

ECOTOXICOLOGISCH ONDERZOEK IN MET ENDOSULFAN VERONTREINIGDE GROND:
TOXICITEIT EN SANERING

P. Doelman, H. Loonen & A. Vos

RIN-rapport 88/39

266517

Rijksinstituut voor Natuurbeheer

Arnhem

1988

BIBLIOTHEEK
RIJKSINSTITUUT VOOR NATUURBEHEER
POSTBUS 9201
6800 HB ARNHEM-NEDERLAND

RIJKSINSTITUUT VOOR NATUURBEHEER
VERBOD VAN TEXEL
Postbus 59, 1790 AB Den Burg
Texel, Holland

R.I.N.-RAPPORT

Onderzoek uitgevoerd in opdracht van de dienst Milieuhygiëne van de
Provincie Gelderland



T.

INHOUD

SAMENVATTING	4
CONCLUSIES	6
1 INLEIDING	8
2 MATERIAAL EN METHODEN	10
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	15
4 REFERENTIES	34

SAMENVATTING

Van de slootbodems van champignonkwekerijen in de Bommelerwaard werden grondmonsters verzameld, met als doel te onderzoeken of microbiologische sanering van deze met Endosulfan verontreinigde grond mogelijk is. De hoeveelheid bestrijdingsmiddelen, voornamelijk Endosulfan (22,5 mg/kg grond) en pentachloorfenol, in de grond was hoger dan in het algemeen acceptabel is.

De verzamelde grond (pH-H₂O: 7,1; organische stofgehalte: 79%; 50 mg extraheerbare organochloorverbindingen/kg) werd gehomogeniseerd opdat elke te onderzoeken portie grond dezelfde hoeveelheid verontreiniging bevatte. Daarna werd enerzijds bij 25°C in zowel stilstaande grond als in continu bewegende slurrie en anderzijds bij 15°C in stilstaande onderwaterbodem en in stilstaande grond onder zowel zuurstofloze als -rijke omstandigheden onderzocht 1) in hoeverre Endosulfan afbreekbaar was, 2) de grond minder toxisch werd voor wormen (*Eisenia foetida*; EEG-toetsworm) en micro-organismen en 3) het grondvocht minder toxisch werd voor guppen en watervlooien.

De afbraak van Endosulfan was het snelst bij 25°C in zuurstofrijke, continu bewegende grond. In drie weken is dan de helft verdwenen. Ook onder zuurstofloze omstandigheden in bewegende grond wordt Endosulfan afgebroken, maar iets langzamer. In zowel stilstaande onderwater bodem (zuurstofarm) als in normaal vochtige grond, bij 25°C en 15°C, werd Endosulfan in zes tot acht weken tot de helft afgebroken. Bij 15°C is de afbraak dus iets langzamer dan bij 25°C.

In het algemeen wordt Endosulfan afgebroken, maar bij het toetsen van deze grond en het grondvocht op toxiciteit blijkt deze nog te bestaan door de aanwezigheid van metaboliëten. Gedurende de experimentperiode van twaalf weken werd een fluctuerende toxiciteit gemeten voor de wormenpopulaties en de guppen. Ook na twaalf weken was er nog steeds sterk gewichtsverlies van de wormen en ook sterfte, terwijl in vergelijkbare schone grond de wormen in gewicht toenamen en niet stierven. Ook trad er zo nu en dan nog sterfte op van guppen in het grondvocht.

Dat Endosulfan verdwijnt en de toxiciteit blijft, is goed verklaarbaar. In het onderzoek werd namelijk ook bestudeerd welke stoffen bij de afbraak van Endosulfan ontstonden en in welke hoeveelheid. Terwijl alfa- en beta-Endosulfan (AE en BE) verdwenen, verschenen Endosulfansulfaat

(ES) en Endosulfanlacton (EL). Er is wel sprake van een eerste afbraakstap maar niet van totale afbraak. De ontstane tussenprodukten blijken ook nog toxisch te zijn. Zodra er door ontzwaveling geen Endosulfan en ook geen Endosulfansulfaat meer aanwezig is, zal de resterende verbinding minder toxisch zijn. Zodra de verbinding totaal is ontdaan van chloride (gedechloreerd), zal de toxiciteit ook totaal verdwenen zijn en zal er ook geen ophoping meer zijn in het vetweefsel van organismen. Dat Endosulfan totaal gedechloreerd werd, is tot nu toe nog nooit in de literatuur beschreven.

Hoewel de massabalans van de vijf meetbare metabolieten (alfa-, beta-Endosulfan, Endosulfansulfaat, Endosulfanlacton en Endosulfanether) daalde met 20-60%, bleef er toxiciteit. Verwacht mag worden dat de massabalans van de chloorverbindingen niet gedaald is en er dus een soort verbinding overblijft die gelijkenis vertoont met dieldrin en aldrin. Ook deze verbindingen kunnen milieu-onvriendelijk genoemd worden.

Geconcludeerd kan worden dat microbiologische afbraak voor een deel van het Endosulfan-molecuul mogelijk is, ook bij een temperatuur (15°C) die een aantal maanden van het jaar in Nederland gangbaar is, maar de toxiciteit van de grond- en de grondvocht-fase blijft voor respectievelijk wormen en vissen. Het zeer waarschijnlijk aanwezig blijven van een gechloreerde 'drin'-structuur maakt vooralsnog bodemmicrobiologische sanering niet aantrekkelijk.

CONCLUSIES

De met Endosulfan verontreinigde onderwaterbodem is weinig door zijn hoge gehalte aan organisch materiaal en zeer moeilijk te homogeniseren. Daardoor vertonen de resultaten soms een aanzienlijke spreiding. Van de extraheerbare hoeveelheid organische chloorverbindingen is ongeveer de helft in de onderzochte grond Endosulfan.

Onder aërobe omstandigheden treedt gedurende een meetperiode van twaalf weken in grond duidelijk microbiologische afbraak (biotransformatie) van Endosulfan op met Endosulfansulfaat als een belangrijke metaboliet (afbraakprodukt). De meetbare metabolieten alfa-Endosulfan (AE) plus beta-Endosulfan (BE) plus Endosulfanlacton (EL) plus Endosulfansulfaat (ES) plus Endosulfanether (EE) zijn samengevoegd in een balans. Onder aërobe omstandigheden daalde de balans van 100 naar 64% bij 25°C en naar 80% bij 15°C. De halfwaardetijd van AE is ongeveer zeven weken. De grond blijft voor wormen echter toxisch zowel bij 15 als 25°C; de controle in de schone venige grond leverde geen sterfte op. Bij lage temperatuur (15°C) is de toxiciteit van Endosulfan voor de bodem-microflora duidelijk hoger dan bij 25°C waar geen sprake van toxiciteit is.

Onder anaërobe omstandigheden treedt duidelijk biotransformatie van Endosulfan op, met als principieel onderscheid van de aërobe omstandigheden dat geen Endosulfan-sulfaat wordt gevormd. Onder anaërobe omstandigheden wordt vooral Endosulfan-lacton gevormd. Bij 25°C daalt de metabolietenbalans in twaalf weken van 100 naar 40% en bij 15°C tot 72%. De balans daalt dus sterker dan onder aërobe omstandigheden. De halfwaardetijd van AE is ongeveer acht weken en is iets groter dan onder aërobe milieuomstandigheden. Voor wormen blijft, ondanks daling van de metabolietenbalans, de grond toxisch zowel bij 25 als 15°C. De bodem-microflora ondervindt alleen bij 15°C remming. Het bovenstaande water van de stilstaande onderwaterbodem bevat na zes weken 10 ppb Endosulfan en is toxisch voor guppen.

In continu bewegende grondsuspensie (slurrie) vindt onder aërobe omstandigheden snelle biotransformatie van Endosulfan plaats. De gemeten halfwaardetijd is drie weken. Vooral ES wordt gevormd terwijl de metabolietenbalans daalt. De waterfase van deze slurrie is toxisch voor guppen. De toxiciteit is echter niet van een constant niveau. Voor

watervlooiën is de waterfase niet toxisch. De grondfase van de slurry blijft toxisch voor wormen en wordt toxisch voor de bodemmicroflora. In aërobe slurry is de afbraak van Endosulfan duidelijk sneller dan in aërobe stilstaande grond.

In anaërobe slurry daalt de Endosulfanconcentratie tot de helft in ongeveer acht weken. In een anaëroob slurriesysteem wordt Endosulfan dus minder snel afgebroken dan in aërobe slurry. De totale metabolietenbalans daalt, maar minder dan onder aërobe omstandigheden. Zowel de grond- als de waterfase van de slurry blijven toxisch bij zowel 15 als 25°C voor de wormen respectievelijk de guppen en watervlooiën. De bodemmicroflora wordt alleen geremd bij 15°C.

In het algemeen is er onder alle bestudeerde omstandigheden afbraak van Endosulfan; dit vindt het snelst plaats in aërobe slurry. De afbraak kan in beperkte mate ook chemisch zijn. Toevoeging van extra zouten of voedingsstoffen versnelt de afbraak niet. In alle omstandigheden blijven zowel de grond- als de waterfase toxisch voor respectievelijk wormen en guppen.

1 INLEIDING

Door het intensief gebruik van bestrijdingsmiddelen in de champignonteelt was de kwaliteit van het bodemslib (de onderwaterbodems) in de Bommelerwaard zo slecht dat de dienst Milieuhygiëne van de Provincie Gelderland aan de afdeling Milieuverontreiniging van het Rijksinstituut voor Natuurbeheer de opdracht gaf voor een onderzoek naar de microbiologische saneringsmogelijkheden. Dit onderzoek zou zich moeten richten op het zelfreinigend vermogen van deze met Endosulfan verontreinigde grond. Door optimale milieuomstandigheden, b.v. temperatuur en zuurstofvoorziening, zou de van nature aanwezige microflora in het bodemslib tot deze afbraak gestimuleerd moeten worden.

Naar aanleiding van een massale vissterfte in de Rijn ten gevolge van een Endosulfanlozing in juni 1969 onderzocht Martens (1976, 1977) of Endosulfan kon worden afgebroken door een aantal reïncultures van micro-organismen. Ook bestudeerde hij het afbraakvermogen van zeven grondsoorten voor Endosulfan. Zowel reïncultures als bodems, waarin de gehele bodemmicroflora aanwezig is onder zowel aerobe als anaerobe condities, kunnen Endosulfan metaboliseren.

Miles en Moy (1979) bestudeerden ook de afbraak van zowel AE als BE en hun werk toont aan dat naast microbiële afbraak ook fysisch/chemische afbraak kan optreden. In het algemeen lopen de halfwaardetijden ($t_{1/2}$ = de tijd die het duurt dat de helft van de stof niet meer meetbaar is) in de literatuur uiteen van 10-175 dagen voor AE en van 400-800 dagen voor BE (Doelman et al. 1987). Dit wil niet zeggen dat in een periode van twee maal $t_{1/2}$ de stof totaal verdwenen is. Bij halfwaardetijden wordt alleen op het uitgangsmateriaal gelet en niet op de gevormde metabolieten, die persistenter kunnen zijn. De $t_{1/2}$ zegt iets over de eerste afbraakstap maar niets over de totale mineralisatie van de stof.

Door anderen (Commissie voor Toelating van Bestrijdingsmiddelen, CTB) werden de beweeglijkheid van Endosulfan en de afbraakmetabolieten bestudeerd. Uitspoeling uit een podzolgrond (pH 5,5; organisch-stofgehalte 6%) door middel van waterpercolatie vond niet plaats gedurende een meetperiode van twee jaar. De mobiliteit wordt dan ook zeer laag geacht. Over de mobiliteit van metabolieten is weinig bekend.

Er is ook betrekkelijk weinig bekend over de toxiciteit van Endosulfan-metabolieten. Endosulfan zelf is zeer giftig voor insecten en

bodemarthropoden waarvoor het dan ook als bestrijdingsmiddel wordt gebruikt. Ook is het zeer giftig voor vissen: 1-10 microgram per liter water kan sterfte veroorzaken, terwijl watervlooien sterven bij concentraties van 10-100 microgram per liter en hoger. Endosulfan is matig giftig voor vogels en bodemmicro-organismen. Van de bekende metabolieten BE, ES, EE, EL en endosulfandiol (ED) is weinig vergelijkend toxiciteitsonderzoek bekend. Technisch- en alfa-Endosulfan hebben ongeveer dezelfde toxiciteit voor de huisvlieg, BE en ES zijn ongeveer 1,5 keer minder toxisch, en ED en EE zijn 100 keer minder toxisch (Barnes & Ware 1965).

Het onderzoek kent de volgende vraagstellingen:

- is in dit zeer venige bodemslib Endosulfan microbiologisch afbreekbaar en zo ja, in welke mate?
- onder welke milieuomstandigheden geschiedt die afbraak het best (variaties in temperatuur, zuurstofvoorziening, massa-overdracht en bemesting)?
- in hoeverre verdwijnt de toxiciteit uit het bodemslib bij deze omstandigheden?

Het actuele toxiciteitsaspect is dus direct gekoppeld aan het afbraakvermogen van de grond. Voor de waterige boven de grond staande fase en voor het drainagewater werden de meest gevoelige organismen, vissen, als biomonitor gebruikt. Ter controle werd ook de iets minder gevoelige watervlo als toetsdier gebruikt. Voor de vaste-bodemfase werd de worm *Eisenia foetida* gebruikt als belangrijke representant van de bodemfauna. De toxiciteit op de bodemmicroflora werd getoetst via het glutaminezuur afbrekend vermogen van de bodemmicroflora, zoals deze in totaal aanwezig is in de onderzochte grond. Voor zware metalen en hexachloorcyclohexaan is de afbraak van glutaminezuur een goede toets gebleken en daarom ook hier toegepast (Haanstra & Doelman 1984; Doelman et al. in prep.)

De doelstelling van het onderzoek is om aan de hand van de verkregen gegevens een uitspraak te doen over de mogelijke toepassing van microbiologische bodemsanering van de met Endosulfan verontreinigde grond.

2 MATERIAAL EN METHODEN

De bestudeerde waterbodem kan het best gekarakteriseerd worden als een zandig-lemige veengrond verontreinigd met organochloorverbindingen, waarvan Endosulfan kwantitatief de belangrijkste is. De fysisch/chemische eigenschappen zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Fysisch/chemische eigenschappen van de onderzochte grond.

pH-H ₂ O		7.1
pH-KCl		7.0
Droge stof	%	46.1
Gloeirest	%	79
CaCO ₃	% van ds	8.0
Fracties <2µm	% van ds	9.4
Fracties <16µm	% van ds	14.8
Stikstof (N)	% van ds	2.8
Fosfaat als P ₂ O ₅	% van ds	3.6
Kalium (K)	mg/kg ds	2200
Calcium (Ca)	g/kg ds	40
Alfa-Endosulfan	mg/kg ds	10.5
Beta-Endosulfan	mg/kg ds	12
Extraheerbaar organochloor (EOCl)*	mg/kg ds	50

*(zie Grontmij z.j.)

De verzamelde met water verzadigde grond werd eerst bij een temperatuur van 5-10°C langzaam ingedroogd tot een vochtgehalte van ongeveer 50%. Daarna werd de grond gezeefd (Ø 4 mm) en via 'quartering and coning' gehomogeniseerd.

Ter bepaling van afbraak en toxiciteit werden de volgende factoren bestudeerd: aërobie/anaërobie, grond/slurrie (grondsuspensie), wel/geen voedsel (zouten, C, N en norborneenanhydride), stilstaand/mengend systeem en 15/25°C. De factor steriliteit (afdoding van de bodemmicroflora t.g.v. 2½ MRad gamma bestraling) is gemeten om na te gaan of naast biochemische omzettingen ook chemische omzettingen van belang waren. De hoeveelheden onderzochte grond zijn vaak afhankelijk van de te gebruiken apparatuur.

Verschillende behandelingen van de grond en opstelling van de proeven

- Aërobe grond : 20 g vochtige grond, 3x per week beluchten, 50 ml containers bij 25°C;
: 750 g vochtige grond, 3x per week beluchten, 1500 ml containers bij 15°C en 25°C.
- Anaërobe grond : 20 g vochtige grond onder stikstofatmosfeer ingezet, 25°C;
: 750 g vochtige grond onder stikstofatmosfeer ingezet bij 15°C en 25°C.
- Aërobe slurrie : 30 g grond + 570 ml demi-water in continu roterend systeem, 3x per week beluchten, 1500 ml containers bij 25°C
: 3 kg grond + 27 l demi-water in continu roterend systeem (betonmolen, 25 rpm), bij 25-30°C.
- Anaërobe slurrie: 20 g grond + 20 ml water in continu roterend systeem, onder stikstofatmosfeer ingezet, 50 ml containers bij 25°C;
: 750 g grond + 750 ml demi-water in continu roterend systeem, onder stikstofatmosfeer ingezet bij 15°C en 25°C;

Stilstaande

onderwaterbodem : 750 g grond + 750 ml demi-water, bij 15°C.

Elk grondexperiment is in twaalfvoud ingezet. Bij elke monsternamen zijn steeds twee eenheden bestudeerd. Voor de afbraak en toxiciteitsbepaling in slurrie zijn submonsters van de totale hoeveelheid slurrie genomen en via filtratie gescheiden in een vochtige en vaste fase.

Voedingsstoffen

Ter stimulering van de microbiologische afbraakactiviteit zijn de hiervoor beschreven experimenten ook uitgevoerd na toevoeging van extra voedingsstoffen in de volgende hoeveelheden aan aërobe en anaërobe grond en aan anaërobe slurrie:

- 1000 mg glucose (=400 ppm C) per kg grond,
- 85,8 mg ureum (=40 ppm N) per kg grond,
- 115,6 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (=10 ppm P) per kg grond.

Aan de aërobe slurrie is 1,5 l voedseloplossing volgens Winogradsky

toegevoegd. Deze bevat 5 g K_2HPO_4 , 2,5 g $MgSO_4$, 2,5 g NaCl, 0,05 g $Fe_2(SO_4)_3$, 0,05 g $MnSO_4$ per 1000 ml demi-water.

Norborneenanhydride

Getracht is de Endosulfanafbraak te stimuleren door toevoeging van een op Endosulfan gelijkende verbinding: norborneenanhydride. De gedachte hierbij is dat als micro-organismen enzymen aanmaken voor de afbraak van norborneenanhydride, deze enzymen ook de Endosulfanafbraak zouden kunnen bevorderen. Norborneenanhydride heeft dezelfde basisstructuur als Endosulfan. Het bestaat uit een koolstofring met dubbele binding en een koolstofbrug, de chlooratomen en de sulfaatgroep ontbreken echter. Norborneenanhydride (2000 ppm) is toegevoegd aan aërobe grond (750 g) en aërobe slurrie (30 g + 570 ml demi-water bij 25°C).

Steriele grond

Anaërobe grond en slurrie zijn gesteriliseerd om na te gaan of de afbraak ook op fysisch-chemische wijze plaatsvindt bij 25°C. Porties van 20 g grond, en van 20 g grond met 20 ml water (slurrie) zijn behandeld met 2,5 mRad gammastraling. Direct na steriliseren en na acht weken zijn identiek behandelde monsters gecontroleerd op steriliteit (tellen van micro-organismen) en tevens onderzocht op het Endosulfangehalte.

Endosulfanbepaling

De concentratie AE, BE, ES, EE en EL is als volgt bepaald:

Grond

* Extractie

10 g grond (bekend vochtgehalte) wordt afgewogen in een erlenmeyer. Hieraan wordt 5 ml NH_4Cl -oplossing (250 g/l) en 20 ml hexaanaceton-oplossing (verhouding 1:1) toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende vier uur geschud op een schudmachine. Na bezinken wordt de bovenstaande vloeistof (hexaan-aceton) afgepipetteerd en bij 4°C bewaard tot verdere verwerking.

* Meting

Analyse van de extracten gebeurt op de gaschromatograaf met gepakte kolom met een lengte van 3 m en een diameter van 4 mm. De kolom is gevuld met 2% OV - 17/5% QF - 1 op gaschrom Q. Oventemperatuur 225°C. De injector-

voor de stikstof is 45 ml/min. en de make up eveneens voor stikstof is 15 ml/min. De monsters dienen vooraf 400x verdund te worden (met hexaan) om het Endosulfangehalte binnen het meetbereik van de gaschromatograaf te houden.

Water

* Extractie

10 ml met Endosulfan verontreinigd water wordt in een afsluitbaar flesje afgemeten. Hieraan wordt 5 ml NH_4Cl (250 g/l) en 5 ml hexaan toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende 2 minuten krachtig geschud. Na bezinken wordt de bovenstaande vloeistof (hexaan) afgepipetteerd. Deze handeling wordt herhaald met nog eens 5 ml hexaan. Beide extracten worden in één flesje tot verdere verwerking bij 4°C bewaard.

* Meting idem als "Grond"

De monsters dienen vooraf, afhankelijk van de hoeveelheid aanwezige Endosulfan, tien maal of niet verdund te worden met hexaan.

Toxiciteitstoetsen

Wormen

De toxiciteit voor wormen is bepaald aan *Eisenia foetida* (toetsworm volgens EEG-norm). Daar het sterftepercentage bij *Eisenia* veroorzaakt door Endosulfan zeer hoog was en bij *Lumbricus rubellus* nul, werd voor *Eisenia* gekozen als toetsorganisme. Acht volwassen exemplaren van gelijke grootte zijn gewogen en in 300 g grond gebracht (glazen pot, 1,5 l). De monsters (in duplo) zijn gedurende 14 dagen in het donker bij 15°C geïncubeerd. Daarna is het aantal overlevende wormen en hun gewicht bepaald (sterftepercentage en het gemiddelde gewichtsverlies per overlevende worm). Als controle zijn acht wormen in schone venige grond gebracht en gedurende 14 dagen in het donker bij 15°C geïncubeerd.

Algemeen microbiologische activiteit

Grondmonsters van 50 g werden goed gemengd met glutaminezuur (1500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en in een 'infrared gas analyser' (IRGA) werd de CO_2 -produktiesnelheid gemeten. Het tijdstip van de maximale bodemademhaling (CO_2 -produktie) is een maat voor de grootte van de microbiële remmings-

factor in de grond (Doelman et al. 1987). Hoe langer het duurt alvorens het tijdstip van de maximale bodemademhalingspiek wordt gemeten, des te groter is de toxiciteit van de grond.

Guppen

De acute toxiciteit van het Endosulfanwater is bepaald aan *Poecilia reticulatus* (gup). Vier guppen van ca. vier weken oud zijn gedurende 96 uur in 400 ml monster geïncubeerd bij 25⁰C met continue beluchting en 8 uur licht per dag. De guppen zijn tijdens de toets niet gevoerd. De toets is uitgevoerd met onverdunde monsters en met 4x met standaardwater verdunde monsters. Elke 24 uur is het sterftepercentage bepaald.

Watervlooien

De toxiciteit van het Endosulfanwater is eveneens bepaald aan *Daphnia magna* (watervlo). Vijf watervlooien (jonger dan 24 uur) zijn in 80 ml watermonsters gebracht en geïncubeerd bij 18⁰C, 7-6 ppm O₂ en 14 uur licht per dag. De toets is aanvankelijk uitgevoerd in een verdunningsreeks van de watermonsters met een Taub-oplossing: 0, 5, 10, 20, 40 en 80 ml verontreinigd monster aangevuld met respectievelijk 80, 75, 70, 60, 40 en 0 ml Taub-oplossing. Vanwege de geringe toxiciteit is de toets later alleen in de onverdunde oplossing uitgevoerd. Na 48 uur is het aantal sterfgevallen bepaald.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

In schema 1 zijn enkele fysisch-chemische eigenschappen van Endosulfan gegeven en het gecompileerde afbraakpatroon (Doelman et al. 1987).

De verontreinigde grond

Onderzoek naar de afbraak van Endosulfan betrof tot heden minerale gronden (Martens 1977) met een organische koolstofgehalte niet hoger dan 2,1%, wat gelijk is aan 4% organisch materiaal. De hier bestudeerde grond had een organische stofgehalte van 79%. Vanwege het zeer sterke adsorptievermogen van organisch materiaal voor Endosulfan is het moeilijk de in dit onderzoek verkregen resultaten te vergelijken met literatuurgegevens. Verder werd in het onderzoek van Martens Endosulfan als enige afzonderlijke component bestudeerd. In de hier bestudeerde venige grond is de hoeveelheid extraheerbare organische chloorverbindingen 50 mg.kg^{-1} waarvan 10,5 mg AE is en 12 mg BE. Volgens eigen analyses bevat het uitgangsmateriaal bovendien nog maximaal 2,5 mg Endosulfanmetabolieten zodat de grond ook nog andere gechlloreerde koolwaterstoffen moet bevatten. Gezien de achtergrond van het materiaal zou dat pentachloorfenol (en/of metabolieten) kunnen zijn (Grontmij z.j.). De in dit rapport gepresenteerde afbraakstudies en -balansen betreffen alleen Endosulfan.

Afbraak en toxiciteit in aërobe grond

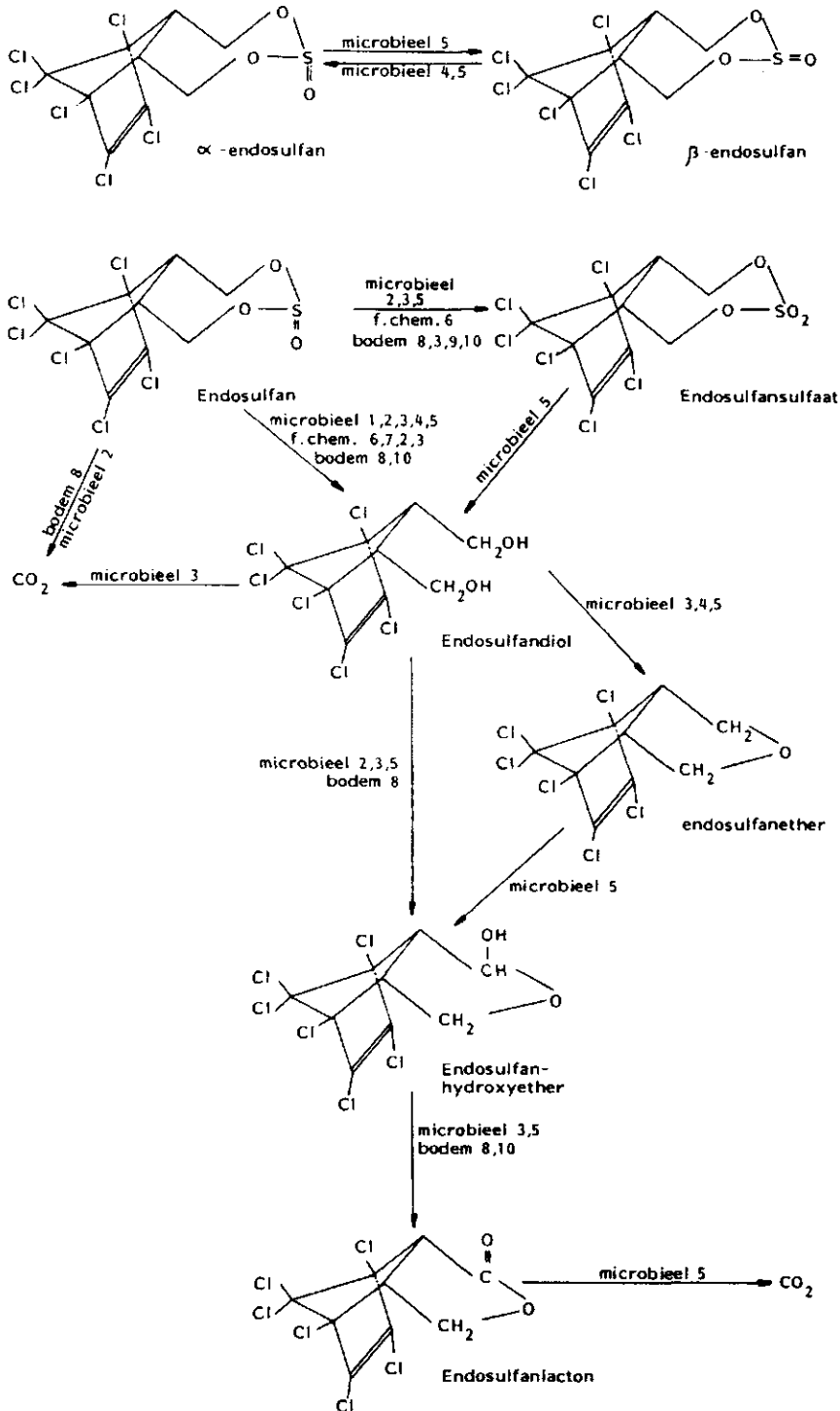
In figuur 1a is het afbraakpatroon van Endosulfan weergegeven, zoals vastgesteld in kleine hoeveelheden grond (20 g) bij 25°C . Bij schaalvergroten omstandigheden, noodzakelijk voor de toxiciteitstoetsen (750 g grond), worden vrijwel dezelfde resultaten verkregen (Fig. 1b). In Figuur 1c is het afbraakpatroon weergegeven als de grond verrijkt was met C ($1000 \text{ mg glucose.kg}^{-1}$), N ($85,8 \text{ mg ureum.kg}^{-1}$) en P ($115,6 \text{ mg.Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O.kg}^{-1}$). Bij toevoeging van deze gemakkelijk microbiologisch omzetbare substraten wordt het afbraakpatroon van Endosulfan niet beïnvloed. De halfwaardetijd van AE is ongeveer zeven weken en dat komt overeen met de laagste waarden in de literatuur (CTB): 40 dagen.

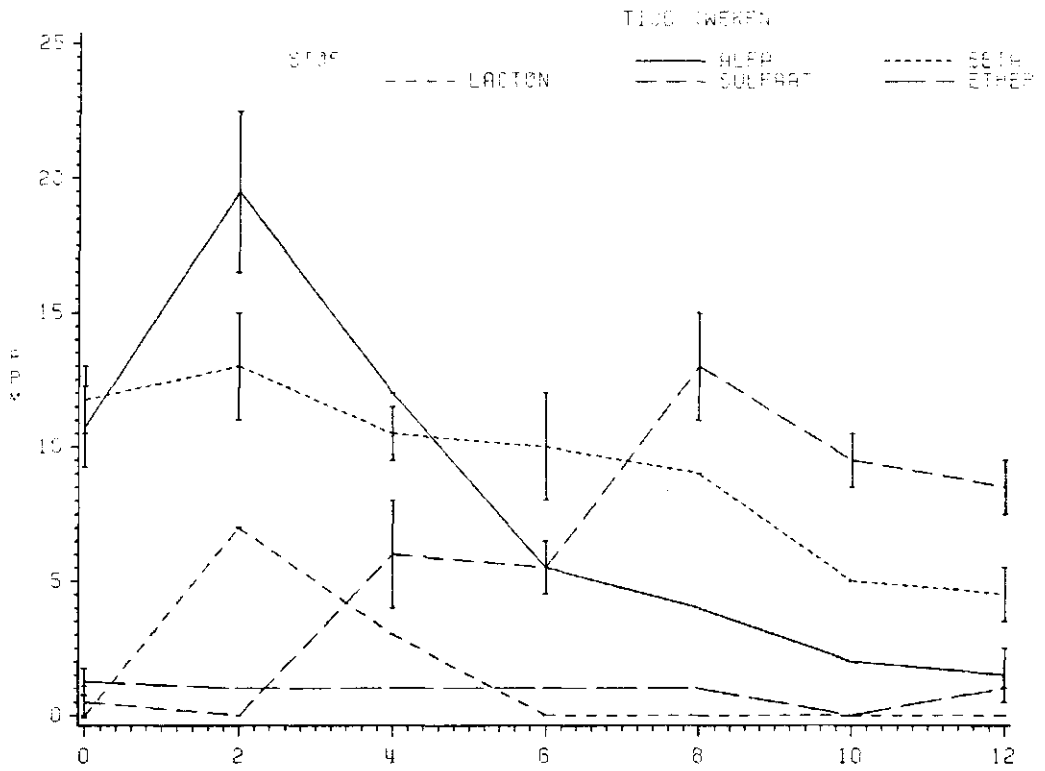
Schema 1. Fysisch-chemische eigenschappen van Endosulfan en het afbraakschema.

Chemische naam:

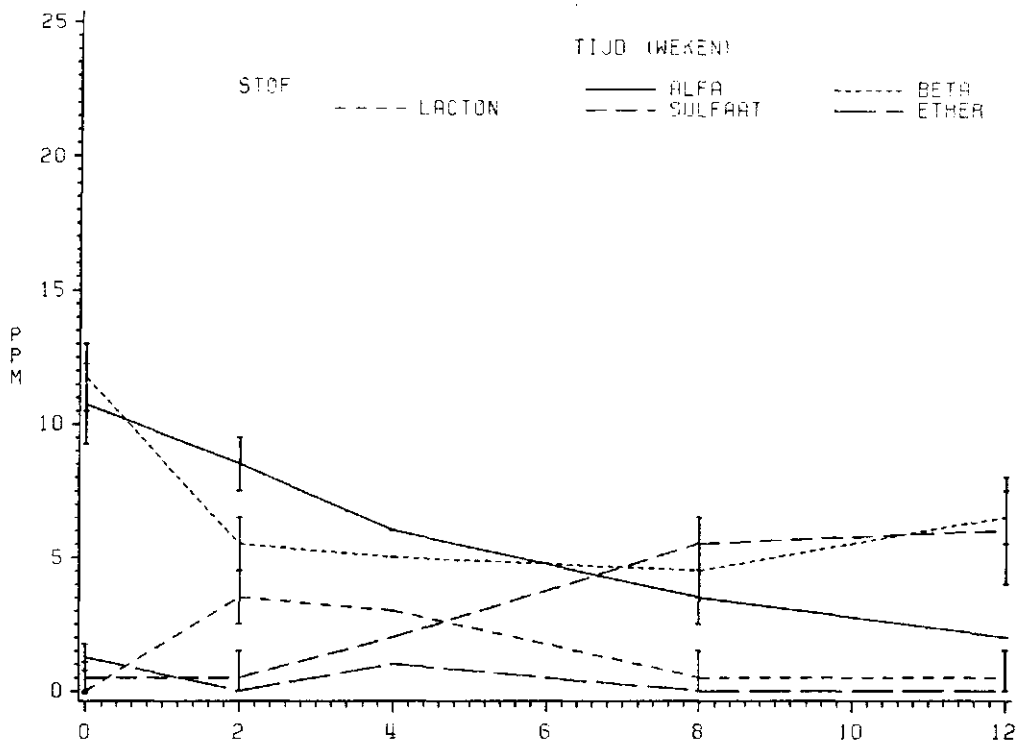
6,7,8,9,10-hexachloor-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methaan-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide.

Molecuulformule : $C_9H_6Cl_6O_3S$
Smeltpunt : $70-100^{\circ}C$
Dampspanning : 1.10^{-5} mm ($25^{\circ}C$)
Oplosbaarheid in water : 0,15 ppm ($20^{\circ}C$)
Adsorptie aan grond : sterk

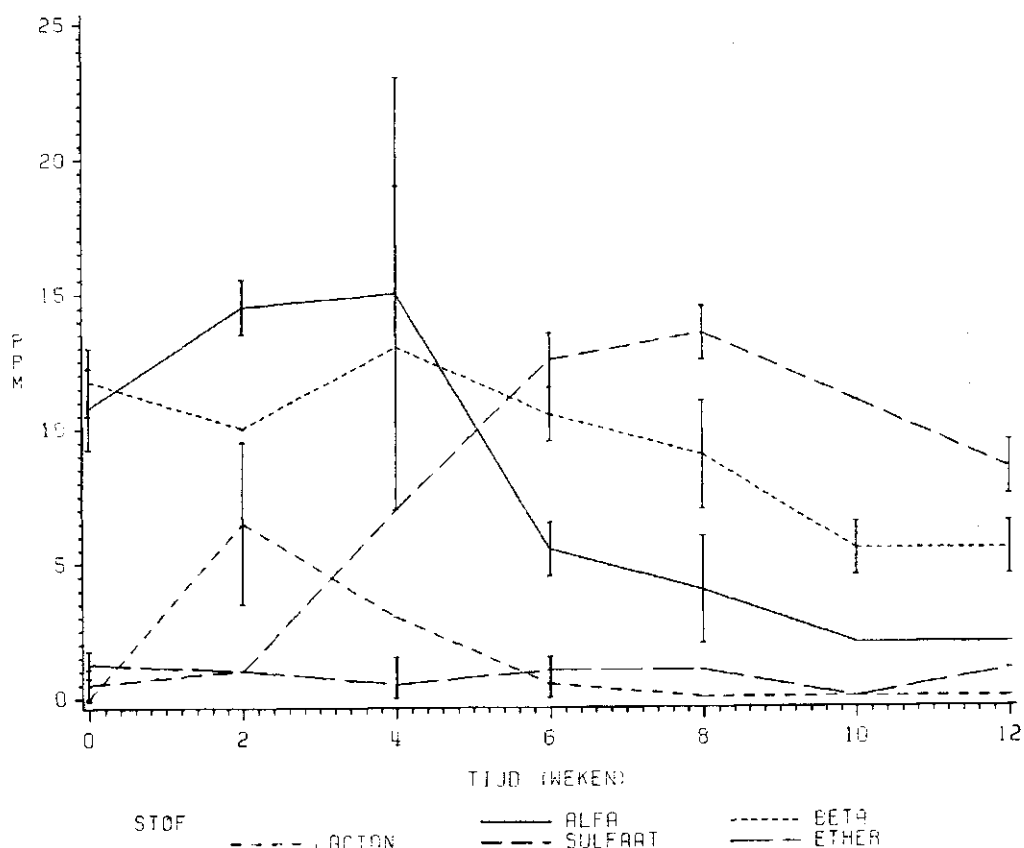




Figuur 1a. Het afbraakpatroon van Endosulfan onder aërobe omstandigheden bij 25°C gedurende twaalf weken (20 g grond).



Figuur 1b. Het afbraakpatroon van Endosulfan onder aërobe omstandigheden bij 25°C gedurende twaalf weken (750 g grond).



Figuur 1c. Het afbraakpatroon van Endosulfan onder aërobe omstandigheden terwijl extra koolstof, stikstof en fosfaat aan de grond waren toegevoegd, bij 25°C gedurende twaalf weken (750 g grond).

BE wordt langzamer afgebroken en er ontstaat ES. Dit komt overeen met de resultaten van Martens (1977).

Het gemeten uitgangsniveau (t_0) van Endosulfan was lager dan het niveau gemeten na twee weken (t_2). Dit verschijnsel trad bijna altijd in de proeven op zoals in de figuren is te zien. Gezien het afbraakpatroon van t_2 tot t_{12} zou eerder een AE-concentratie van 20 mg.kg^{-1} verwacht worden op t_0 . Het gemiddelde van vijf waarnemingen gaf echter de waarde 10.5, vandaar dat we van de gemeten waarde zijn uitgegaan en niet van een geschatte. Verder is er sprake van grote spreiding. We willen wat dit betreft benadrukken dat de grond zwaar venig is en zeer moeilijk te homogeniseren. De fracties organisch materiaal die niet door de zeef van 4 mm konden, werden fijner geknipt en via 'quartering and coning' weer aan de bulkgrond toegevoegd. Bij 15°C, in containers van 750 g grond, is alleen in het begin (t_0) en na twaalf weken de afbraak gemeten.

In Tabel 2 is de totale Endosulfanstofbalans (AE, BE, EL, ES, EE) weergegeven. Tevens is in Tabel 2 de toxiciteit gegeven op t_0 en t_{12} voor

zowel de grond bij 25°C (20 g en 750 g) als bij 15°C (750 g). Er is niet alleen sprake van omzettingen maar ook van daling van de gezamenlijke hoeveelheid naar 64%. Bij 15°C verloopt de afbraak langzamer, zoals verwacht mag worden bij een lagere temperatuur, maar ook hier is sprake van verdwijning van 20%. In hoeverre er verdwijning optreedt naar de waterfase zal later besproken worden bij de slurriesystemen.

Wat de bodem betreft zien we dat bij 25°C de toxiciteit na twaalf weken voor wormen groter is dan in het begin (t_0): sterfte 12 respectievelijk 16% en gewichtsverlies 19 respectievelijk 28%, terwijl in de grond de hoeveelheden AE en BE duidelijk afgenomen zijn (getallen zijn in procentuele aandelen uitgedrukt) en ES duidelijk toegenomen is. In de kouder geïncubeerde grond is de toxiciteit voor wormen aanvankelijk groter (13 en 29% tegenover 12 en 19%), maar uiteindelijk lager (8 en 26% tegenover 16 en 28%). Als controlegrond voor de wormtoxiciteit werd een gelijksoortige venige grond gekozen. In de controletoeetsen was het sterftepercentage nul en de gemiddelde gewichtstoename per worm 6,1% (\pm 2,8%). Gewichtsverlies is dus een duidelijke indicatie.

Ook voor de bodemmicroflora blijkt de kouder (15°C) geïncubeerde grond een hogere remming op het algemeen functioneren te veroorzaken: de afbraaktijd verschuift van 16 naar 52 uur, terwijl bij 25°C de microflora geen hinder ondervindt gezien de snelle glutaminezuurafbraak: 16 respectievelijk 19 uur. In Tabel 3 is gedetailleerd de toxiciteit van de verontreiniging in de grond aangegeven. Er is sprake van wisselende toxiciteit voor de wormenpopulatie. Er is zowel sprake van sterfte als van gewichtsverlies. Voor een gevoelige worm als *Eisenia foetida* is deze grond duidelijk toxisch.

Afbraak en toxiciteit in anaërobe grond

In Figuur 2a en b zijn de anaërobe afbraakpatronen weergegeven in 20 respectievelijk 750 g grond. Figuur 2a toont sterke overeenkomst met Figuur 1a (de aërobe afbraak). Het patroon in Figuur 2b is anders: AE en BE verdwijnen, terwijl EL, ES of EE nauwelijks in de grond meetbaar zijn. Martens (1977) meldt onder anaërobe omstandigheden een veel lagere ES-vorming. Het afbraakpatroon zoals geschetst in Figuur 2b voldoet dus meer aan de anaërobe omstandigheden dan het patroon in Figuur 2a. De halfwaardetijd ligt onder anaërobe omstandigheden (acht weken) in dezelfde orde van grootte als onder aërobe. Gezien de stofbalans vindt bij anaërobie een verdwijning van 100 naar 40% plaats (Tabel 4).

Tabel 2. Endosulfanstofbalans in de aërobe grondsystemen en de toxiciteit voor wormen en de bodemmicroflora.

Omstandigheden	25°C: 20 g		25°C: 750 g		15°C: 750 g	
	0	12	0	12	0	12
Tijd						
Endosulfan: alfa (%)	44	8	44	8	44	24
beta	48	20	48	28	48	28
lacton	0	0	0	0	0	4
sulfaat	4	32	4	28	4	16
ether	4	4	4	0	4	8
totaal (%)	100	64	100	64	100	80
Wormen: sterfte (%)			12	16	13	8
gewichtsverlies (%)			19	28	29	26
Microflora:						
afbraaktijd (uren)			16	19	16	52
aantal			$1,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$		

In de anaërobe grond met extra C, P, N is het afbraakpatroon niet anders dan zonder deze toevoegingen. In Tabel 4 is de stofbalans weergegeven bij 25°C en 15°C en tevens de toxiciteit. In de grote containers is er bij 15°C een duidelijk langzamere afbraak (72% restant) dan bij 25°C (40% restant). Onder anaërobe omstandigheden is de toxiciteit bij 15°C voor wormen hoger (13 naar 17% sterfte) dan bij 25°C (12 en 11%). Voor de microflora is er, net als bij de aërobe grond bij lage temperatuur, een hogere toxiciteit dan bij 25°C: een verschuiving van de afbraakpiek van 16 naar 56 uur bij 15°C en van 16 naar 20 uur bij 25°C. Bezien we de toxiciteit voor wormen gedurende de twaalf weken (Tabel 5), dan is zowel de parameter sterfte als gewichtsverlies sterk wisselend. De toxiciteit is in het begin het sterkst. Opmerkelijk is de lage toxiciteit na vier weken (0% sterfte; 3% gewichtsverlies) die daarna oploopt (t_{10} : 16% sterfte plus 14% gewichtsverlies bij de overlevenden).

In een kort aanvullend experiment van zes weken waarbij de anaërobe grond onder water stond (stilstaande onderwaterbodem) bij 15°C, steeg

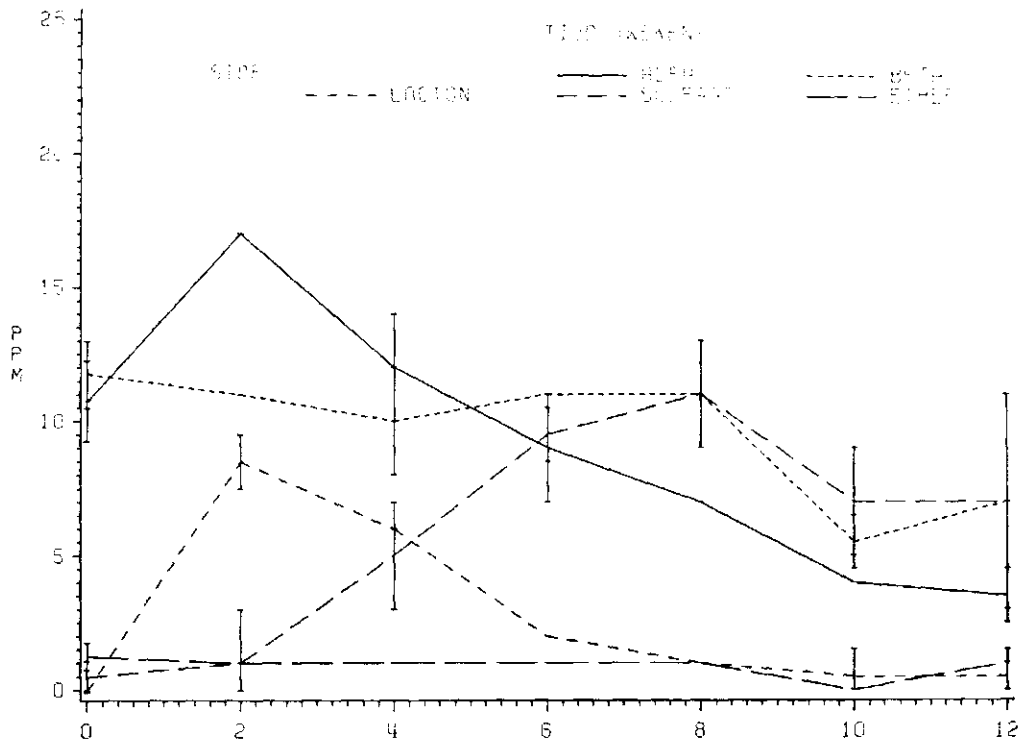
vooral de concentratie van EL (6 mg.kg^{-1} ; Tabel 6). De grondtoxiciteit daalde voor de wormenpopulatie, maar steeg voor de microbenpopulatie. Het bovenstaande vocht veroorzaakte een sterfte van 50% bij de guppen.

Afbraak en toxiciteit in aërobe slurrie

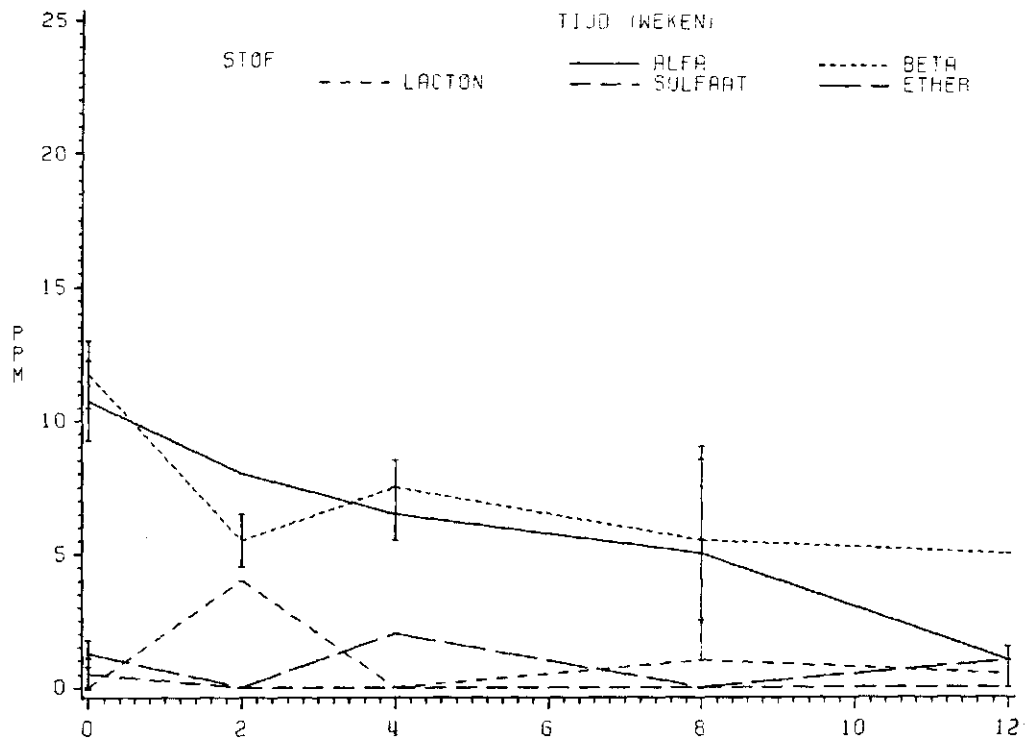
Het verschil tussen slurrie en grond, naast het verschil in vochtgehalte, is dat het slurriesysteem ronddraait, continu in beweging is en er dus een veel betere massa-overdracht is dan in de stilstaande grond. De aërobe slurrie, met een O_2 -niveau dat voortdurend boven 6,3 ppm is (11 is maximaal), bevat 30 g grond in 570 ml H_2O . Aanvankelijk hebben we getracht om kleinere containers (20 g grond, 20 ml H_2O) aëroob te houden. Het lukte daarbij niet het O_2 -gehalte van het bodemvocht tussen 4-10 ppm te houden waardoor we er niet van verzekerd waren dat het systeem inderdaad aëroob was.

In Figuur 3a is het verloop van Endosulfan (+ metabolieten) gegeven gedurende vier weken in ppm grond. In die periode namen AE en BE sterk af en werden voornamelijk in ES omgezet, terwijl 16% van de componenten verdween. De halfwaardetijd voor AE is drie weken en deze waarde is laag! In Figuur 3b is het Endosulfanverloop weergegeven in de waterfase in ppb vocht. De Endosulfanconcentratie in de grond is ongeveer een factor 1000 hoger dan in het bodemvocht (bij continue beweging).

N.B. De toename van de AE-concentratie van 5 naar 22 ppb (t_1) kan veroorzaakt worden door versterkte desorptie vanwege de continue beweging. Deze hogere concentratie in de vochtfase impliceert een grotere beschikbaarheid voor micro-organismen. Het is dan niet verwonderlijk dat deze concentratie vervolgens weer sterk daalt.



Figuur 2a. Het afbraakpatroon van Endosulfan onder anaërobe omstandigheden bij 25°C gedurende twaalf weken (20 g grond).



Figuur 2b. Het afbraakpatroon van Endosulfan onder anaërobe omstandigheden bij 25°C gedurende twaalf weken (750 g grond).

Tabel 3. De toxiciteit van de aërobe grond bij 25°C t.a.v. de wormenpopulatie (sterfte en gewichtsverlies) en de microflora (tijdstip van maximale ademhaling bij toevoeging van glutaminezuur).

	week	0	2	4	6	8	10	12
toets								
wormen:								
sterfte (%)		12	12	0	0	12	12	16
gewichtsverlies (%)		19	19	13	26	23	34	28
microflora:								
afbraaktijd (uren)		16	18	-	-	18	19	19
aantal		1.2x10 ⁸	-	-	-	-	-	8.1x10 ⁷

Tabel 4. De Endosulfan stofbalans in de anaërobe systemen en de gemeten toxiciteit t.a.v. wormen en de bodemmicroflora.

Omstandigheden	25°C; 20 g		25°C; 750 g		15°C; 750 g					
Tijd	0	12	0	12	0	12				
Endosulfan: alfa (%)	44	16	44	8	44	24				
beta	48	28	48	22	48	40				
lacton	0	4	0	4	0	4				
sulfaat	4	28	4	0	4	0				
ether	4	4	4	6	4	4				
totaal	100	76	100	40	100	72				
Wormen: sterfte (%)							12	11	13	17
gewichtsverlies (%)							29	5	29	28
Microflora:										
afbraaktijd (uur)							16	20	16	56
aantal							-	-	-	-

Tabel 5. De toxiciteit van de anaërobe grond bij 25°C ten aanzien van de wormenpopulatie (sterfte en gewichtsverlies) en de microflora (tijdstop van de maximale ademhaling bij toevoeging van glutaminezuur).

	week	0	2	4	6	8	10	12
toets								
wormen:								
sterfte (%)		12	6	0	0	6	16	11
gewichtsverlies (%)		29	22	3	19	11	14	5
microflora:								
afbraaktijd (uren)		16	-	-	-	20	18	20
totaal aantal		1.2x10 ⁸						

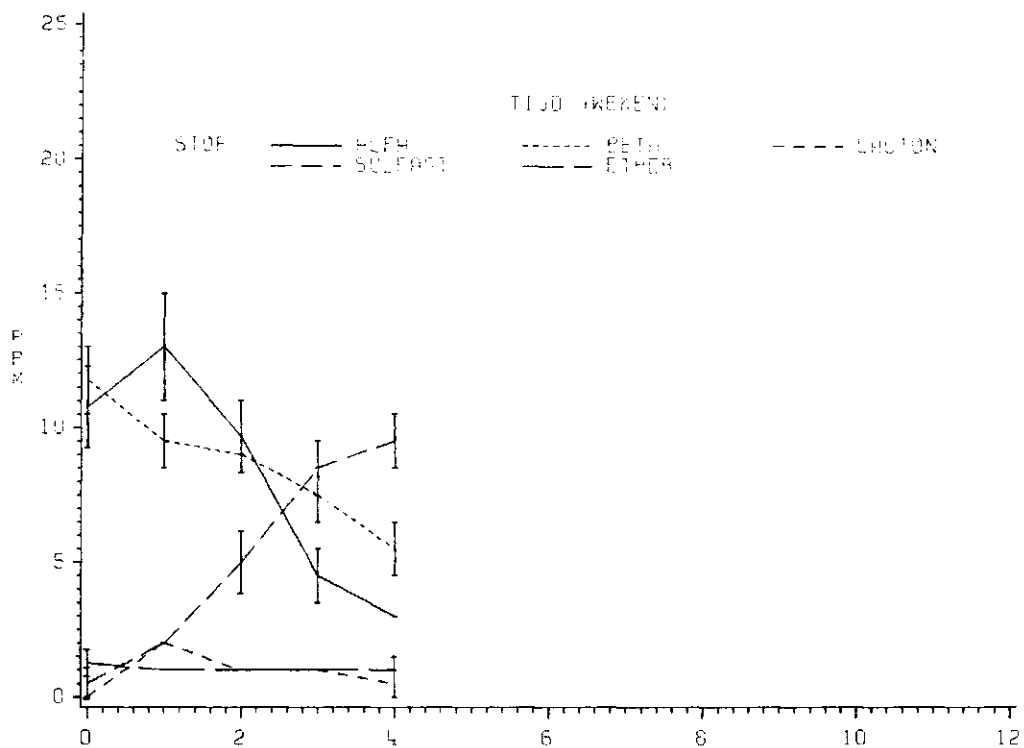
Tabel 6. De concentratie van de Endosulfancomponenten en toxiciteit van grond en water van bij 15°C anaëroob (onder water!) geïncubeerde slurry.

	grond (mg.kg ⁻¹)		vocht (ug.l ⁻¹)	
	t ₀	t ₆	t ₀	t ₆
Endosulfan: alfa (%)	11	9	0	5
beta	12	10	0	5
lacton	0	6	0	5
sulfaat	1	0	0	1
ether	1	1	0	4
wormen:				
sterfte (%)	12	6		
gewichtsverlies (%)	29	26		
microflora:				
afbraaktijd (uren)	16	57		
sterfte guppen (%)	-	-	-	50

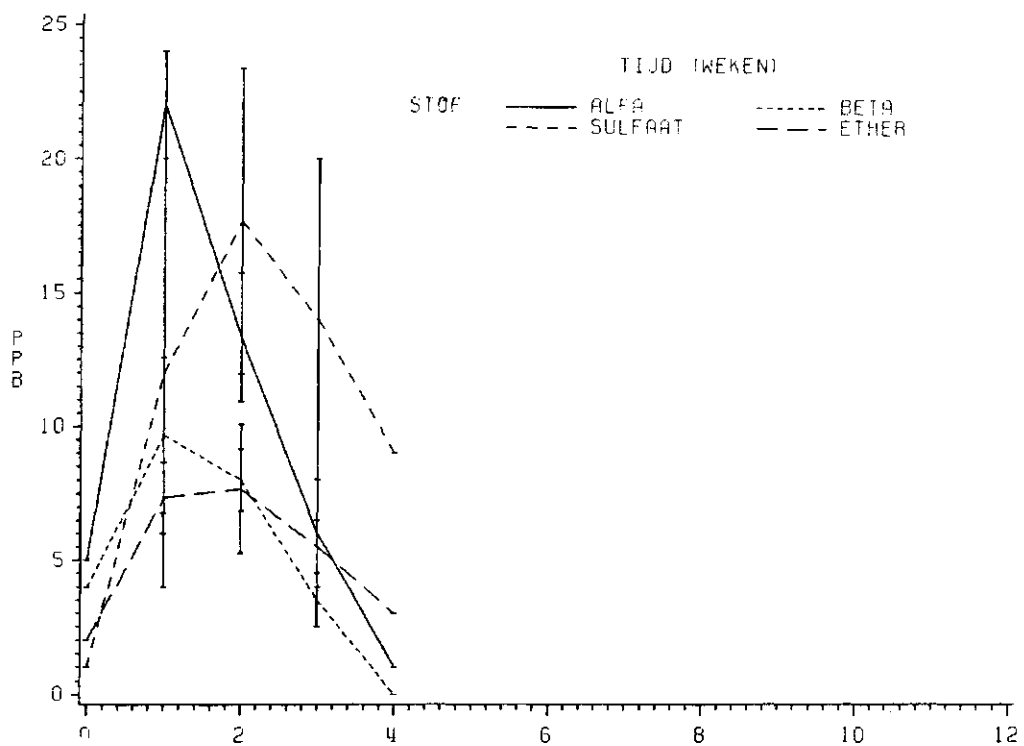
Tabel 7. De toxiciteit voor guppen en watervlooien van de waterige fase van de aërobe slurrie.

	week 0	1	2	3	4
toets					
guppen:					
sterfte (%)	25	25	0	100	75
watervlooien:					
sterfte (%)	20	20	0	0	0
O ₂ -gehalte	-	-	-	-	9,3 ppm

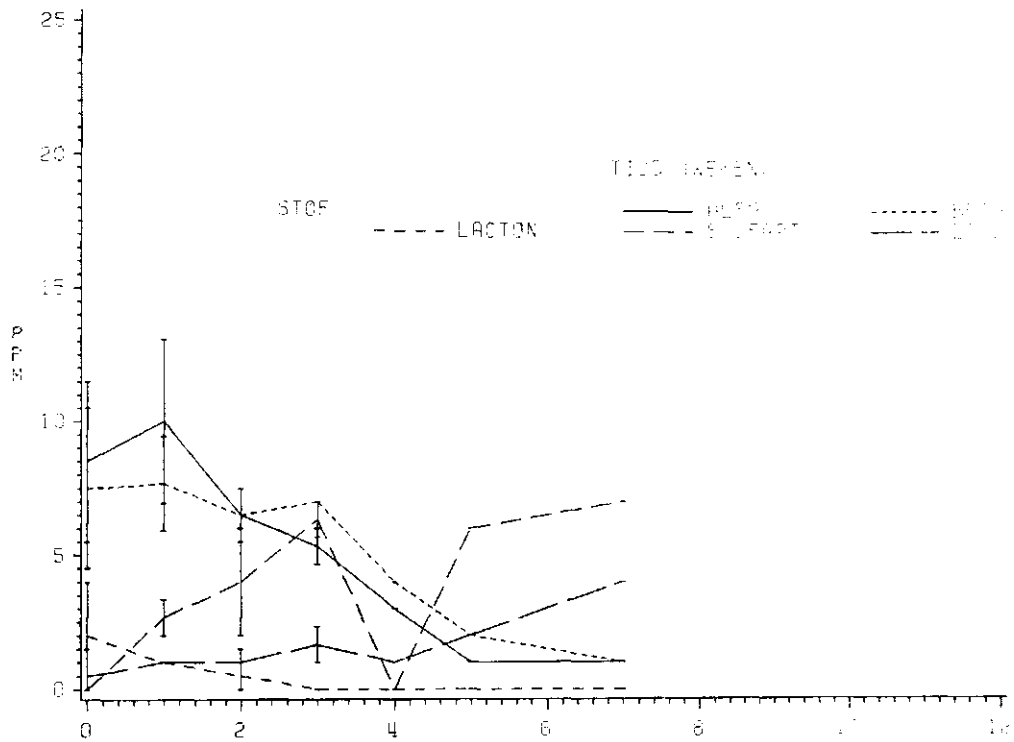
In Tabel 7 is de toxiciteit van het bodemvocht weergegeven voor guppen en watervlooien. Voor de zeer gevoelige guppen is de waterfase in de derde en vierde week aanzienlijk toxisch, maar laag voor watervlooien. Het sterftepercentage in de controle (vochtfractie van venige schone grond) was nul voor zowel de guppen als voor de watervlooien. Het is opmerkelijk dat de lage sterfte op t_2 (Tabel 7) samenvalt met een hoge concentratie van 12 ppb AE en 17 ppb ES, aangezien op t_3 en t_4 deze chemische stoffen in veel lagere hoeveelheden aanwezig zijn en er toch een veel hogere sterfte is van de guppen.



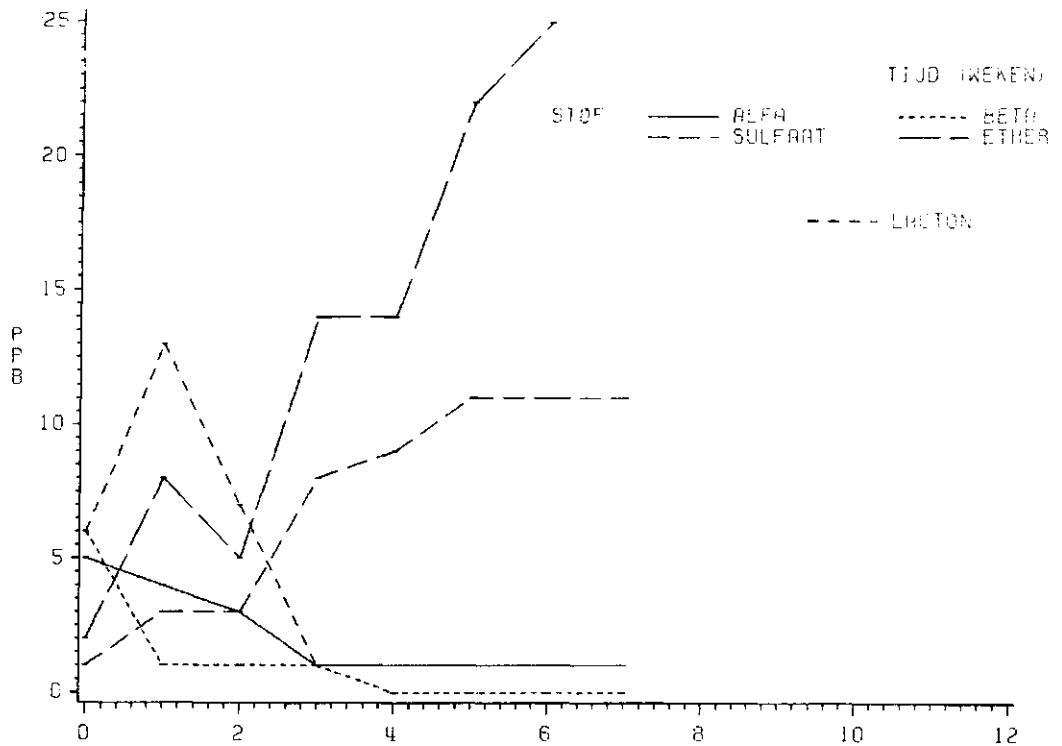
Figuur 3a. Het afbraakpatroon van Endosulfan in de grondfase in aërobe slurry bij 25°C gedurende vier weken.



Figuur 3b. De Endosulfanconcentratie (+ metabolieten) in de waterfase van de aërobe slurry bij 25°C gedurende vier weken.



Figuur 4a. Het afbraakpatroon van Endosulfan in de grondfase in aërobe slurrie in de betonmolen (25-30°C) gedurende zeven weken.



Figuur 4b. De Endosulfanconcentratie (+ metabolieten) in de waterfase van aërobe slurrie (betonmolen; 25-30°C) gedurende zeven weken.

Aangezien voor de terrestrische en aquatische toetsen eenheden van 300-500 g grond en 300-600 ml vocht noodzakelijk zijn, is voor het gelijktijdig bepalen van de toxiciteit een grote continu ronddraaiende container nodig. Bij afbraakexperimenten van hexachloorcyclohexaan afbraak experimenten bleek een betonmolen (25 rpm) een zeer geschikte container te zijn. Vandaar dat ook in dit onderzoek een experiment met een betonmolen werd verricht.

In de betonmolenslurrie (3 kg grond en 27 l vocht) is in de grondfase een snelle en sterke daling van AE ($t_{\frac{1}{2}}$: vier weken) en BE ($t_{\frac{1}{2}}$: vijf weken) waar te nemen in zeven weken, terwijl dan ES en EE gaan toenemen (Fig. 4a). In de waterfase is na vier weken nauwelijks nog Endosulfan (alfa en beta) te meten, maar ES (tot 10 ppb) en EE (tot 25 ppb) stijgen sterk (Fig. 4b). De totale hoeveelheid oplosbare Endosulfan-intermediären neemt dus sterk toe in de aquatische fase. In Tabel 8 zijn de toxiciteitsgegevens vermeld. De hoge sterfte van de guppen correleert met de hoge concentratie ES (10 ppb) en EE (25 ppb) in de aquatische fase. De toxiciteit van de vaste fase voor wormen is wel verminderd (sterfte van 13 naar 6% en gewichtsverlies van overlevenden van 29 naar 26%), maar nog duidelijk aanwezig. Voor de microflora is de toxiciteit toegenomen, gezien het veel later optreden van de glutaminezuurpiek (van 16 uur naar 52 uur). Het totaal aantal micro-organismen is van normale grootte.

Afbraak en toxiciteit in anaërobe slurrie

De afbraak in anaërobe slurrie werd bepaald in zowel 20 als in 750 g grond. Het Endosulfanverloop in de grondfase in deze twee systemen is identiek en weergegeven in Figuur 5a. AE heeft een duidelijk dalend verloop. BE heeft op t_4 , t_6 en t_8 dezelfde waarde als op t_0 en gaat dan afnemen. EL, EE of ES worden nauwelijks gevormd. In de anaërobe waterfase (Fig. 5b) liggen de concentraties beneden 5 ppb, terwijl de toxiciteit (Tabel 9) voor guppen hoog is: behalve op t_2 een sterftepercentage van 50% of meer. Met name de sterfte op t_{12} (100%) is opmerkelijk in vergelijking met de chemische niveaus. Ook het sterftepercentage van de watervlooiën is opmerkelijk hoog: variërend tussen 20 en 60%. Vergeleken met de aëroob geïncubeerde gronden en vloeibare fases is de anaëroob geïncubeerde waterfase dus zeer toxisch.

N.B. De omzetting van natuurlijk organisch materiaal onder aërobe omstandigheden is van een ander karakter (CO_2 -vorming) dan onder anaërobe om-

Tabel 8. De toxiciteit voor guppen, watervlooien, wormen en bodemmicroflora van de aërobe slurrie in de betonmolen.

week	0	1	2	3	4	5	6	7

toets								

Guppen:								
sterfte (%)	50	0	0	75	-	-	-	100
Watervlooien								
sterfte (%)	20	0	0	0	0	0	0	0
Zuurstof (ppm)	-	-	5,6	6,2	-	6,5	-	-
Temperatuur (°C)	-	23-27	24-27	24-27	26-30	26-31	26-30	25-29

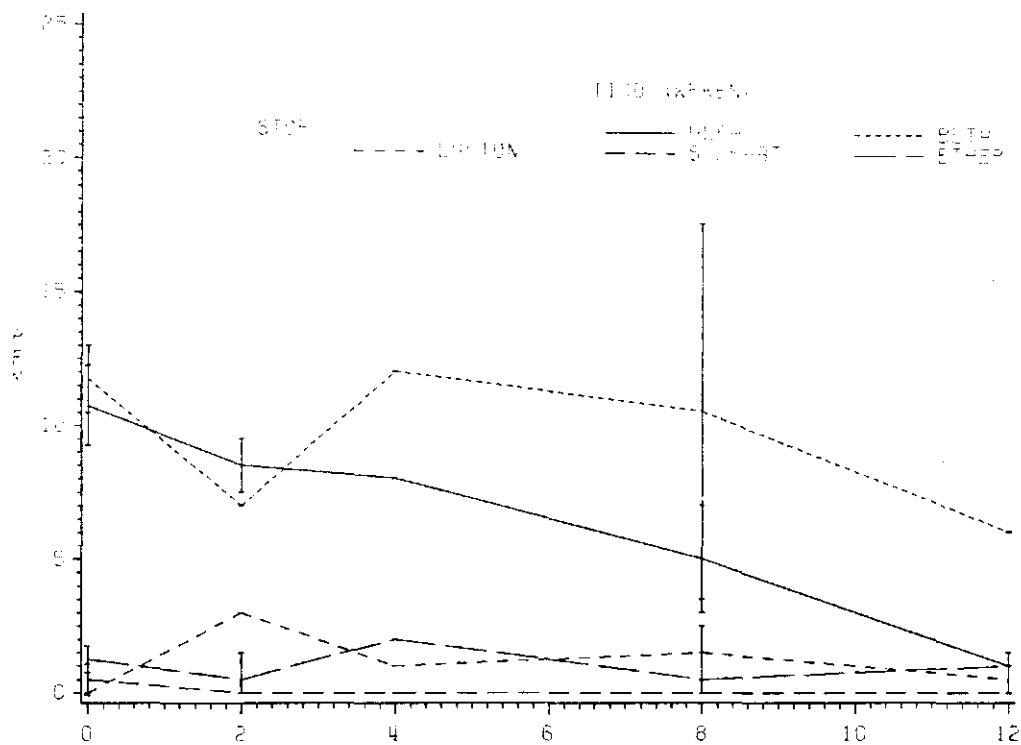
Wormen:								
sterfte (%)	13	-	-	-	-	-	-	6
gewichtsverlies (%)	29	-	-	-	-	-	-	26
Microflora:								
afbraaktijd (uren)	16	-	-	-	-	-	52	-
Totaal aantal	1.2×10^8	-	-	-	-	-	2.6×10^7	-

standigheden (o.a. CH₄-vorming). Wellicht dat hier natuurlijke verbindingen tot de toxiciteit bijdragen. Een langdurige anaërobe controle heeft niet plaatsgevonden.

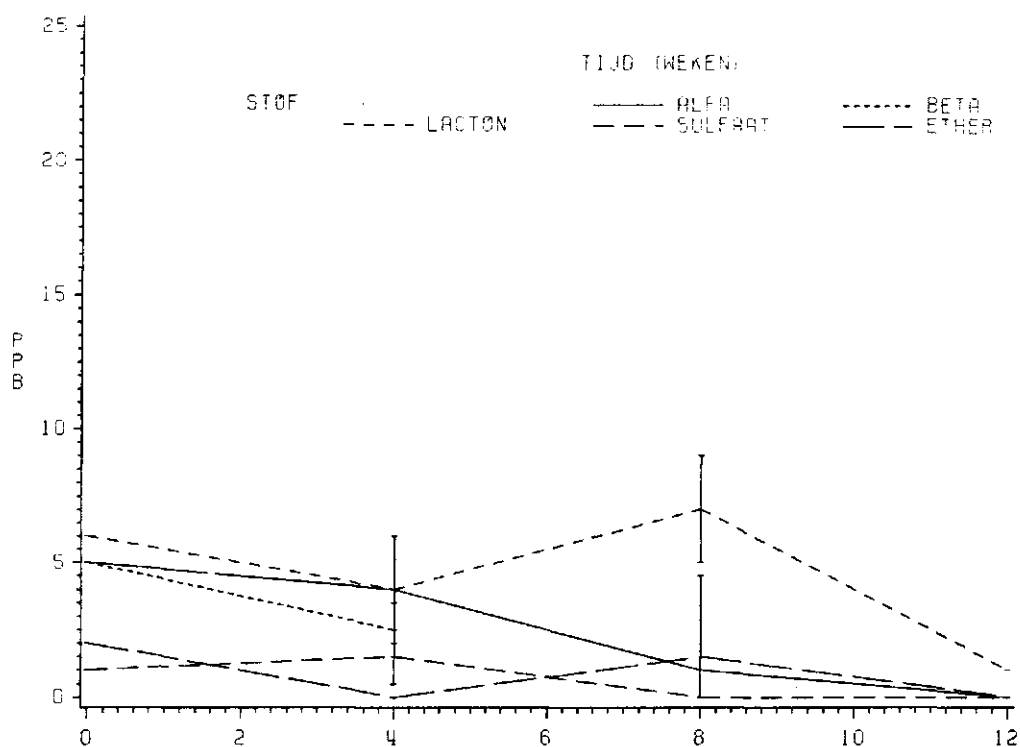
De toxiciteit van de grond voor wormen wisselt en het sterftepercentage daalt van 12 naar 9, terwijl de gewichtsafname van de overlevenden daalt van 29 naar 2%. Onder anaërobe omstandigheden is de toxiciteit bij 15°C hoger voor wormen dan bij 25°C. Dit geldt ook voor het functioneren van de totale bodemmicroflora: bij 25°C een activiteitspiek na 21 uur en bij 15°C na 57 uur.

Toevoeging van norborneenanhydride

In Figuur 6a is het Endosulfanverloop weergegeven in grond, verrijkt met norborneenanhydride, bij 25°C gedurende zes weken. De daling van Endosulfan is geringer en trager dan in niet verrijkte grond (bv. Fig. 1). In Figuur 6b is de afbraak van Endosulfan weergegeven in aërobe slurrie, verrijkt met norborneenanhydride 25°C; zes weken). Er vindt geen verdwijning van AE of BE plaats, toch zien we het ES-niveau stijgen.



Figuur 5a. Het afbraakpatroon van Endosulfan in de grondfase onder anaërobe omstandigheden bij 25°C gedurende twaalf weken.



Figuur 5b. De Endosulfanconcentratie (+ metabolieten) in de waterfase van de anaërobe slurry bij 25°C gedurende twaalf weken.

Binnen een periode van zes weken heeft de toegevoegde, op Endosulfan gelijkende, verbinding een negatieve invloed op de afbraak van Endosulfan: in grond is er vertraagde afbraak; in aërobe slurrie is er geen afbraak. N.B. In het uitgangsmateriaal is de Endosulfanconcentratie lager dan in het uitgangsmateriaal van de eerste serie experimenten (Fig. 1-5).

Tabel 9. De toxiciteit van anaërobe slurrie (25°C en 15°C) in zowel grond als waterfase voor de getoetste parameters: wormen, microflora, guppen en watervlooien.

	week 0	2	4	6	8	10	12

toets							

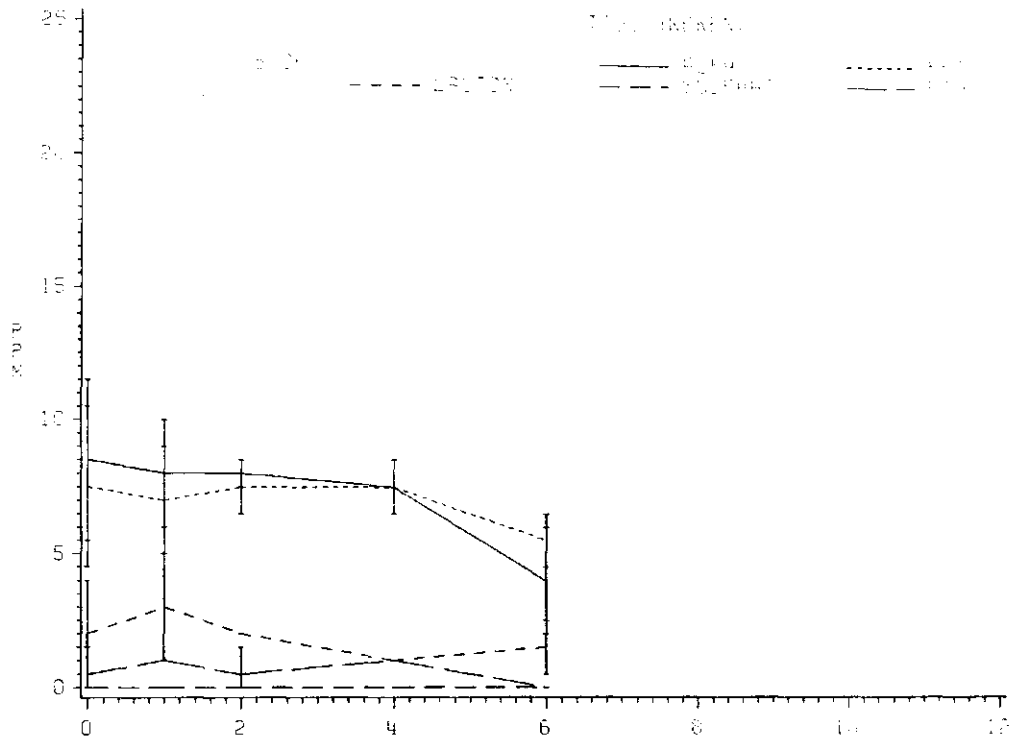
Wormen:							
sterfte (%)	12	14	3	-	12	6	9
gewichtsverlies (%)	29	21	9	-	17	9	2
sterfte (%) (15°C)	29	-	-	-	-	-	26
Microflora:							
afbraaktijd (uur)	16	17	-	-	19	-	21
afbraaktijd (15°C)	16	-	-	-	-	-	57

Guppen:							
sterfte (%)	50	0	50	-	75	-	100
Watervlooien:							
sterfte (%)	20	60	-	60	-	20	60

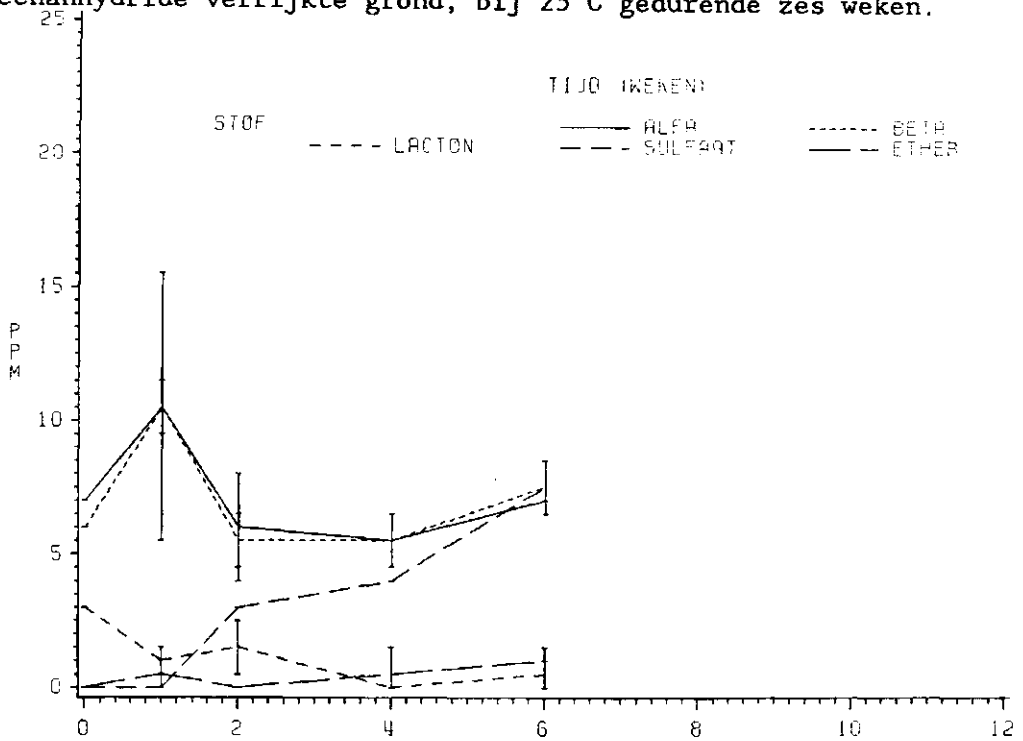
Afbraak in steriele grond

In Tabel 10 is de invloed van sterilisatie, via gammastraling, weergegeven op de AE- en BE-concentratie (mg.kg^{-1}) in aërobe grond en in de grondfase van aërobe slurrie, na acht weken incubatie bij 25°C.

Ook onder steriele omstandigheden daalt de concentratie van AE en BE in beide gevallen van 8 naar 5 mg.kg^{-1} , terwijl het onder niet-steriele omstandigheden daalt van 8 naar 2 respectievelijk 3 mg.kg^{-1} . Er kan dus sprake zijn van fysisch-chemische afbraak maar de microbiële afbraak is belangrijker.



Figuur 6a. Het afbraakpatroon van Endosulfan in aërobe met norborneenanhydride verrijkte grond, bij 25°C gedurende zes weken.



Figuur 6b. Het afbraakpatroon van Endosulfan in de grondfase van in aërobe met norborneenanhydride verrijkte slurrie, bij 25°C gedurende zes weken.

Tabel 10. De invloed van steriliseren (gammastraling) op de afbraak van AE en BE (in mg.kg⁻¹), gedurende een incubatieperiode van acht weken bij 25°C.

	<u>slurrie</u>			<u>grond</u>	
	<u>t₀</u>	<u>t₈</u>	<u>t₈</u>	<u>t₈</u>	<u>t₈</u>
alfa	8	5	2	7	2
beta	8	5	2	7	3

4 LITERATUUR

- Barnes, W.W. & G.W. Ware 1965. The absorption and metabolism of C¹⁴-labeled Endosulfan in the housefly. *Journal of Economic Entomology*. 58, 2: 286-292.
- C.T.B., Commissie voor Toelating van Bestrijdingsmiddelen, verzamelde gegevens. Ministerie van VROM.
- Doelman, P., M. Fredrix & H. Schmiermann 1987. Microbiologische afbraakprocessen als saneringsmethode van met bestrijdingsmiddelen verontreinigde gronden. RIN-rapport 87/10. Rijksinstituut voor Natuurbeheer, Arnhem.
- Doelman, P., L. Haanstra, H. Loonen and A. Vos. Purifying power of soil with regard to alpha- and beta-HCH in a landfarming and dense slurry system under aerobic conditions in a temperate climate (In voorbereiding).
- Greve, P.A. & S.L. Wit 1971. Endosulfan in the Rhine river. *Journal Water Pollution Control Fed.* 43: 2338-2348.
- Grontmij N.V., den Bilt, afd. Geotechniek. Bijzonder inventariserend onderzoek Bommelerwaard - Projectcode GE/000/06 (niet openbaar concept).
- Haanstra, L. & P. Doelman 1984. Glutamic acid decomposition as a sensitive measure of heavy metal pollution in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 6: 595-600.
- Martens, R. 1976. Degradation of [8,9-¹⁴C] Endosulfan by soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 6: 853-858.
- Martens, R. 1977. Degradation of Endosulfan-8,9-¹⁴C in soil under different conditions. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 17, 4: 438-447.
- Miles, J.R.W. & P. Moy 1979. Degradation of Endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 1-2: 13-19.

De volgende RIN-rapporten kunnen besteld worden door overschrijving van het verschuldigde bedrag op giro 516 06 48 van het RIN te Leersum onder vermelding van het rapportnummer. Uw giro-overschrijving geldt als bestelformulier. Toezending geschiedt franco.

- 85/21 A.W.M.Mol, De literatuur over Nederlandse aquatische macrofauna tot 1983. 176 p. f 22,-
- 85/22 W.J.Wolff, Het effect van natuur- en milieubescherpende maatregelen op de levensgemeenschappen van de Waddenzee. 18 p. f 3,40
- 86/5 J.G.de Molenaar, Een literatuurstudie naar vogelsterfte door het opnemen van hagelkorrels. 16 p. f 4,-
- 86/7 M.Nooren, Inventarisatie van de houtwallen in het nationale park de Hoge Veluwe. 49 p. f 8,-
- 86/8 M.Nooren, Over het verleden van de Hoge Veluwe. 89 p. f 13,50
- 86/9 K.Stoker, De verspreiding van rode bosmieren op de Hoge Veluwe. 110 p. f 15,60
- 86/11 H.N.Leys, Oecologische en vegetatiekundige aspecten van de holwortel (*Corydalis bulbosa*). 132 p. f 19,-
- 86/13 M.Platteeuw, Effecten van geluidhinder door militaire activiteiten op gedrag en ecologie van wadvogels. 50 p. f 7,50
- 86/14 N.Dankers, Onderzoek naar de rol van de mossel en de mosselcultuur in de Waddenzee. 36 p. f 6,-
- 86/16 G.Hanekamp & H.M.Beije, Natuurwetenschappelijke aspecten van het machinaal plaggen van heide. 36 p. f 6,-
- 86/17 G.Visser, Verstoringen en reacties van overtijende vogels op de Noordvaarder (Terschelling) in samenhang met de omgeving. 221 p. f 27,50
- 86/18 C.J.Smit, Oriënterend onderzoek naar veranderingen in gedrag en aantallen van wadvogels onder invloed van schietoefeningen. 44 p. f 7,-
- 86/19 B.van Noorden, Dynamiek en dichtheid van bosvogels in geïsoleerde loofbosfragmenten. 58 p. f 8,50
- 86/21 G.P.Gonggrijp, Gea-objecten van Limburg. 287 p. f 34,-
- 87/1 W.O.van der Knaap & H.F.van Dobben, Veranderingen in de epifytenflora van Rijnmond sinds 1972. 36 p. f 6,-
- 87/2 A.van Winden, G.Rijsdijk, A.Schotman & J.Philippona, Ruimtelijke relaties via vogels in het Strijper-Aagebied gedurende broedtijd en zomer. 97 p. f 14,50
- 87/3 F.J.J.Niewold, De korhoenders van onze heideterreinen: verleden, heden en toekomst. 32 p. f 5,-
- 87/4 H.Koop, Het RIN-bosecologisch informatiesysteem; achtergronden en methoden. 47 p. f 7,50
- 87/5 K.Kersting, Zuurstofhuishouding van twee poldersloten in de polder Demmerik. 63 p. f 11,-
- 87/6 G.F.Willemsen, Bijzondere plantesoorten in het nationale park de Hoge Veluwe; voorkomen en veranderingen. 92 p. f 13,50
- 87/7 M.J.Nooren, Het verleden van de houtwallen in het nationale park de Hoge Veluwe. 23 p. f 5,-
- 87/8 G.Groot Bruinderink, D.Kloeg & J.Wolkers, Het beheer van de wilde zwijnen in het Meinweggebied (Limburg). 96 p. f 14,50
- 87/9 K.S.Dijkema, Selection of salt-marsh sites for the European network of biogenetic reserves. 30 p. f 5,50
- 87/10 P.Doelman, M.Fredrix & H.Schmiermann, Microbiologische afbraakprocessen als saneringsmethode van met bestrijdingsmiddelen verontreinigde gronden. 224 p. f 27,50
- 87/11 G.J.Baaijens, Effecten van ontwateringswerken in de ruilverkaveling

- Ruinerwold-Koekange. 64 p. f 9,-
- 87/13 J.A.Weinreich & J.H.Oude Voshaar, Populatieontwikkeling van overwinterende vleermuizen in de mergelgroeven van Zuid-Limburg (1943-1987). 62 p. f 8,-
- 87/14 N.Darkers, K.S.Dijkema, G.Londo, P.A.Slim, De ecologische effecten van bodemdaling op Ameland. 90 p. f 13,50
- 87/15 F.Fahner & J.Wiertz, Handleiding bij het WAFLO-model. 99 p. f 14,50
- 87/16 J.Wiertz, Modelvorming in de projecten van WAFLO en SWNBL. 34 p. f 6,-
- 87/17 W.H.Diemont & J.T.de Smidt (eds.), Heathland management in The Netherlands. 110 p. f 15,50
- 87/18 Effecten van de kokkelvisserij in de Waddenzee. 23 p. f 3,75
- 87/19 H.van Dam, Monitoring of chemistry, macrophytes, and diatoms in acidifying moorland pools. 113 p. f 16,-
- 87/20 R.Torenbeek, P.F.M.Verdonschot & L.W.G.Higler, Biologische gevolgen van vergroting van waterinlaat in de provincie Drenthe. 178 p. f 23,-
- 87/21 J.E.Winkelma & L.M.J.van den Bergh, Voorkomen van eenden, ganzen en zwanen nabij Urk (NOP) in januari-april 1987. 52 p. f 7,50
- 87/22 B.van Dessel, Te verwachten ecologische effecten van pekelozing in het Eems-Dollardgebied. 71 p. f 10,-
- 87/23 W.D.Denneman & R.Torenbeek, Nitraatimmissie en Nederlandse ecosystemen: een globale risico-analyse. 164 p. f 21,-
- 87/24 M.Buil, Begrazing van heidevegetaties door edelhert en moeflon; een literatuurstudie. 31 p. f 5,60
- 87/25 M.Post, Toelichting op de vegetatiekaart (1981) van het nationale park de Hoge Veluwe. 49 p. f 7,50
- 87/26 H.A.T.M.van Wezel, Heidefauna in het nationale park de Hoge Veluwe. 54 p. f 8,-
- 87/28 G.M.Dirkse, De natuur van het Nederlandse bos. 217 p. f 27,50
- 87/29 H.Siepel et al., Beheer van graslanden in relatie tot de ongewervelde fauna: ontwikkeling van een monitorsysteem. 127 p. f 17,95
- 88/30 P.F.M.Verdonschot & R.Torenbeek, Lettercodering van de Nederlandse aquatische macrofauna voor mathematische verwerking. 75 p. f 10,00
- 88/31 P.F.M.Verdonschot, G.Schmidt, P.H.J.van Leeuwen, J.A.Schot, Steekmuggen (Culicidae) in de Engbertsdijkvenen. 109 p. f 15,50
- 88/33 H.Eijsackers, C.F.van de Bund, P.Doelman, Wei-chun Ma, Fluctuerende aantallen en activiteiten van bodemorganismen. 85 p. f 13,00
- 88/34 Toke de Wit, De effecten van ozon op natuurlijke ecosystemen; een literatuuronderzoek. 27 p. f 5,20
- 88/35 A.J.de Bakker, H.F.van Dobben, Effecten van ammoniakemissie op epifytische korstmossen; een correlatief onderzoek in de Peel. 49 p. f 7,50
- 88/36 B. van Dessel, Ecologische inventarisatie van het IJsselmeer. 82 p. f 12,75
- 88/37 A.Schotman, Tussen bos en houtwal; broedvogels in een Twents cultuurlandschap. 87 p. f 13,25
- 88/39 P.Doelman, H. Loonen, A. Vos, Ecotoxicologisch onderzoek in met Endosulfan verontreinigde grond: toxiciteit en sanering. 34 p. f 6,00

