risico's Noorderbos, rapportage fase 1*. Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 1413. 45 blz.; .4 fig.; 14. tab.; .9 ref.

Om inzicht te krijgen in de gevolgen van verzuring op de mobiliteit en toxiciteit van de met chroom, arseen en zware metalen verontreinigde bodem is een deel van de in eerder onderzoek aangelegde veldplots in het Noorderbos te Tilburg kunstmatig verzuurd. Uit het onderzoek blijkt dat de pH in de niet kunstmatig verzuurde plots met een halve eenheid gedaald is in 5 jaar als gevolg van de omzetting van grasland naar bos. De pH van kunstmatig verzuurde plots ligt 0,6-0,9 eenheid lager. Als gevolg van verzuring stegen de concentraties metalen met maximaal een factor 3 voor Cd en Pb. In ecologische testen met regenwormen, bacteriën en nematoden zijn effecten meetbaar en blijkt de toxische druk door verzuring te zijn toegenomen. Met eenvoudigere tests zoals Microtox en Biomet waren geen duidelijke effecten meetbaar.

Trefwoorden: Chroom, zware metalen, verzuring, bio-assay, ecologische risico's

ISSN 1566-7197

Dit rapport is digitaal beschikbaar via www.alterra.wur.nl. Een gedrukte versie van dit rapport, evenals van alle andere Alterra-rapporten, kunt u verkrijgen bij Uitgeverij Cereales te Wageningen (0317 46 66 66). Voor informatie over voorwaarden, prijzen en snelste bestelwijze zie www.boomblad.nl/rapportenservice

© 2007 Alterra

Postbus 47; 6700 AA Wageningen; Nederland

Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: info.alterra@wur.nl

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Inhoud

Woord vooraf	7
Samenvatting	9
1 Inleiding	13
2 Methoden	17
2.1 Verzuring proefvelden en chemische analyses	17
2.2 Biologische toetsen	18
2.3 Labexperimenten toediening ijzer.	20
3 Resultaten	23
3.1 Bodem en grondwater	23
3.2 Bio-assay regenwormen	24
3.3 Gewasanalyses.	28
3.4 Groeisnelheid en biomassa bacteriën	29
3.5 Nematoden	29
3.6 Bio-assay springstaarten	34
3.7 Microtox	34
3.8 Biomet	35
3.9 Labexperimenten toediening ijzer.	35
4 Conclusies en aanbevelingen	37
Literatuur	39
Bijlage 1 Chemische bepalingen veldplots Noorderbos	41
Bijlage 2 Chemische bepalingen labexperimenten ijzeradditie	43

Woord vooraf

Door de gemeente Tilburg is op de voormalige vloeivelden “Zandley” ten noorden van Tilburg het Noorderbos, een parkbos, aangelegd. De bodem van het Noorderbos is als gevolg van het voormalige gebruik als vloeivelden voor de zuivering van afvalwater verontreinigd met diverse metalen, vooral met chroom en arseen.

Voorafgaand aan de aanleg van het Noorderbos zijn er verschillende onderzoeken gedaan naar de aard en omvang van de verontreiniging. Vervolgens is in opdracht van de gemeente Tilburg (probleemhebber) en de provincie Noord Brabant (destijds het bevoegd gezag) onderzoek uitgevoerd naar de risico's van deze bodemverontreiniging door Alterra (en voorlopers daarvan). Uit dit onderzoek bleek dat de verontreiniging onder de toen aanwezige omstandigheden slecht beschikbaar was en als gevolg daarvan geen ontoelaatbare risico's opleverde (Groenenberg et al., 1999a en 1999b).

Tegelijkertijd ontwikkelde het bodembeleid zich steeds meer tot een gebiedsgebruiksgericht beleid. Hierdoor werd het mogelijk voor de gemeente Tilburg te kiezen de verontreiniging te gaan beheren en niet op grote schaal grond af te gaan graven. Voor dit beheer is een bodembeheerplan opgesteld (Witteveen+Bos, 1999).

Bij het opstellen van het bodembeheerplan waren een aantal zaken nog niet voldoende bekend. Zo zullen bijvoorbeeld de risico's als gevolg van de verontreiniging waarschijnlijk veranderen als gevolg van het veranderde landgebruik. Monitoring maakt deel uit van het bodembeheerplan en is het van belang een goede methode voor monitoring van de verontreiniging en eventuele effecten in het gebied te ontwikkelen. Daarom is ongeveer tegelijkertijd met de start van de aanleg van het parkbos een aanvullend onderzoek gestart om meer inzicht te krijgen in deze kennis leemten. Dit onderzoek werd uitgevoerd binnen het kader van het programma van de Stichting Kennisontwikkeling en Kennisoverdracht Bodem (SKB) door een consortium van Alterra, Gemeente Tilburg, Provincie Noord-Brabant en Witteveen+Bos. Dit onderzoek was opgedeeld in twee fasen. Hiervan is destijds alleen de eerste fase (fase A) uitgevoerd en gerapporteerd (Muijs et al., 2002). Om budgettaire redenen en veranderingen van scope binnen het SKB programma is destijds de beoogde 2^e fase (fase B) niet doorgegaan.

Om de eerdergenoemde kennisleemten toch goed in te kunnen vullen is op verzoek van de gemeente Tilburg door de combinatie Witteveen+Bos en Alterra een aanvullend onderzoeksvoorstel opgesteld “vervolgonderzoek Noorderbos” (Witteveen+Bos en Alterra, 2004). Dit voorstel gaat uit van een wederom gefaseerde onderzoeksaanpak (fase 1 en 2). De combinatie heeft van de gemeente Tilburg opdracht gekregen voor de uitvoering van fase 1 van het vervolgonderzoek. In deze tussenrapportage worden de uitgevoerde werkzaamheden en resultaten van deze eerste fase beschreven. Het rapport heeft het karakter van een meetrapport. Na afronding van de beoogde tweede fase volgt een integraal eindrapport.

Samenvatting

In de gemeente Tilburg is een bos aangelegd op de voormalige vloeivelden Zandley. De vloeivelden zijn licht tot sterk verontreinigd met Cr, As en zware metalen. Uit eerdere onderzoeken (Groenenberg et. al, 1999a en 1999b) bleken geen negatieve ecotoxicologische effecten bij het toenmalige landgebruik als grasland. Dit werd toegeschreven aan de slechte beschikbaarheid van met name chroom onder de toenmalige condities. In het eerder uitgevoerde onderzoek werd al gewezen op de verzuring die plaats zal vinden als gevolg van de aanplant van bos en de mobilisatie van metalen als gevolg daarvan. Tegelijkertijd met de aanleg van het bos is een onderzoek gestart van Alterra en Witteveen + Bos (Muijs *et al.*, 2002). Dat onderzoek was gericht op het ontwikkelen van het chemisch en biologisch monitoren van het gebied en het onderzoeken van mogelijkheden om de mobiliteit en toename van beschikbaarheid van metalen bij verzuring tegen te gaan door het toedienen van additieven (ijzer en zeoliet) aan de bodem. Voor dit onderzoek zijn proefveldjes aangelegd en onderzocht door middel van bodemchemische analyses en ecotesten. Daarmee is de beginsituatie in het gebied bodemchemisch en ecologisch vastgesteld. Omdat verzuring een traag proces is konden binnen dat onderzoek geen effecten gemeten worden van verzuring.

Voor de verdere ontwikkeling van de monitoring is voor het hier beschreven onderzoek een deel van de proefvelden kunstmatig verzuurd. De belangrijkste doelstellingen van dit onderzoek zijn:

1. Het vaststellen van de verandering van de chemische beschikbaarheid en concentraties in oplossing van de metalen in de bodem als gevolg van bodemverzuring;
2. Het vaststellen of onder verzuurde omstandigheden ecologische effecten optreden voor:
 - micro-organismen (nematoden en bacteriën);
 - bodemorganismen (springstaarten en regenwormen);
 - gewas (gras).
3. Of eenvoudige en goedkope ecotesten gebruikt kunnen worden voor het monitoren van ecologische effecten;
4. Het vaststellen van de werkzaamheid van additieven afhankelijk en de benodigde dosis;

Om te bepalen in welke mate metalen door verzuring gemobiliseerd worden en om vast te stellen wat de effecten van deze mobilisatie op het bodemleven zijn (doelstelling 1 en 2) is een veldexperiment uitgevoerd waarbij een deel van de veldplots uit het voorgaande onderzoek verzuurd is door middel van het toedienen van zwavel. In zowel de verzuurde als niet verzuurde plots is na ruim een jaar de grond bemonsterd. In de bodem zijn de reactieve concentraties metalen, gemeten en concentraties metalen, N en P en opgelost organisch koolstof (DOC) in zwak zoute extracten. Om de effecten te testen is een aantal ecologische tests uitgevoerd die ook in het voorgaande onderzoek uitgevoerd zijn: groei en reproductie van regenwormen,

soortensamenstelling nematoden, groei en biomassa van bacteriën, bioluminescentie (Microtox) en overleving springstaarten (*Folsomia candida*). Verder is nu ook aanvullend op eerder onderzoek de Biomet toets gebruikt. Daarnaast zijn gehalten metalen gemeten in het gewas (gras).

In het laboratorium is een experiment uitgevoerd naar de effectiviteit van de toediening van ijzer aan de bodem om de beschikbaarheid (concentratie in oplossing) van Cr en andere metalen te reduceren. De belangrijkste vragen waren wat het effect is van de chemische vorm van het toegediende ijzer en de dosis daar van op de reductie van de beoogde vermindering van de concentratie in oplossing

Uit de metingen in de niet verzuurde plots blijkt uit de daling van de pH met een halve eenheid in 5 jaar de bodem als gevolg van de aanplant van bos licht verzuurd is. Als gevolg van deze pH daling zijn concentraties metalen in oplossing licht gestegen.

In de kunstmatig verzuurde plots ligt de pH 0,6-0,8 eenheid onder de pH in de niet verzuurde plots. De concentraties metalen in oplossing ten opzichte van de niet verzuurde plots zijn hierdoor gestegen in afnemende mate volgens (tussen haakjes staat de ratio) Pb (2-3), Cd(2.1-2.7), As (1.4-1.9), Ni (1.2-1.7), Cr (1.1- 1.7), Zn (1.1-1.6).

Als gevolg van de verzuring is een significant verminderde groei van regenwormen (*Lumbricus rubellus*) vastgesteld in de middel en sterk verontreinigde plots. De verzuring had geen effect op de groei in de licht verontreinigde plots.

Verzuring leidt tot een afname van de groeisnelheid van bacteriën. De afname is het sterkst in de verontreinigde grond. Dit wijst op toxische effecten van metalen.

Het aantal bacterivore en herbivore nematoden in de verzuurde sterk en middel verontreinigde plots nam sterk af. Uit de experimenten kan niet afgeleid worden of dit het gevolg is van directe toxische effecten van verhoogde metaalconcentraties of indirect door een sterke afname van de vegetatie.

De eenvoudigere bio-assays gaven alle een minder duidelijk beeld. Met de bio-assay met springstaarten werd geen duidelijk effect van verontreiniging en verzuring gemeten. De microtox-test gaf in tegenstelling tot de resultaten van deze test in het voorgaande onderzoek een licht toxisch effect voor alle plots. Dit is mogelijk het gevolg van de stijging in metaal concentraties door verzuring van alle plots. Cadmium en zink zijn de meest waarschijnlijke oorzaak.

Ijzer toegediend als metallisch ijzer bleek een effectief middel om concentraties in oplossing te verlagen. Concentraties chroom in oplossing worden met een factor 15-40, afhankelijk van de dosis toegediend ijzer, verlaagd. Ook tweewaardige metaal concentraties werden verlaagd zoals de concentratie Cd met een factor 2-4 afhankelijk van de dosis.

De belangrijkste conclusies van het onderzoek zijn:

- De pH van de bodem is sinds de bosaanplant in 5 jaar met een halve eenheid gedaald. Als gevolg hiervan zijn metaalconcentraties in oplossing licht gestegen
- Verdergaande verzuring leidt tot meetbaar negatieve effecten bij regenwormen, bacteriën en nematoden. Dit alles samen laat zien dat de toxische druk toeneemt bij verzuring van de bodem. Uit de hier uitgevoerde experimenten kan niet vastgesteld worden welke metalen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Op basis van de resultaten van het onderzoek worden de volgende aanbevelingen gedaan:

- Bij toekomstige monitoring het pakket aan ecotesten te beperken tot regenwormentest, bacteriën en nematoden
- In samenspraak met uitvoerende laboratoria bekijken of de (snelle) microtox test kan worden gemodificeerd zodat deze ook geschikt is om onder zure omstandigheden te gebruiken
- De beoogde tweede fase onderzoek uit te voeren met de volgende zwaartepunten: (1) het vaststellen van kwaliteitseisen aan de bodem (chemisch en ecotoxicologisch) in relatie tot het bodemgebruik (inclusief uitspoeling naar grond- en oppervlaktewater). Voor het vaststellen van deze kwaliteitseisen kan een werkwijze worden gevolgd zoals die wordt toegepast binnen de zogenaamde TRIADE-aanpak. (Rutgers et al., 2004); (2) het onderzoeken van snelheid waarmee de verzuring en de daarmee samenhangende verhoging van de biobeschikbaarheid zal optreden en daaraan gerelateerd (3) de effectiviteit en toepasbaarheid van geschikte additieven nader vast te stellen. .

1 Inleiding

Situatie en probleemstelling

In de gemeente Tilburg vindt natuurontwikkeling plaats op verontreinigde gronden. Het Noorderbos, een parkbos, is aangelegd op de voormalige vloeivelden 'Zandley' ten noorden van de stad. Deze vloeivelden zijn in het verleden gebruikt voor de zuivering van het huishoudelijk en industrieel afvalwater uit de stad Tilburg. Hierdoor is de bovengrond in het gebied (circa 100 hectare) licht tot sterk verontreinigd met chroom, arseen en zware metalen. Uit risicostudies is gebleken dat bij het toenmalige landgebruik (grasland met beweiding) geen sprake was van ecologische effecten ondanks de lokaal zeer hoge concentraties. Dit is het gevolg van de geringe beschikbaarheid en de chemische vorm van de aanwezige verontreiniging, met name die van chroom (Groenenberg et. al, 1999a en 1999b). Als gevolg van de ontwikkeling van het bos zal de bodem verzuren. Uit eerder onderzoek van Alterra blijkt dat de bodem van dit gebied gevoelig is voor verzuring. Als gevolg van verzuring zal de beschikbaarheid van de aanwezige verontreiniging met metalen en arseen toenemen. De verhoogde beschikbaarheid heeft mogelijk ongewenste ecologische effecten als gevolg.

Het voorgestelde beheer in het bodembeheerplan (Witteveen+Bos, 1999) voorziet daarom in het bekalken van de bodem om verzuring en de daaraan gerelateerde ecologische effecten tegen te gaan. Daarnaast zal het gebied gemonitord worden om veranderingen in de beschikbaarheid van de verontreiniging te kunnen volgen en het mogelijk optreden van ecologische effecten vroegtijdig vast te stellen. Het bodembeheerplan is nog open wat betreft de manier waarop het gebied gemonitord moet worden. Hiervoor zijn geen pasklare methoden voorhanden. Het bekalken van de bodem heeft als nadeel dat het geen duurzame oplossing is en periodiek herhaald moet worden (eens in de 5-10 jaar).

SKB-traject

Tegelijkertijd met de aanleg van het bos is een onderzoeksproject (Muijs *et al.*, 2002) gestart in het kader van het onderzoeksprogramma van de Stichting Kennisontwikkeling en Kennisoverdracht Bodem (SKB). De belangrijkste doelstellingen van dat project waren:

- Het ontwikkelen van een monitoringsysteem voor het Noorderbos.
- Het vastleggen van de beginsituatie, zowel bodemchemisch als ecologisch.
- Het onderzoeken van de mogelijkheid van duurzame alternatieven voor het bekalken van de bodem.

Binnen dat onderzoek zijn in het gebied een tweetal proeflocaties ingericht (zie Figuur 1 in Hoofdstuk 2). Deze proeflocaties bestaan uit drie proefveldjes waarvan er één sterk, één matig en één proefveld licht verontreinigd is. Deze proefvelden zijn gebruikt voor chemisch en ecotoxicologisch onderzoek ten behoeve van het ontwikkelen van het monitoringssysteem en voor het vaststellen van de uitgangssituatie (doelstellingen 1 en 2). Binnen de proefvelden zijn proefvakken

aangelegd voor het testen van een aantal, op basis van literatuur – en laboratoriumonderzoek geselecteerde, additieven die kunnen dienen als alternatief voor kalk (doelstelling 3) door de binding van metalen. Daarnaast zijn er verspreid over het hele gebied monitoringlocaties vastgesteld. Op deze locaties zijn peilbuizen geplaatst voor de bemonstering van het grondwater en is de bodem bemonsterd voor bodemchemisch onderzoek. Zodoende is ook de uitgangssituatie voor het gebied als geheel vastgesteld.

Samengevat zijn de belangrijkste resultaten van dat onderzoek:

- De uitgangssituatie van het gebied is zowel chemisch als ecotoxicologisch vastgelegd.
- Met geen van de gebruikte ecotesten zijn effecten in het gebied aangetoond. Dit resultaat ondersteunt de resultaten uit eerder onderzoek van Alterra dat was uitgevoerd met een beperktere set ecotesten.
- De ecotesten gaven alle valide resultaten. Doordat er geen effecten aangetoond konden worden, en alle testen in dezelfde richting wezen kon op basis van dit onderzoek geen selectie van de voor de monitoring te gebruiken tests gemaakt worden.
- De geteste additieven zeoliet en ijzer bleken beide de concentraties van tweewaardige metalen in oplossing te verlagen. Ijzer verlaagt juist ook de concentratie van het driewaardig Cr en het als anion voorkomende As.
-

Omdat verzuring van de bodem een langzaam proces is (meer dan 10 jaar), konden nog geen effecten als gevolg van verzuring in het veld vastgesteld worden. Verder bleek tijdens de bemonstering dat het onttrekken van (voldoende) bodemvocht met de geïnstalleerde poriewatercups regelmatig niet succesvol was.

Doelstellingen vervolgonderzoek

Het onderhavige vervolgonderzoek borduurt voort op de resultaten van de eerste fase van het SKB-traject. Dit onderzoekstraject voorziet in twee fasen, waarbij de invulling van de tweede fase afhangt van de resultaten uit de eerste fase.

De belangrijkste doelstellingen voor het vervolgonderzoek zijn:

1. Het vaststellen van de verandering van de chemische beschikbaarheid en concentraties in oplossing van de metalen in de bodem als gevolg van bodemverzuring;
2. Het vaststellen of onder verzuurde omstandigheden ecologische effecten optreden voor:
 - micro-organismen (nematoden en bacteriën);
 - bodemorganismen (springstaarten en regenwormen);
 - gewas (gras).
3. Of eenvoudige en goedkope ecotesten gebruikt kunnen worden voor het monitoren van ecologische effecten;
4. Het vaststellen van de werkzaamheid van additieven afhankelijk en de benodigde dosis;
5. Het vaststellen van de snelheid van verzuring van de bodem van het Noorderbos
6. Vaststellen of de additieven werkzaam zijn onder verzuurde omstandigheden;

7. Duidelijkheid verschaffen in de uitspoeling van metalen als gevolg van verzuring;
8. Voorlichting en informatieoverdracht naar direct betrokkenen en geïnteresseerden.

Afhankelijk van bevindingen in het veld, tussentijdse inzichten etc. kunnen de doelstellingen worden aangepast, dan wel zwaartepunten worden verlegd.

Onderhavige fase 1 van het vervolgonderzoek heeft zich uitsluitend gericht op de eerste 4 doelstellingen, waarvoor op hoofdlijnen de volgende werkzaamheden zijn uitgevoerd:

- Om te bepalen in welke mate metalen door verzuring gemobiliseerd worden en om vast te stellen wat de effecten van deze mobilisatie op het bodemleven zijn (doelstelling 1 en 2) is een veldexperiment uitgevoerd waarbij een deel van de veldplots uit het voorgaande onderzoek verzuurd is door middel van het toedienen van zwavel.
- In zowel de verzuurde als niet verzuurde plots is na ruim een jaar de grond bemonsterd. In de bodem zijn de reactieve concentraties metalen, gemeten en concentraties metalen, N en P en opgelost organisch koolstof (DOC) in zwak zoute extracten. Om de effecten te testen zijn een aantal ecologische tests uitgevoerd die ook in het voorgaande onderzoek uitgevoerd zijn: groei en reproductie van regenwormen, soortensamenstelling nematoden, groei en biomassa van bacteriën, bioluminescentie (Microtox) en overleving springstaarten (*Folsomia candida*). Verder is nu ook de Biomet toets gebruikt. Daarnaast zijn gehalten metalen gemeten in het gewas (gras).
- In het laboratorium is een experiment uitgevoerd naar de effectiviteit van de toediening van ijzer aan de bodem om de beschikbaarheid van Cr en andere metalen te reduceren. De belangrijkste vragen waren de effecten van de vorm van toegediend ijzer en de dosis daarvan op de concentratie van deze metalen in oplossing

Opbouw van het rapport

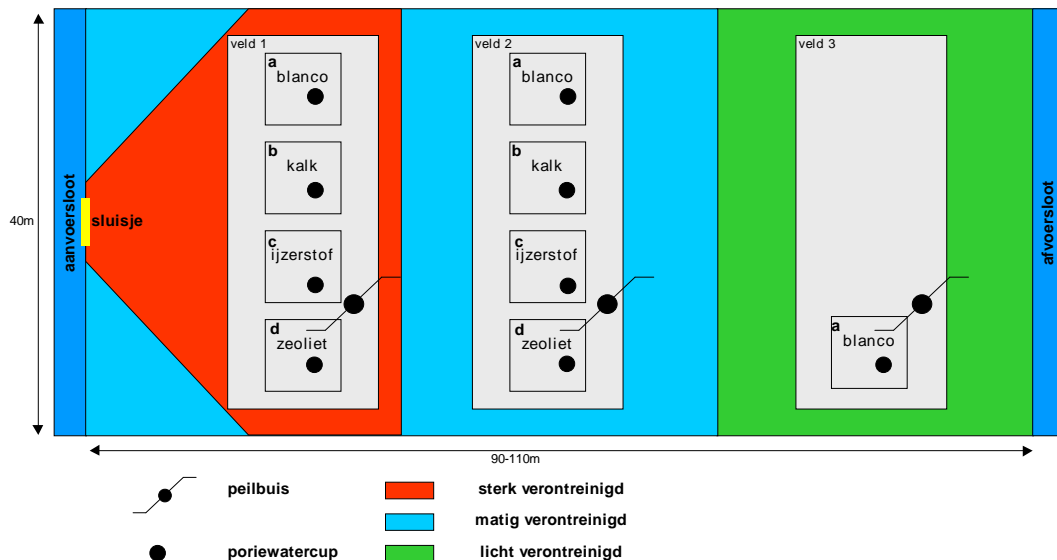
Het rapport is als volgt opgebouwd:

- in hoofdstuk 2 wordt nader ingegaan op de achtergronden, doelstellingen en opzet van het project;
- in hoofdstuk 3 wordt ingegaan op de methoden;
- de resultaten worden weergegeven in hoofdstuk 4 en
- tenslotte volgen in hoofdstuk 4 de conclusies en aanbevelingen.

2 Methoden

2.1 Verzuring proefvelden en chemische analyses

Voor het verzuringsexperiment is gebruik gemaakt van de reeds aangelegde proefveldjes van proeflocatie I, het veld met de meest duidelijke verontreinigingsgradiënt (Muijs et al., 2002). De locatie bestaat uit 3 proefveldjes waarvan veld 1 (A1) sterk verontreinigd is, veld 2 (A2) matig verontreinigd en veld 3 (A3) licht verontreinigd (Fig. 1). De proefvelden 1 en 2 zijn opgedeeld in elk 4 proefvakken die behandeld zijn met de additieven zeoliet, ijzer, kalk en een blanco. Het lichtverontreinigde proefveld(nr 3) bestaat alleen uit een blanco proefvak. Van al deze proefvakken is de helft kunstmatig verzuurd door het toedienen van zwavel. De andere helft is onbehandeld en dient als controle. De verzuring van de proefvelden is ingezet in december 2003.



Figuur 1 Schematische opzet proefvelden

Op basis van eerder uitgevoerde titraties van de bodem met zuur (Groenberg et al., 1999) is berekend dat ongeveer 800 gram zwavel per m² nodig is om de pH van de bodem in de bovenste 30 cm met 1 eenheid te verlagen. Voor het toevoegen van de zwavel is het opstaande gras gemaaid. De benodigde hoeveelheid zwavel is aan het oppervlak opgebracht en met een frees ongeveer 30 cm ondergewerkt.

Bemonstering grond en grondwater

In juli 2005 is grond bemonsterd voor de bio-assay met regenwormen. Er is grond verzameld uit de bovenste 30 cm van de bodem verdeeld over het proefvak. Voor de bemonstering is gebruik gemaakt van de blanco (niet behandeld met ijzer, zeoliet of kalk) proefvakken uit veld 1, 2 en 3 (code 1a, 2a en 3a). Binnen elk proefvak is zowel bemonsterd uit het verzuurde als niet verzuurde deel van het proefveld. De

verzuurde proefvakken worden aangegeven door toevoegen van de letter z (dus 1az, 2az en 3az)

Grondwater is bemonsterd door middel van de in het voorgaande onderzoek reeds geplaatste peilbuizen (filterinstelling 1,5-2,5 m –mv)

In september is op dezelfde locaties als in juli weer grond bemonsterd voor de overige bio-assays en chemische analyses van bodem, bodemvocht en gewas.

Analyses bodem en grondwater

Potentieel beschikbare metaalgehalten zijn gemeten met een 0.43 M HNO₃ extractie. Het actueel beschikbare metaalgehalte is bepaald met een 0.01 M CaCl₂ extractie. Omdat de eerder geïnstalleerde poriewatercups niet goed meer werken is het niet meer mogelijk poriewater te extraheren uit de bodem. Daarom is grond geëxtraheerd met een 0.002 M CaCl₂ oplossing om bodemvocht te simuleren. Deze methode is ook gebruikt in 2000 voorafgaand aan de inrichting van de proefvelden (voorjaarsbemonstering) (Muijs et al., 2002).

Analyses gewas.

Van de 3 plots zijn grasmonsters genomen. Deze zijn gedroogd bij 70 C en gedestruerd voor bepaling van de totaalgehalten metalen.

2.2 Biologische toetsen

Bio-assay regenwormen

Voor de bio-assay met regenwormen is uit elk proefvak, verzuurd en niet verzuurd, een mengmonster genomen. Aan de 6 monsters is als controle (referentie) een grond (Kooiburg – KOBG) gebruikt met een zeer laag gehalte aan metalen welke gebruikt wordt als standaard bij Alterra. Alle gronden zijn gezeefd over 5 mm en goed gemengd. De zeven verschillende monsters grond zijn in 6-voud overgebracht in glazen potten, waarna de bodem op veldvochtigheid werd gebracht door het toevoegen van demiwater. De uiteindelijke hoeveelheid vochtige grond varieerde van ongeveer 550 tot 650 gram en hiervan is de exacte vochtigheid bepaald.

Daarna zijn waterverzadigde en verkrumelde elzenbladeren uit Oost-Flevoland in overmaat toegevoegd als voedsel. De wormen zijn op 19/7/2005 overgebracht van een referentielocatie (Nijkerkerveen) naar Alterra (Wageningen) en gehouden op grond met vergelijkbaar elzenblad. Bij aanvang van de proef (22/8/2005) zijn de wormen geselecteerd op grootte, gewogen en per vijf aan de potten toegevoegd, zodanig dat er geen verschillen in startgewicht waren tussen de groepen potten (ANOVA, P>0.01).

De potten zijn vervolgens opgeslagen in een klimaatkamer met constant licht en 15oC. Na een periode van 4 weken (op 19/9/2005) zijn de cocons en overlevende wormen geteld. Deze wormen zijn vervolgens gewogen, gehongerd en ingevroren voor verdere (metaal)analyses.

Groeisnelheid en biomassa bacteriën.

Het totale aantal bacteriën en de afmetingen van de cellen is bepaald door middel van directe microscopische tellingen. Uit het aantal en de afmetingen zijn het biovolume en de biomassa berekend. Deze metingen zijn uitgevoerd met behulp van een confocale laserscan microscoop en automatische beeldverwerking. De groeisnelheid van bacteriën is bepaald door de inbouw van radioactief gelabelde 3H-thymidine en 14C-leucine in respectievelijk DNA en eiwitten te meten.

Omdat de thymidine met 3H en de leucine met 14C is gelabeld kunnen beide parameters (de microbiële DNA- en eiwitsynthese) in één bepaling worden gemeten. Het verband van de groeisnelheid met thymidine-inbouw is constanter dan met leucine-inbouw. Daar staat tegenover dat sommige soorten bacteriën, vooral anaërobe, thymidine niet kunnen inbouwen, terwijl leucine door vrijwel alle bacteriën kan worden ingebouwd. Daarom worden beide methoden gelijktijdig gebruikt.

Soortensamenstelling nematoden.

Uit 100 g veldvochtige grond werden met behulp van Oostenbrink's elutriatie-methode de nematoden geïsoleerd, geteld en gedetermineerd onder het microscoop: 2 X 110 exemplaren per monster. Met behulp van het gemeten drogestofgehalte van de grondmonsters werd het aantal nematoden per 100 g droge grond vastgesteld. Met behulp van de determinatie konden getelde nematoden worden verdeeld over functionele groepen (bacterivoren, herbivoren, fungivoren, predatoren, en omnivoren) en taxa (geslacht, in een enkel geval familie).

Springstaarten

De bioassay is uitgevoerd door AquaSense volgens een methode die is afgeleid van de ISO 11267 richtlijn [1999]. Per locatie zijn 4 glazen potten met een inhoud van 100 ml gevuld met 20 gram grond, welke is bevochtigd tot 60% WHC. Aan elke pot zijn 10 springstaarten (*Folsomia candida*), in leeftijd variërende tussen de 10 en 12 dagen, toegevoegd. De springstaarten zijn gevoerd met enkele korrels bakkersgist (dr. Oetker). De organismen zijn vier weken aan de grond blootgesteld bij een temperatuur van 20 ± 2 °C en een dag-nacht cyclus van 16/8 uur. Gedurende de blootstellingsduur zijn twee maal per week de potjes met milli-Q water tot het oorspronkelijke gewicht aangevuld. Er was echter nauwelijks sprake van vochtverlies. Indien nodig zijn de springstaarten met gist gevoerd.

Na vier weken blootstelling zijn de bioassays beëindigd. De inhoud van de potten is met water gespoeld en opgevangen in een bekersglas. De monsters zijn vervolgens gefixeerd met ethanol (50%). Het aantal adulte en juveniele springstaarten is geteld onder een binoculair.

Voor de bioassays met de springstaart *Folsomia candida* is als controle OECD getest. Deze grond bevat 10 % organisch materiaal en 20 % lutum. Reproductie op deze grond moet minimaal 100 juvenielen bedragen voor een geldige test.

Microtox-test

Bij de Microtox-test wordt gebruik gemaakt van de mariene bacterie *Vibrio fischeri* en wordt, in tegenstelling tot de overige bioassays, uitgevoerd in poriewater of een zwak zoute oplossing. Omdat geen bodemvocht is bemonsterd is gebruik gemaakt van de zwak zoute oplossing.

Voor de test wordt een verdunningsreeks gemaakt van het poriewater met een zoutoplossing en een oplossing met de bacterie. Na verschillende tijdstippen wordt de bioluminescentie in de verdunningreeks gemeten. Op basis van de resultaten kan een EC20-waarde worden berekend. Dit is de verdunning die leidt tot 20% afname van de bioluminescentie ten opzichte van de blanco (zoutoplossing). Hoe lager deze EC20-waarde is, hoe toxischer het monster.

De Microtox test is uitgevoerd conform een methode die is afgeleid van ISO 11348-3 [1998]. Van de bodemextracten is een verdunningsreeks gemaakt met de testoplossing waarin de bacterie *Vibrio fischeri* aanwezig is. De volgende verdunningen zijn getest: 45; 22,5; 11,3 en 5,6 volume%. Met een lichtmeter (Microtox®) is de afname van de bioluminescentie na 5, 15 en 30 minuten gemeten bij een incubatietemperatuur van 15°C. De analyses zijn in duplo uitgevoerd.

Voor aanvang van de test zijn in de testoplossing ter controle een aantal fysische en chemische parameters gemeten (zuurstof, pH, nitraat, ammonium en geleidbaarheid) en vergeleken met de randvoorwaarden. Wanneer de testen voldoen aan de randvoorwaarden, worden geen negatieve effecten van deze parameters verwacht en kunnen eventueel waargenomen effecten worden toegeschreven aan de verontreinigingen in de monsters.

Biomet

Biobeschikbare Cr(VI) en Zn/Cd concentraties werden bepaald voor 6 bodemmonsters gebruik makende van BIOMET® analyses, meer bepaald via biosensoren. Nadere achtergronden omtrent de methodologie zijn beschikbaar bij het Vlaamse VITO. Gebruik van een Cr, Zn-Cd biosensor resulteert in bioluminescentie wanneer respectievelijk Cr (VI) en Zn-Cd biobeschikbaar zijn. De bioluminescentie wordt gerelateerd aan een ijklijn waarbij de relatie tussen bioluminescentie en metaal concentratie wordt uitgezet. Het gebruik van een controle stam laat toe om zowel stimulatie als inhibitie van bioluminescentie door andere metalen, organische componenten of andere stoffen na te gaan. Er dient opgemerkt te worden dat de Cr-sensor enkel Cr (VI) meet en dus niet de speciatievorm Cr(III) geeft. Anderzijds zal de Zn-Cd sensor geen onderscheid maken tussen Zn en Cd aangezien het genetisch materiaal dat reageert op de biobeschikbare concentratie geen onderscheid maakt tussen beide metalen en op beide reageert.

2.3 Labexperimenten toediening ijzer.

Ijzer is in twee verschillende doses en in twee verschillende vormen aan de bodem in potten van 0.5 kg toegediend. De toegediende vormen zijn metallisch ijzer zoals ook

gebruikt bij de aanleg van de proefveldjes met additieven (Muijs et al., 2002) en Fe^{2+} als FeCl_2 . De laatste vorm heeft als voordeel dat het als een oplossing aan de bodem toegediend kan worden. De toediening van metallisch ijzer is ongeveer pH neutraal, bij de oxidatie van $\text{Fe}(0)$ wordt evenveel zuur geconsumeerd als bij de vorming van het neerslag wordt geproduceerd. Bij de aanleg van de proefveldjes bleek de pH licht te stijgen. Bij de toediening van FeCl_2 moet rekening worden met een pH daling, er wordt 3 maal zoveel zuur geproduceerd bij het neerslaan als hydroxide dan er bij de oxidatie aan zuur geconsumeerd wordt. Daarom is de toediening van FeCl_2 gecombineerd met het toedienen van loog. Van elk van beide vormen is ongeveer 10 gram en 20 gram Fe per kg grond toegediend aan grond die op 80% vochtigheid van verzadiging werd gehouden. De hoogste dosering is ongeveer gelijk aan die gebruikt is voor de proefvelden in het Noorderbos.

Voor toediening is het gehalte metalen gemeten met een 0.43 M HNO_3 extractie een EDTA extractie en een 0.01 M CaCl_2 extractie.. Verder is het oxalaat extraheerbaar Al, Fe en P bepaald. Bodemvocht is na 3, 10, 20, en 30 dagen geëxtraheerd met rhizon samplers die op twee diepten in de pot geïnstalleerd waren. In het bodemvocht zijn pH, EC, DOC en concentraties ortho P, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, P-totaal, Pb en Zn bepaald.

Na 10 dagen is opnieuw het oxalaat extraheerbaar Al, Fe en P bepaald om te bepalen welk deel van het ijzer reeds geoxideerd was.

3 Resultaten

3.1 Bodem en grondwater

De resultaten van alle uitgevoerde chemische analyses zijn te vinden in de Tabellen 1 t/m 5 van Bijlage 1.

Grondwater

De resultaten voor concentraties Cr en Ni in grondwater komen goed overeen met die als gemeten in 2000 (Muijs et al., 2002). Concentraties van As lagen in 2000 onder de destijds hogere detectielimiet en liggen er nu net er boven en voor 1 locatie onder de detectielimiet. Alle concentraties liggen beneden de streefwaarde voor ondiep grondwater voor As in grondwater. Concentraties van Cd en Pb liggen zoals in 2000 beneden de detectielimiet. De concentraties Cu liggen rond de streefwaarde voor ondiep grondwater. De concentraties van chroom liggen tussen de streefwaarde en interventiewaarde.

Opvallend zijn de hoge concentraties Ni die toen ook gemeten zijn, voor A3, de licht verontreinigde locatie, ligt deze boven de interventiewaarde van $75 \mu\text{g.L}^{-1}$. concentraties Ni in de bodem liggen echter altijd onder de interventiewaarde behalve voor veld A1 (de sterk verontreinigde veld) waar deze er boven ligt.

Bodem

De potentieel beschikbare metaalgehalten in de bodem zoals geëxtraheerd met 0.43 M HNO_3 in de niet verzuurde gedeelten van de proefvakken zijn goed vergelijkbaar met die uit het eerder uitgevoerde onderzoek. De concentraties Ni, Zn en Cd in het verzuurde deel zijn duidelijk lager wat mogelijk het gevolg is van uitspoeling van deze metalen door een toegenomen mobiliteit. De potentieel beschikbare concentraties Cr, Cu en Pb liggen juist wat hoger in de verzuurde grond. Deze sterk immobiele metalen zijn mogelijk beter beschikbaar geworden als gevolg van de verlaagde pH, waardoor een groter deel van het totaal potentieel beschikbaar is geworden. Om dit na te gaan zou in dezelfde monsters ook het totaalgehalte metalen gemeten moeten worden.

De concentraties van Cd, Cr, Zn en Ni in het 0.002 M CaCl_2 extract in de niet verzuurde bodems liggen duidelijk hoger dan de concentraties in 2000 (van 0.002 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ extracten). Zeer waarschijnlijk is dit het gevolg van een daling van de pH. De pH (gemeten in het 0.002 M CaCl_2 extract) is gezakt van ongeveer 5.4 in 2000 naar 4.8 in 2005. Daarnaast is ook de DOC concentratie hoger dan in 2000, dit kan ook bijdragen aan een hogere concentratie van metalen in het bodemvocht. De hogere concentratie Cu is hier zeer waarschijnlijk het gevolg van.

De toediening van zwavel om de plots te verzuren heeft gezorgd voor een toename van de SO_4 concentratie in oplossing met ongeveer een factor 2-2.5. Deze toename is tijdelijk. Het door de oxidatie van S gevormde sulfaat zal op den duur uitspoelen.

Een vergelijking tussen verzuurde en niet verzuurde plots laat zien dat de concentraties van de meeste metalen toenemen bij verzuring. De toename neemt af volgens (met tussen haakjes de factor waarmee de concentratie gestegen is): Pb (2-3), Cd(2.1-2.7), As (1.4-1.9), Ni (1.2-1.7), Cr (1.1- 1.7), Zn (1.1-1.6). De sterke toename van Pb is opmerkelijk, in het algemeen hangt de concentratie Pb niet zo sterk af van de pH als bijvoorbeeld concentraties van Cd en Zn. Een verhoogde concentratie potentieel beschikbaar Pb en concurrentie door een toegenomen concentratie Al (niet gemeten) zijn hier mogelijk debet aan. De concentratie Cu daalt echter met dalende pH voor veld 1 en 2, en stijgt bij veld 3. Dit is het gevolg van dalende concentraties DOC voor veld 1 en 2 en stijgende concentraties DOC in veld 3.

De concentratie van As in oplossing is ook gestegen. Als gevolg van verzuring verwacht je een afname van de concentratie door een sterkere binding van As door Al en Fe (hydr)oxides bij lagere pH. Omdat de bodem verzuurd is met S, is de concentratie SO_4 gestegen, dit anion concurreert met de andere anionen waaronder As voor de beschikbare bindingsplaatsen.

Van de basische kationen blijven de concentraties van Ca bij verzuring ongeveer gelijk, concentraties van Mg dalen licht terwijl concentraties van Mn sterk toenemen. De concentratie K stijgt duidelijk terwijl de concentratie Na daalt bij verzuring.

De concentratie P in oplossing stijgt bij verzuring, de oorzaak hiervan is dezelfde als bij arseen.

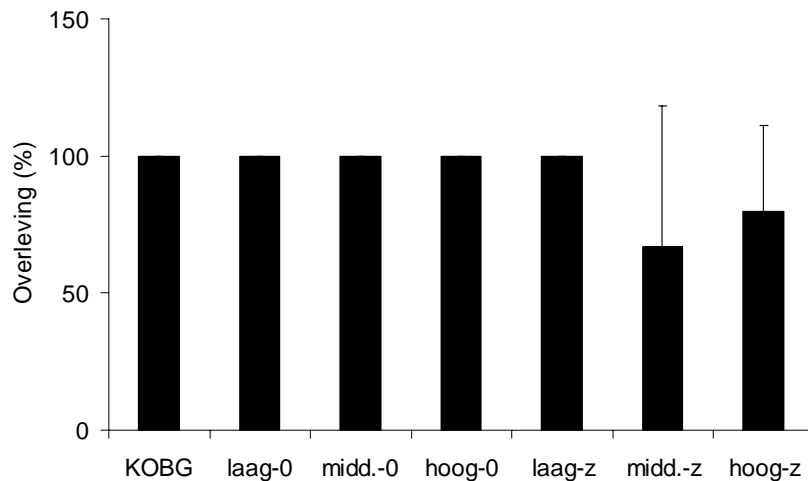
Bij stikstof neemt de concentratie NH_4 sterk toe bij verzuring van de proefvelden 1 en 2 terwijl de concentratie NO_3 sterk afneemt. De totaal concentratie N neemt licht af bij verzuring. Mogelijk is dit een gevolg van een geremde nitrificatie bij lagere pH. Bij proefveld 3 (de licht verontreinigde locatie) nemen zowel de concentraties NH_4 en NO_3 toe.

3.2 Bio-assay regenwormen

Overleving

Bij het uithalen van de proef na 4 weken, bleken enkele potten 6 adulte wormen te bevatten (1 meer dan toegevoegd). Dit kan komen door het aanwezig zijn van een worm in de gezeefde grond of een telfout bij het toevoegen. Deze potten zijn verder buiten beschouwing gelaten.

De overleving in de potten was gemiddeld over de proef 92%. Alle wormen bleven leven op de gronden zonder verlaagde pH (dus 100% overleving). In de potten met verlaagde pH was er gemiddeld 82% overleving. Zo werden alleen dode wormen gevonden in de potten met midden en hoge vervuiling (zie Figuur 2). Het gemiddelde was echter niet significant verschillend van de referentiegrond (Mann-Whitney Test, $P > 0.05$).

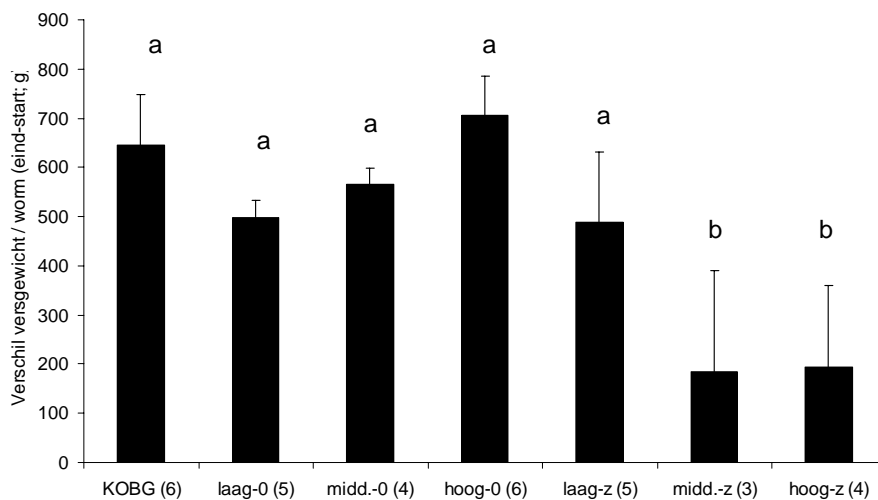


*Figuur 2 Gemiddelde (\pm SD, n=6) overleving van regenwormen (*L. rubellus*) na 4 weken op diverse gronden. De KOBG-grond is de referentie/standaardgrond, de andere uit het Noorderbos met een verschillende mate van vervuiling (laag-midden-hoog) en met geen (0) en wel (Z) kunstmatig verlaagde pH.*

Groei na 4 weken

Het versgewicht van de wormen op gronden met een niet veranderde bodem pH nam toe tijdens de proef (Figuur 3). De wormen op de hoogst vervuilde gronden hadden een gemiddeld grotere toename dan de minst vervuilde grond zonder pH behandeling.

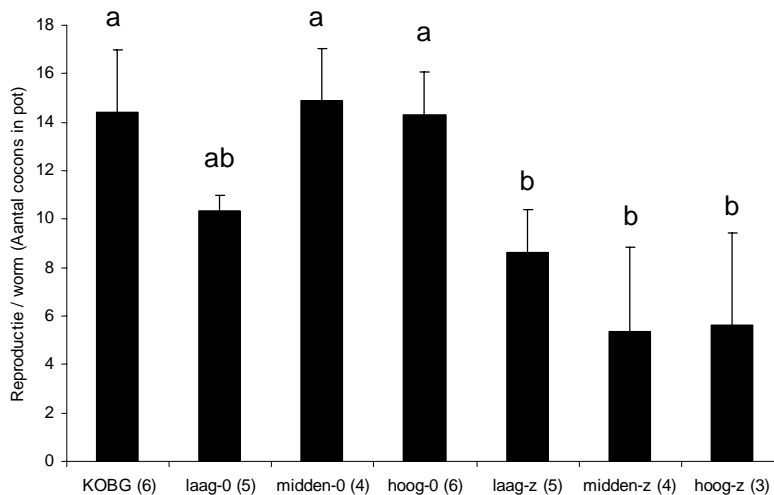
In de potten met verzuurde grond nam het gewicht in enkele potten af (niet zichtbaar in Figuur 3). Deze potten met een afname in gewicht bepalen voornamelijk het lagere gemiddelde van midden en hoog vervuilde gronden. De Bonferroni Post Hoc test toonde aan dat de potten in die groep zowel lager waren dan de referentie (KOBG), als de laag vervuilde gronden met een zwavel behandeling ($P < 0.05$). Er was een significante interactie tussen de mate van vervuiling en de pH behandeling (ANOVA; $P < 0.01$).



Figuur 3 Gemiddeld (\pm SD) verschil tussen het einde (na 4 weken) en de start in versgewicht *L. rubellus* (g worm), op diverse gronden (tussen haakjes aantal replica's). De KOBG-grond is de referentie/standaardgrond, vergeleken met gronden uit het Noorderbos; met een verschillende mate van vervuiling (laag-midden-hoog) en met geen (0) en wel (Z) kunstmatig verlaagde pH. Staven met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (ANOVA, Post Hoc Bonferroni, $P < 0.05$)

Coconproductie (reproductie)

Aan het einde van de 4 weken werden in elke pot cocons gevonden en geteld. De gemiddelde reproductie van wormen op de gronden zonder pH verlaging was vergelijkbaar met die van de referentiegronden (Figuur4). De reproductie op de gronden met een verlaagde pH was verminderd in vergelijking met de referentie ($P < 0.05$), maar niet lager in vergelijking met de reproductie op de laag vervuilde gronden zonder pH behandeling (Bonferroni Post Hoc test).



Figuur 4 Gemiddelde (\pm SD) aantallen cocons van *L. rubellus* na 4 weken op diverse gronden (aantal replica's). KOBG-grond is referentie/standaardgrond, de andere uit het Noorderbos met een verschillende mate van vervuiling (laag-midden-hoog) en met geen (0) en wel (Z) kunstmatig verlaagde pH. Staven met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (ANOVA, Post Hoc Bonferroni, $P < 0.05$)

Discussie

De bodems zonder pH verlaging uit de voormalige vloeivelden lijken geen negatieve effecten te hebben op regenwormen. De overleving is 100%, er is een toename in versgewicht en de reproductie is vergelijkbaar met de reproductie op een standaardbodem en zelfs wat hoger dan de laagst vervuilde gronden. In een eerdere bioassay was de gewichtsverandering lager bij een hogere vervuiling (Muijs et al, 2002), maar dat is hier niet bevestigd. De resultaten zijn wel in overeenstemming met de eerdere conclusies dat de aantallen wormen in de meest vervuilde gebieden niet verminderd zijn (Groenenberg et al., 1999) en dat de reproductie in bioassays niet is verminderd (Muijs et al, 2002).

Echter, deze bioassay laat ook zien dat regenwormen op de bodem die zowel verzuurd als vervuild is minder presteren dan op de referentiebodem. De wormen vertonen sterfte, het versgewicht neemt minder toe (en soms af) en de reproductie ligt lager.

Een pH verlaging kan direct negatieve gevolgen hebben voor wormen, omdat regenwormen licht zure tot neutrale bodems prefereren. Echter, de behandeling met zwavel is waarschijnlijk niet de verklaring van een verminderde prestatie van de wormen, want er is een sterke interactie tussen de mate van vervuiling en de zwavelbehandeling; de meest vervuilde bodems laten de grootste effecten zien na een zuurbehandeling.

Het is onduidelijk welke metalen het meest bijdragen aan de effecten op de regenwormen. De totaalconcentraties van metalen in het veld liggen rond de kritische grenzen voor regenwormen; vooral de concentraties chroom, koper, nikkel en zink. Het is dan ook te verwachten dat door de verzuring juist deze metalen de effecten in de bio-assay veroorzaken, omdat ze dan over deze grenzen zullen gaan. Eerder onderzoek (Groenenberg, 1999) liet zien dat de verzuring zal leiden tot een toename van het vrije Cr- ion, cadmium en zink, terwijl arseen geen duidelijke toename liet zien. Uit de metaalanalyses van de gronden in dit onderzoek blijkt dat deze metalen worden gemobiliseerd door de verzuring en in het bijzonder Pb. De mobilisatie van al deze metalen is de meest voor de hand liggende oorzaak voor de verminderde prestaties van de wormen in de bioassay.

Meer inzicht in welk metaal of welke metalen de oorzaak zijn van de remming van de groei kan worden verkregen door het analyseren van interne concentraties. Deze kunnen dan vergeleken worden met de concentraties in het bodemvocht van de zuurbehandelde gronden en kritische literatuurwaarden voor regenwormen, zoals (Hobbelen et al., 2004). Daarnaast zijn concentraties metalen in wormen ook van belang voor doorvergiftiging bij wormetende dieren (Muijs et al, 2002).

Opvallend is te noemen dat effecten van de verzuurde bodems zichtbaar werden, terwijl de wormen onvervuild voedsel kregen te eten. In het veld kunnen de effecten wellicht nog sterker optreden als de verzuring ook zal leiden tot verhoogde metaalconcentraties in de strooisellaag, de voornaamste bron van voedsel voor de regenwormen.

Geconcludeerd wordt dat de verzuring van de meest vervuilde gebieden dus kan leiden tot een verlaging van de activiteit van regenwormen. Dit kan leiden tot een verminderde nutriëntencyclus en kan uiteindelijk ook consequenties voor een stabiele ontwikkeling van bos op deze locaties.

3.3 Gewasanalyses.

Bij bemonstering van het gras voor gewasanalyses bleek het gras zeer slecht te groeien op de verzuurde plots. In plots 2az en 3az was er haast geen gewas terwijl in de meest vervuilde plot nog matig gewas groeide.

De resultaten van de gewasanalyses staan vermeld in de Tabel 1, in deze tabel staan ook gehalten in gewassen aangegeven waarbij fytotoxische effecten optreden volgens literatuuronderzoek als gerapporteerd in De Vries et al., 2006. Er is geen duidelijke relatie tussen het Cr gehalte in het gewas en de Cr concentratie in de bodem. Wel is het duidelijk dat een verlaging van de pH de Cr opname door het gewas verhoogd. Voor alle plots zit Cr in de range waarbij fytotoxiciteit kan optreden. Voor Ni is er wel een duidelijk verband tussen het gehalte in de bodem en het gehalte in het gewas maar is er geen eenduidig effect van verzuring op het gehalte Ni. Gehalten Ni liggen voor de sterkst verontreinigde plot boven de grenswaarde voor fytotoxiciteit. Voor Zn liggen de concentraties in de meest verontreinigde plot duidelijk hoger dan in de andere en liggen boven de grenswaarde voor fytotoxiciteit, de waarde van 100 mg/kg is mogelijk wel laag gezien het gemiddelde gehalten van ongeveer 50 mg/kg Zn in Nederland. Verzuring verhoogd de concentratie Zn, met name in de sterkst verontreinigde plot.

Tabel 1 Gehalten metalen en S in gras en kritische gehalten voor fytotoxiciteit.

monster nr	As ug/kg	Cd ug/kg	Cr ug/kg	Cu mg/kg	Ni ug/kg	Pb mg/kg	S mg/kg	Zn mg/kg
1a	1404	<48	4605	7	15477	0.54	3086	145
1az	1561	<48	6940	10	8609	0.87	5595	279
2a	1436	<48	4316	8	7188	0.78	3622	72
2az	1532	<48	16582	6	9618	0.66	4548	83
3a	1381	<48	3119	7	3220	0.96	2438	72
3az	1588	<48	6300	11	7441	0.87	3151	100
1a	1287	<48	5672	8	17131	0.57	3153	147
1az	1538	<48	4136	10	7317	1.02	5696	288
2a	1329	<48	4568	8	7217	0.81	3614	75
2az	1886	<48	10216	10	6951	0.95	4579	91
3a	1058	<48	2575	9	3358	1.05	2472	71
3az	1670	<48	11442	11	10249	0.94	3275	98
fytotox	2000	30000	1000	15	7000	67		100

3.4 Groeisnelheid en biomassa bacteriën

De bacteriële biomassa is erg laag voor alle monsters en de verschillen zijn niet significant. Er is wel een tendens dat de biomassa hoger is in de verzuurde grond ($p=0.08$, two-way anova). Dit kan komen door het wegvallen van predatie door protozoën en nematoden.

De bacteriële groeisnelheid (gemeten als thymidine en leucine inbouw in DNA en eiwitten) is hoger in verontreinigde grond ($p<0.002$). Dit kan komen door het hogere organische stofgehalte, het organische stofgehalte is positief gecorreleerd met de verontreiniging (zie Tabel 1). Verzuring leidt tot een afname van de groeisnelheid ($p<0.001$). De afname is het sterkst in de verontreinigde grond. Dit wijst op toxische effecten van metalen.

Tabel 2 Bacteriële biomassa en groeisnelheid gemeten als thymidine inbouw (DNA synthese) en leucine inbouw (eiwitsynthese). Gemiddelden en standard error.

		Bacteria ($\mu\text{g C/g dry soil}$)		Thymidine inbouw (pmol/g.h)		Leucine inbouw (pmol/g.h)	
		average	se	average	se	average	se
zwaar verontreinigd	1a	3,99	1,45	13,70	0,12	230	17
	1az	17,66	5,05	4,21	0,14	105	2
matig verontreinigd	2a	11,69	0,62	10,24	0,26	164	0
	2az	14,95	0,98	7,10	0,40	111	7
licht verontreinigd	3a	14,01	3,57	8,47	0,47	125	3
	3az	15,48	6,91	5,95	0,12	89	5

3.5 Nematoden

Uit Tabel 3 blijkt dat de hoogste aantallen nematoden (ca 6200) werden aangetroffen in de zwaarst gecontamineerde blanco monsters uit veld 1 en -2, de monsters A1 en A2 en de laagste aantallen (ca 1650) in de zure monsters A1z en A2z uit dezelfde veldjes. De verzuring van de grond had een reductie van ca 73% van de aantallen nematoden tot gevolg. In veld 3 werden in blanco-32 en in zure-32z grond ongeveer de helft (ca 3150) van de aantallen in veld 1,2-blanco aangetroffen. Verzuring reduceerde dus in veld-3 de aantallen niet.

Tabel 3 Aantal nematoden, totaal en per functionele groep, per 100 g droge grond.

	a1	a1z	a2	a2z	a3	a3z
Nematoden totaal	6350	1770	6140	1550	3190	3130
Bacterivoren	1574	1122	3442	767	1120	1521
Herbivoren	4697	368	2616	707	1801	1492
Fungivoren	79	280	83	75	-	73
Omnivoren	-	-	-	-	113	15
Predatoren	-	-	-	-	156	29

a1, a2, a3 blanco, a1z, a2z, a3z zuur. Veld 1: a1, a1z Veld 2: a2,a2z Veld 3: a3, a3z

Gemiddeld worden in grond 2000-4000 nematoden per 100 g aangetroffen. De aantallen in veld 3 zijn dus gangbaar, de aantallen in veld 1,2-blanco vrij hoog. Het

verschil zou kunnen zijn veroorzaakt door de vegetatie die in veld 1,2 volledig uit gras bestaat en in veld 3 uit een mengsel van gras (60%) en brandnetels(40%). De verzuring veroorzaakte de dood van de vegetatie voor 90% in veld 1 (A1z), voor 75% in veld 2 (A2z) en slechts in een geringe mate van 20% in veld 3 (A3z). De reductie van de aantallen nematoden ten gevolge van verzuring in veld 1,2 (A1z,A2z) lijkt dus vooral veroorzaakt door de uitschakeling van de vegetatie, de handhaving in veld 3 (A3z) is zeker een gevolg van de handhaving van de vegetatie. Verzuring van de grond lijkt dus zelf geen negatief effect te hebben op de aantallen nematoden.

De hogere concentraties contaminanten in veld 1 en –2 lijken geen negatief effect op de totale aantallen nematoden te hebben (vergelijk A1, A2 met 32), zolang er een actieve vegetatie aanwezig is. In hoeverre in de zure monsters gemobiliseerde zware metalen een bijdrage hebben geleverd aan de reductie van de nematoden of dat deze reductie uitsluitend werd veroorzaakt door de uitschakeling van de vegetatie is niet uit deze waarnemingen op te maken.

Aantallen bacterivore nematoden in de monsterserie variëren van ca 800 (A2z) tot ca 3400 (A2) met een gemiddelde van ca 1600. De laagste aantallen werden waargenomen in de zure monsters A1z,A2z, maar deze aantallen waren niet significant lager dan bijvoorbeeld in het blanco monster 32, wat indiceert dat de hogere belasting met (gemobiliseerde) contaminanten waarschijnlijk geen eigen negatief effect op aantallen bacterivoren heeft. De reductie van de aantallen bacterivoren in veld1,2 ten gevolge van de verzuring lijkt dus vooral het gevolg van het wegvallen van de vegetatie. Van een associatie met de gradiënt in contaminanten is bij de totale aantallen bacterivoren dus geen sprake

Aantallen herbivore nematoden variëren van ca 400 (A1z) tot ca 4700 (A1) met een gemiddelde van ca 1950. De laagste aantallen werden waargenomen in de zure monsters A1z,A2z en deze aantallen (ca 1100 en 800) waren aanzienlijk lager dan het aantal in het zure monster uit het begroeide veld 3 (1500).De herbivoren vertonen dus evenals de bacterivoren geen negatieve associatie met de contaminanten concentratie in de blanco monsters (A1,A2,32) en de negatieve associatie in de zure monsters (A1z,A2z,32z) wordt in de eerste plaats veroorzaakt door het wegvallen van de vegetatie. Voor de positieve associatie van de herbivoren met de contaminanten concentratie,met de grootste aantallen herbivore nematoden in de sterkst verontreinigde plots, is geen verklaring aan te dragen.

Aantallen fungivore nematoden variëren van 0 (32) tot ca 300 (A1z), met een gemiddelde van ca 100. Verzuring reduceerde de aantallen niet: in veld 1 (A1z) en veld 3 (32z) werden in de zure monsters aanzienlijk meer fungivoren aangetroffen dan in de blanco monsters terwijl in veld 2 verzuring geen aantalsreductie tot gevolg had. Zowel in de blanco- als in de zure monsters is het aantal fungivoren positief geassocieerd met de contaminanten concentratie.

Zowel omnivore (ca 100) als predatore (ca 150) nematoden werden slechts aangetroffen in het minst gecontamineerde veld 3. Verzuring reduceerde deze aantallen met 90% (omnivoren) en 80% (predatoren). Deze categoriën nematoden

zouden negatief geassocieerd kunnen zijn met de concentraties contaminanten en aangezien verzuring in veld 3 bacterivoren, herbivoren, fungivoren en totale aantallen niet significant negatief beïnvloedde, zou de aantalsreductie van omnivoren en predatoren in het zure monster 32z mede veroorzaakt kunnen zijn door de mobilisatie van zware metalen.

Tabel 4 presenteert het aantal taxa dat in de verschillende monsters werd aangetroffen. In het totaal werden 30 taxa onderscheiden, 14 bacterivore, 11 herbivore 3 fungivore, 1 omnivoor en 1 predatoor.

Tabel 4 Aantal taxa per veld en per behandeling, totaal en per functionele groep.

	Veld 1	Veld 2	Veld 3	Blanco	Zuur
Taxa totaal	16	23	23	23	25
Bacterivoren	9	13	12	12	12
Herbivoren	6	7	8	8	8
Fungivoren	1	3	1	1	3
Omnivoren	-	-	1	1	1
Predatoren	-	-	1	1	1

Veld 1: a1, a1z Veld 2:a2, a2z, Veld 3: a3, a3z. Blanco: a1,a2,a3 Zuur: a1z, a2z, a3z

In veld 1 werden 16 taxa aangetroffen, in veld 2 en –3 elk 23. Het lijkt niet onwaarschijnlijk dat het geringere aantal geïdentificeerde taxa in veld 1 samenhangt met de hoge contaminantenlast. Evenals in 2000 werd de nematodenfauna gedomineerd door bacterivore Cephalobidae (Acrobeloides, Heterocephalobus, Cephalobus en Acrobeles) en de herbivoor Tylenchorhynchus. Tylenchidae omvatten meerdere (ca 4) geslachten, Rotylenchus/Helicotylenchus bestaat dus uit twee moeilijk van elkaar te onderscheiden geslachten, ook de omnivore Dorylaimida omvatten meerdere geslachten.

Tabel 5 presenteert de distributie van de aantallen over de onderscheiden taxa in de zes monsters. Terwijl de bacterivoren als categorie (Tabel4) geen consistente trends ten opzichte van de contaminanten gradiënt demonstreren worden deze wel waargenomen voor afzonderlijke taxa. Acrobeloides en Metateratocephalus zijn positief geassocieerd met de hogere contaminanten concentraties in veld 1 en-2, zowel in de blanco als in de zure monsters.

Tabel 5 Aantal (per 100 g droge grond) nematoden per functionele groep en per taxum.

	A1	A1z	A2	A2z	A3	A3z
<u>Bacterivoren</u>	1574	1122	3442	767	1120	1521
Acrobeloides	525	666	1046	594	57	278
Metateratocephalus	367	333	138	23	28	-
Rhabditis	157	9	165	15	115	293
Monhystera	52	-	83	8	28	29
Plectus	105	61	83	45	170	117
Cephalobus	184	9	551	23	213	146
Acrobeles	79	-	303	-	71	-
Panagrolaimus	26	44	110	-	-	73
Teratocephalus	79	-	165	15	340	307
Heterocephalobus	-	-	330	15	85	161
Wilsonema	-	-	441	23	14	102
Bunonema	-	-	28	-	-	-
Prismatolaimus	-	-	-	8	-	-
Diplogaster	-	-	-	-	-	15
<u>Herbivoren</u>	4697	368	2616	707	1801	1492
Tylenchorhynchus	2939	237	743	414	241	527
Trichodorus	1181	26	826	38	440	366
Hemicycliophora	52	-	55	8	468	15
Tylenchidae	184	-	385	38	468	351
Pratylenchus	289	96	303	60	-	117
Rotylenchus/H.	52	9	275	143	184	117
Criconema	-	-	28	8	-	-
<u>Fungivoren</u>	79	280	83	75	-	73
Aphelenchoides	79	280	83	53	-	73
Aphelenchus	-	-	-	8	-	-
Seinura	-	-	-	15	-	-
<u>Omnivoren</u>	-	-	-	-	113	15
Dorylaimidae	-	-	-	-	113	15
<u>Predatoren</u>	-	-	-	-	156	29
Mononchus	-	-	-	-	156	29

Van gevoeligheid voor contaminanten, afwezigheid van vegetatie en verzuring is bij deze taxa dus weinig of geen sprake. Daarentegen zijn Plectus (zwak) en Teratocephalus (sterk) negatief geassocieerd met de hogere concentraties contaminanten, in blanco en in zure monsters. Gevoeligheid voor contaminanten kan bij deze taxa niet onderscheiden worden van de negatieve effecten ten gevolge van de afwezigheid van vegetatie. Rhabditis, Cephalobus, Heterocephalobus en Wilsonema zijn negatief geassocieerd met een hoge contaminantenlast in de zure monsters, maar niet in de blanco monsters. Dit zou kunnen duiden op zowel een negatief contaminanteneffect als wel een negatief effect van de afwezigheid van vegetatie. Acrobeles lijkt extreem gevoelig voor verzuring omdat het taxum aanwezig is in de 3 blanco monsters en afwezig in de zure monsters. Monhystera en Panagrolaimus vertonen geen trends die aanwijzing geven over enigerlei gevoeligheid voor

contaminanten. De dominante herbivore taxa *Tylenchorhynchus* en *Trichodorus* vertonen dezelfde trends als de categorie herbivoren, dat wil zeggen zij zijn positief geassocieerd met contaminanten in de blanco monsters en negatief in de zure monsters. Van gevoeligheid voor de contaminantenlast bij aanwezigheid van vegetatie, in de blanco monsters, is dus zeker geen sprake bij deze taxa en bij de zure monsters kan de negatieve associatie met contaminanten niet gescheiden worden van de negatieve effecten van de afwezigheid van vegetatie. *Tylenchidae* en *Pratylenchus* zijn in de blanco monsters eveneens positief met de contaminantenlast geassocieerd, en zijn sterk gereduceerd in de zure monsters maar vertonen hierin geen consistente trends. *Rotylenchus/Helicotylenchus* is misschien gevoelig voor hoge concentraties contaminanten en *Hemicycliophora* lijkt de enige herbivore soort die zeker gevoelig is voor contaminanten, gezien de negatieve associatie hiermee zowel in blanco als in zure monsters.

Met betrekking tot het fungivore taxum *Aphelenchoides* geldt hetzelfde als voor de categorie fungivoren aangezien dit taxum bijna volledig hiermee samenvalt. Van de taxa *Aphelenchus* en *Seinura* werden slechts enkelingen geïdentificeerd. *Aphelenchoides* lijkt dus een positieve associatie met contaminanten en verzuring en geen negatieve associatie met de afwezigheid van vegetatie te hebben. *Mononchus* en *Dorylaimidae*, de predatore en omnivore taxa lijken dus negatief met de contaminantenlast en de verzuring geassocieerd.

Samenvattend wordt gesteld dat :

- Totale aantallen nematoden niet negatief associëren met de contaminatie, zowel met als zonder gewas.
- Het aantal onderscheiden taxa bij de hoogste contaminanten-gehalten beduidend (30%) lager is.
- Aantallen bacterivore en herbivore nematoden niet negatief associëren met de contaminatie.
- Aantallen fungivore nematoden beduidend hoger zijn bij hogere gehalten aan contaminanten, vooral na verzuring en dus mobilisatie van contaminanten.
- Omnivore en predatore nematoden en de herbivore *Hemicycliophora* negatief associëren met de contaminatie
- Individuele taxa dikwijls een respons op de contaminanten vertonen die afwijkt van de categorie waar zij toe behoren
- De bacterivore taxa *Acrobeloides* en *Metateratocephalus* en het fungivore taxum *Aphelenchoides* positief associëren met de contaminatie

Deze resultaten leiden tot de conclusie dat zolang gewasgroei niet stagneert ten gevolge van een hoge contaminantenlast en/of andere stressfactoren de nematodenfauna kwantitatief intact blijft maar wel enkele verschuivingen in samenstelling te zien geeft: de achteruitgang van omnivoren en predatoren en de toename van microbivoren zoals de fungivore *Aphelenchoides* en de bacterivoren *Acrobeloides* en *Metateratocephalus*. Deze verschijnselen zijn eerder reeds gesignaleerd in metaalgecontamineerde zandgronden zoals bijvoorbeeld de Maatheide te Lommel/België, waar *Aphelenchoides* en *Acrobeloides* de enige taxa zijn die zich handhaven in het zwaar zinkgecontamineerde onbegroeide terrein.

3.6 Bio-assay springstaarten

Tabel 6 geeft per monster de overleving van adulten en de reproductie uitgedrukt als het aantal juvenielen per adult. Afgezien van monster a1, dat een hoge standaarddeviatie heeft, zijn er geen duidelijke verschillen in overleving tussen de monsters. Ook de reproductie vertoont geen duidelijke trend met de mate van verontreiniging en/of verzuring. In de verzuurde monsters wordt de randvoorwaarde m.b.t. tot de pH van de test overschreden, $4 < \text{pH} < 7$. Binnen deze pH range is er geen effect van de pH op de overleving. Buiten dit traject is hierover geen informatie.

Tabel 6 Overleving springstaarten (%) en reproductie (tussen haakjes de standaarddeviatie)

	a1	a1z	a2	a2z	a3	a3z
overleving	42.5	80.0	82.5	77.5	85	72.5
adulten	(46.5)	(8.2)	(12.5)	(18.9)	(5.8)	(9.6)
aantal	32.5	49.4	66.9	39.7	47.1	49.9
juvenielen/adult	(19.7)	(5.9)	(10.9)	(2.0)	(5.7)	(3.8)
pH-KCl	4.4	3.6 ¹	4.1	3.6 ¹	4.3	3.8 ¹

¹ Overschrijding criterium pH ($4 < \text{pH} < 7$)

3.7 Microtox

Voor alle monsters, van licht tot sterk verontreinigd, kan een EC_{20} berekend worden. Dit terwijl bij de vorige studie (bemonstering in 2000, Muijs et al., 2002) geen EC_{20} vastgesteld kon worden. Destijds is poriewater gebruikt voor de test terwijl nu een $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ extractie is gebruikt.

De concentratie Cr is nauwelijks anders in de CaCl_2 extracten van nu vergeleken met de concentraties in het poriewater in 2000. De concentratie As is alleen in het sterk verontreinigde veld hoger dan destijds, de concentraties voor de minder verontreinigde veldjes zijn ongeveer gelijk. Het is dus niet waarschijnlijk dat het toxische effect te wijten is aan deze metalen. Het meest opvallend is een duidelijke stijging van de Cd en Zn concentraties t.o.v. het bodemvocht in 2000

Tabel 7 % Elutriaat in verdunning bij 20 (EC_{20}) en 50% (EC_{50}) reductie in bioluminescentie

	a1	a1z	a2	a2z	a3	a3z
EC_{20}	24.4 (22.9-26.0)	35 (27.1-45.2)	24.8 (23.3-28.5)	39.4 (32.8-47.3)	47.0 (44.2-50.1)	26.1 (15.2-44.9)
EC_{50}	73.2 (66.5-80.0)	>81.9	81.5 (73.6-90.3)	>81.9	>81.9	81.5 (73.6-90.3)
pH (elutriaat)	5.0	4.0	4.6	3.9	5.7	4.7
pH aangepast	7.2	7.2	7.4	7.6	7.5	7.1

Een probleem bij de evaluatie van deze test is dat de pH in het testmedium aangepast is.

3.8 Biomet

Analyse van de 6 bodemstalen met de controle stam AE2279 (constitutieve of continue lichtproductie) toont dat geen significante inhibitie ($S/R < 1$) van lichtproductie plaatsvindt. Vandaar dat geen bijkomende verdunningen van bodemsuspensies werden aangemaakt waarop biosensor metingen worden uitgevoerd.

De resultaten van het onderzoek zijn door het VITO beoordeeld en als volgt samengevat:

- Analyse van de 6 bodemmonsters met Cr biosensor toont aan dat de meeste stalen geen relevante biologisch beschikbare concentraties aan Cr(VI) equivalenten bevat. De verschillende bodems bevatten gemiddelde biobeschikbare chromaat concentraties tussen 12 en 20 mg/kg ds.
- Analyse van de 6 bodemmonsters met de Zn/Cd biosensor toont aan dat de meeste stalen ook geen relevante biologisch beschikbare concentraties aan Zn of Cd equivalenten bevat. De verschillende bodems bevatten gemiddelde biobeschikbare Zn/Cd concentraties tussen 12 en 40 mg/kg ds.
- De biomet test laat een lichte stijging zien van Cr(VI) equivalenten (25-50% toename) en Cd equivalenten (0 tot 90%) bij verzuring van de bodem. De biobeschikbare concentraties in Zn equivalenten daarentegen nemen juist af.

Ten aanzien van de beoordeling geeft het VITO aan dat er tot heden geen duidelijke beoordelingscriteria zijn, maar dat wordt vergeleken met resultaten (database) van eerdere onderzoeken.

3.9 Labexperimenten toediening ijzer.

De resultaten van de metingen staan in tabel 6 t/m tabel 11 van Bijlage 2. Uit de metingen van het oxalaat extraheerbaar ijzer blijkt dat het grootste deel (70-90%) van het toegediende ijzer binnen 10 dagen geoxideerd is.

De toediening van ijzer als metallisch ijzer ($Fe(0)$) verhoogt de pH met 1-1,5 eenheid afhankelijk van de dosis. Deze stijging is hoger dan in de proefvelden in het Noorderbos. In de potten met $FeCl_2$ stijgt de pH tot ongeveer 7,5 als gevolg van de toediening van $Ca(OH)_2$. De geleidbaarheid, een maat voor de zoutsterkte, van de oplossing daalt enigszins in de potten met toegediend metallisch ijzer, waarschijnlijk door adsorptie, terwijl deze sterk stijgt in de potten waaraan $FeCl_2$ is toegediend. Deze zoutsterkte blijft in de potproeven ook in de tijd hoog terwijl in het veld de overmatige hoeveelheid zout op den duur zal verdwijnen.

Het toedienen van metallisch ijzer verlaagt de concentratie DOC in oplossing, dit is een logisch gevolg van de verhoogde concentratie Fe hydroxiden in de bodem die DOC adsorberen. Toedienen van $FeCl_2$ laat juist een sterke verhoging van de DOC concentratie zien. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de zeer hoge zoutconcentratie en zal daarom in de praktijk van tijdelijke aard zijn. De sterke verhoging van de

zoutconcentratie maakt de resultaten van de proef met toediening van FeCl_2 moeilijk overdraagbaar naar de veldsituatie waar de zoutsterkte na verloop van tijd weer zal normaliseren. De zoutsterkte heeft namelijk invloed op de immobilisatie van zware metalen zowel direct als indirect via de verandering van de concentratie DOC.

De concentraties ortho P en totaal P dalen met een factor 50-100 bij toediening van ijzer. Concentraties As dalen tot beneden de detectiegrens van $16 \mu\text{g.L}^{-1}$ bij toediening van ijzer onafhankelijk van de vorm en dosis. Concentraties in oplossing van Cr dalen met een factor 15 tot 40 bij toediening van metallisch ijzer met de sterkste reductie bij de hoogste toediening. Ook de concentratie van Cd wordt sterk verlaagd bij de toediening van ijzer namelijk met een factor 15 en 40 voor respectievelijk de lage en hoge dosis. Ook de concentraties van overige metalen dalen bij toediening van metallisch ijzer met de sterkste afname bij de hoogste toediening.

Toediening van FeCl_2 geeft tegenstrijdige resultaten. Concentraties Cr dalen maar het sterkst voor de laagste toediening. Bij Cd stijgt de concentratie na toediening voor de laagste additie terwijl deze bij de hoogste daalt. De Cu concentratie blijft bij lage toediening ongeveer gelijk terwijl deze bij de hoge toediening stijgt. Dergelijke tegenstrijdige effecten zijn waarschijnlijk toe te schrijven aan de sterke verandering in zoutsterkte en DOC concentratie.

Toediening van metallisch ijzer ($\text{Fe}(0)$) is een effectief middel om de concentratie van metalen in oplossing te verlagen met name voor Cr en As en in mindere mate Cd. Belangrijke vragen die nog beantwoord moeten worden hoe effectief de toediening van ijzer is in het geval de bodem verzuurd is, en de praktische uitvoerbaarheid van een dergelijke toediening.

4 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies

Op basis van het uitgevoerde onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De bodem in de onbehandelde en niet kunstmatig verzuurde plots is in een periode van 5 jaar al gedaald met een halve pH eenheid.
- Verdergaande verzuring van de bodem, hier kunstmatig versneld door toediening van zwavel, leidt tot mobilisatie van de concentraties van de metaal kationen (in afnemende mate) Cd, Pb, Ni, Cr en Zn. Ook de concentratie van het als anion aanwezige As neemt toe. Dit laatste is waarschijnlijk een tijdelijk effect als gevolg van de tijdelijk verhoogde sulfaatconcentratie in de bodem.
- Verzuring van de bodem leidt voor Cr, Cu en Zn tot verhoging van gehalten deze metalen in het gewas.
- Verzuring van de vervuilde bodem leidt tot negatieve effecten op regenwormen. De meest vervuilde bodems veroorzaken de sterkste negatieve effecten. De ontwikkeling van bos en verzuring op de meest vervuilde locaties kan leiden tot negatieve effecten op de regenwormen en andere gevoelige soorten in de bodem.
- Verzuring leidt tot een afname van nematoden in de sterk en matig gecontamineerde plots, waarschijnlijk door de verminderde vegetatie op deze plots. Naast een afname is ook een verschuiving in de soortensamenstelling vastgesteld als gevolg van de combinatie verzuring en contaminatie.
- De bacteriële groeisnelheid is positief gecorreleerd met de contaminatie. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de eveneens positieve correlatie met organische stofgehalten. Verzuring reduceert de groeisnelheid het meest in de sterk gecontamineerde bodems, wat wijst op een toxisch effect van de gemobiliseerde metalen.
- De bio-assay met springstaarten laat evenals in de eerder uitgevoerde studie geen toxische effecten zien. Er is ook geen effect van verzuring waarneembaar.
- De microtox test echter geeft nu in tegenstelling tot eerder onderzoek een licht toxisch effect voor alle plots. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de reeds opgetreden pH daling en hogere metaalconcentraties in de nu gebruikte zoutoplossing voor extractie ten opzichte van het eerder gebruikte bodemvocht.

Dit alles samen laat zien dat de toxische druk toeneemt bij verzuring van de bodem. Uit de hier uitgevoerde experimenten kan niet vastgesteld worden welke metalen hiervoor verantwoordelijk zijn. Bepaling van interne concentraties metalen in wormen kan hierin inzicht geven.

Aanbevelingen

Op basis van de resultaten van het onderzoek worden de volgende aanbevelingen gedaan:

- bij toekomstige monitoring het pakket aan ecotesten te beperken tot regenwormen-test, bacteriën en nematoden

- in samenspraak met uitvoerende laboratoria bekijken of de (snelle) microtox test kan worden gemodificeerd zodat deze ook geschikt is om onder zure omstandigheden te gebruiken
- de beoogde tweede fase onderzoek uit te voeren met de volgende zwaartepunten: (1) het vaststellen van kwaliteitseisen aan de bodem (chemisch en ecotoxicologisch) in relatie tot het bodemgebruik (inclusief uitspoeling naar grond- en oppervlaktewater). Voor het vaststellen van deze kwaliteitseisen kan een werkwijze worden gevolgd zoals die wordt toegepast binnen de zogenaamde TRIADE-aanpak. (Rutgers et al., 2004); (2) het onderzoeken van snelheid waarmee de verzuring en de daarmee samenhangende verhoging van de biobeschikbaarheid zal optreden en daaraan gerelateerd (3) de effectiviteit en toepasbaarheid van geschikte additieven nader vast te stellen. .

Literatuur

De Vries, W., P.F.A.M. Römken, R.P.J.J. Rietra, L. Bonten, W.C. Ma, J. Faber, J. Harmsen & J. Bloem, 2007. Afleiding van bodemgebruikswaarden voor landbouw en natuur: De Alterra bijdrage. Wageningen. Alterra rapport (in prep).

Edwards, C.A., 2004. Earthworm ecology. CRC Press, Boca Raton (FL), USA.

Groenenberg, J.E., J. Bril, W.C. Ma, J. Harmsen en A. v.d. Toorn, 1999a. Risicoanalyse van met chroom, arseen en zware metalen verontreinigde vloeivelden 'Zanleij' Tilburg; Literatuur- en verkennend onderzoek. DLO-Staring Centrum Rapport 512.1

Groenenberg, J.E., J. Bril, W.C. Ma, J. Harmsen en A. v.d. Toorn, 1999b. Risicoanalyse van met chroom, arseen en zware metalen verontreinigde vloeivelden 'Zanleij' Tilburg; Ecotoxicologisch en bodemchemisch onderzoek. DLO-Staring Centrum Rapport 512.2

Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., Van Gestel, C.A.M., 2004. Risk assessment of heavy metal pollution for detritivores in floodplain soils in the Biesbosch, The Netherlands, taking bioavailability into account. *Environmental Pollution* 129, 409-419.

Muijs, B., J.E. Groenenberg, W. Hendriks, R. Aben, en A. Verheggen, 2002. Noorderbos Tilburg Bosaanleg op verontreinigde grond. Eindrapportage SV-005. SKB, Gouda.

Rutgers, M., M. Mesman, P. Otte, 2004. Triade: instrumentarium voor geïntegreerde ecotoxicologische beoordeling van bodemverontreinigingen. RIVM Bilthoven, 46p.

Witteveen+Bos, 1999. Saneringsplan Vloeivelden/Noorderbos te Tilburg (NB/545/071). Witteveen+Bos raadgevende ingenieurs, projectcode Tb78.1, definitief02, Deventer.

Witteveen+Bos en Alterra, 2004. Projectplan vervolgonderzoek Noorderbos Tilburg. Witteveen+Bos raadgevende ingenieurs, projectcode Tb78-11, definitief 01, Deventer.

Bijlage 1 Chemische bepalingen veldplots Noorderbos

Tabel 1 Concentraties in grondwater en streefwaarde voor ondiep grondwater en interventiewaarde grondwater. (concentraties boven de streefwaarde zijn onderstreept en concentraties boven de interventiewaarde vetgedrukt)

Monster nr.	pH	EC [µS/cm]	As [µg/l]	Cd [µg/l]	Cr [µg/l]	Cu [µg/l]	Fe [mg/l]	Ni [µg/l]	Pb [µg/l]	Zn [µg/l]
P-1	6.25	792	5.3	<0.19	<u>12.3</u>	10	0.08	2.8	<10	<5
P-2	6.27	394	<5.1	<0.19	<u>4.5</u>	10	0.05	<u>37.3</u>	<10	20
P-3	6.47	188	7.4	<0.19	<u>20.6</u>	<u>30</u>	0.09	96.9	<10	30
Streef-waarde	-	-	10	0,4	1	15	-	15	15	65
Interventie-waarde	-	-	60	6	30	75	-	75	75	800

Tabel 2 gehalten 0.01M CaCl₂ extract

monster nr.	pH	As (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Cr (µg/kg)	Cu (µg/kg)	Ni (µg/kg)	Pb (µg/kg)	Zn (mg/kg)
PI - 1a	4.50	134	158	661	255	7167	8	40.41
PI - 1az	3.75	212	316	1290	349	10142	60	42.77
Pi - 2a	4.45	88	87	372	87	4641	6	19.78
PI - 2az	3.63	192	131	692	114	4589	64	12.73
Pi - 3a	4.59	45	44	188	74	1936	8	11.02
PI - 3az	3.93	78	67	442	69	2849	28	12.63
PI - 1a	4.51	134	166	707	272	7494	10	41.02
PI - 1az	3.73	206	315	1241	345	9967	63	40.85
Pi - 2a	4.46	85	87	370	91	4680	8	19.33
PI - 2az	3.63	192	131	696	110	4558	68	12.43
Pi - 3a	4.58	43	44	182	52	1938	6	10.97
PI - 3az	3.94	73	69	458	93	2879	30	12.37

Tabel 3 gehalten 0.43 M HNO₃ extract

monster nr.	As (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Cr (µg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (µg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Al (mg/kg)
PI - 1a	12111	1580	474586	48	75017	106	251	2009
PI - 1az	13319	1376	583872	50	49404	132	123	1830
Pi - 2a	5690	597	207439	14	41922	32	84	1865
PI - 2az	4641	376	180069	11	16289	29	25	1544
Pi - 3a	2920	250	100983	6	14302	22	43	961
PI - 3az	2577	232	133010	7	12553	27	29	807
PI - 1a	12348	1529	450114	50	80377	114	263	1993
PI - 1az	13309	1357	617802	55	55228	151	136	1900
Pi - 2a	5840	587	221413	14	45257	37	92	1823
PI - 2az	4862	361	182710	13	18355	33	28	1617
Pi - 3a	2943	236	103025	6	15519	24	46	999
PI - 3az	2745	226	151665	8	13792	31	32	832

Tabel 4 Concentraties elementen in 0.002 M CaCl₂ extract: 'namaak bodemvocht'

monster	pH	N-NO ₃ ⁺										
		N-NO ₂ (mg/l)	N-NH ₄ (mg/l)	Nts (mg/l)	P (mg/l)	TOC (mg/l)	Fe (mg/l)	K (mg/l)	Mg (mg/l)	Mn (mg/l)	Na (mg/l)	S (mg/l)
PI - 1a	4.83	8.49	2.20	17.06	3.14	47.85	0.27	6.42	9.18	0.99	1.36	6.17
PI - 1az	4.00	3.94	5.06	13.89	4.90	46.15	0.23	5.61	3.48	2.41	0.83	15.97
Pi - 2a	4.75	4.32	1.71	11.70	2.55	38.24	0.24	7.50	7.31	0.95	1.06	2.56
PI - 2az	3.88	1.22	5.12	10.03	4.05	32.38	0.17	3.81	1.77	2.30	0.66	5.19
Pi - 3a	4.87	3.33	1.78	8.55	2.19	23.07	0.29	6.19	6.27	0.54	0.86	1.42
PI - 3az	4.18	6.39	3.02	14.15	3.68	32.79	0.28	10.38	4.33	1.09	0.68	3.72
PI - 1a	4.85	8.54	2.31	17.19	3.06	51.49	0.36	6.57	9.20	0.98	1.47	6.35
PI - 1az	4.01	4.11	5.09	14.11	4.84	48.49	0.24	5.61	3.45	2.39	0.89	16.15
Pi - 2a	4.76	4.16	1.66	11.66	2.53	40.64	0.31	7.46	7.22	0.95	1.04	2.55
PI - 2az	3.87	1.32	5.17	10.83	4.06	33.14	0.18	3.86	1.79	2.33	0.67	5.85
Pi - 3a	4.87	3.36	1.83	9.64	2.21	24.92	0.36	6.35	6.35	0.54	0.86	1.42
PI - 3az	4.20	6.26	3.00	13.65	3.65	58.73	0.30	10.34	4.38	1.09	0.79	3.72

Tabel 5 Concentraties metalen in 0.002 M CaCl₂ extract: 'namaak bodemvocht'

monster	Ca (mg/l)	Zn (mg/l)	As (µg/l)	Cd (µg/l)	Cr (µg/l)	Cu (µg/l)	Ni (µg/l)	Pb (µg/l)
PI - 1a	81	3	52	8	232	85	646	4
PI - 1az	85	5	74	21	329	73	958	9
Pi - 2a	71	2	35	4	148	38	418	3
PI - 2az	69	2	64	10	162	28	493	8
Pi - 3a	70	1	18	2	72	19	173	2
PI - 3az	73	2	28	5	132	22	303	6
PI - 1a	79	3	51	8	246	90	629	5
PI - 1az	83	5	72	20	325	73	956	9
Pi - 2a	71	2	34	4	156	33	404	3
PI - 2az	70	2	64	11	168	27	499	9
Pi - 3a	70	1	18	2	79	18	180	3
PI - 3az	75	2	28	5	135	28	297	6

Bijlage 2 Chemische bepalingen labexperimenten ijzeradditie

Tabel1 Gehalten metalen geëxtraheerd met 0.43 M HNO₃, EDTA en 0.01 M CaCl₂ (mg.kg⁻¹)

	Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	P	Pb	Zn
HNO ₃	2451	20.3	3.2	636	122	3434	105	2575	273	509
EDTA	285	0.47	1.7	4.69	66.5	575	50.5	113	81	415
CaCl ₂	3.6	0.15	0.28	1.18	0.52	1.73	7.9	20.0	0.06	74

Tabel2 Gehalten oxalaat extrabeerbaar Al, Fe en P aan de start en na 10 dagen (mmol.kg⁻¹)

monster	dosering	Al	Fe	P
Start		93.6	96.9	110.0
1	0	94.4	95.9	109.4
2	Fe(0) laag	96.1	23.5	107.9
3	Fe(0) hoog	95.2	355.8	104.8
4	Fe(II) laag	87.4	250	95
5	Fe(II) hoog	76.1	242	81
6	Fe(0) laag	90.9	237.5	102.0
7	Fe(0) hoog	92.7	353.7	101.9

Tabel3 concentraties in oplossing na 3 dagen

Monster	Al [mg/l]	Fe [mg/l]	Cu [mg/l]	Pb [mg/l]	Zn [mg/l]	P [mg/l]	ortho-P [mg/l]	As [µg/l]	Cd [µg/l]	Cr [µg/l]	Ni [µg/l]	EC [µS]	pH -	DOC [mg/l]
1	0,82	6,17	0,25	0,02	11,54	6,10	4,29	39,23	30,22	433,37	1331,1	1040	4,77	67
2	<0,06	1,54	0,03	0,01	2,27	0,20	0,09	<16	6,68	18,36	335,45	462	5,76	20
3	<0,06	0,70	0,05	<0,01	0,39	0,22	0,05	<16	<1	27,65	114,5	153	6,35	38
4	<0,06	0,81	0,25	<0,01	0,855	0,62		<16	59,52	23,13	533,0	40700	7,21	323
5	0,13	0,07	1,369	<0,01	0,041	1,44		<16	<1	93,83	545,0	34900	7,91	9
6	0,27	3,60	0,04	<0,01	2,41	<0,06	0,01	<16	7,74	20,06	379,2	471	5,75	24
7	0,05	0,92	0,04	<0,01	0,40	0,09	0,03	<16	<1	20,20	105,1	166	6,38	29

Tabel4 concentraties in oplossing na 10 dagen

Monster	Al [mg/l]	Fe [mg/l]	Cu [mg/l]	Pb [mg/l]	Zn [mg/l]	P [mg/l]	ortho-P [mg/l]	As [µg/l]	Cd [µg/l]	Cr [µg/l]	Ni [µg/l]	EC [µS]	pH -	DOC [mg/l]
1	0,46	0,07	0,19	<0,01	8,90	6,17	4,99	31,15	15,83	369,0	1082,6	867	4,89	59
2	0,06	-0,01	0,02	<0,01	4,11	<0,06	0,04	<16	6,61	27,22	601,9	703	5,72	17
3	<0,06	0,01	0,02	<0,01	1,90	<0,06	0,73	<16	2,21	16,34	341,8	446	5,92	27
4	<0,06	0,04	0,20	<0,01	0,17	0,78		<16	36,00	38,06	244,8	27700	7,40	307
5	<0,06	0,10	0,61	<0,01	0,04	1,82		<16	<1	53,25	278,7	30000	7,65	0
6	0,14	0,46	0,03	<0,01	4,29	<0,06	0,01	<16	8,32	28,26	580,4	716	5,39	18
7	0,16	2,13	0,02	0,01	2,55	<0,06	-	<16	5,77	11,50	436,8	586	5,31	16

Tabel5 concentraties in oplossing na 20 dagen

Monster	Al [mg/l]	Fe [mg/l]	Cu [mg/l]	Pb [mg/l]	Zn [mg/l]	P [mg/l]	ortho-P [mg/l]	As [µg/l]	Cd [µg/l]	Cr [µg/l]	Ni [µg/l]	EC [µS]	pH -	DOC [mg/l]
1	0,66	0,17	0,24	<0,01	12,46	5,89	5,06	52,81	23,78	513,0	1597,4	1230	4,90	70
2	0,13	0,03	0,04	<0,01	6,70	0,07	0,05	<16	12,58	38,37	1037,4	1060	5,73	17
3	0,07	0,04	0,02	<0,01	4,37	<0,06	0,01	<16	8,65	11,77	862,6	970	5,85	13
4	<0,06	0,04	0,157	<0,01	0,172	0,60		<16	30,47	37,41	216,6	24400	7,50	
5	<0,06	0,81	0,298	<0,01	0,045	1,85		<16	1,98	55,33	295,3	29800	7,47	
6	0,14	0,06	0,04	<0,01	6,17	<0,06	0,04	<16	11,91	36,09	971,2	1010	6,34	17
7	0,07	0,17	0,02	<0,01	4,24	<0,06	0,00	<16	8,87	12,57	840,0	939	6,23	12

Tabel 6 concentraties in oplossing na 30 dagen

Monster	Al [mg/l]	Fe [mg/l]	Cu [mg/l]	Pb [mg/l]	Zn [mg/l]	P [mg/l]	ortho-P [mg/l]	As [µg/l]	Cd [µg/l]	Cr [µg/l]	Ni [µg/l]	EC [µS]	pH -	DOC [mg/l]
1	0,61	0,13	0,243	<0.01	14,104	5,59	5,19	66,0	22,69	505,8	1733,9	1330	4,96	-
2	0,12	0,03	0,059	<0.01	7,494	0,06	0,08	<16	10,63	35,38	1105,3	1140	5,68	-
3	0,06	0,02	0,023	<0.01	4,750	<0.06	0,02	<16	6,58	15,11	889,5	1040	6,06	-
4														-
5														-
6	0,10	0,02	0,045	<0.01	6,921	<0.06	0,04	<16	9,50	32,63	1025,0	1040	6,55	-
7	<0,06	0,02	0,027	<0.01	4,526	<0.06	0,02	<16	6,11	14,90	844,0	981	6,31	-