

Interacties tussen zware metalen en bodemecosystemen: een overzicht van experimenteel werk.

Een vroege kopervervuiler

Bij zijn intrede per koets als koning in Bruxelles strooide Willem I in 1815 met koperen munten waar de Brusselaars gouden of zilveren muntstukken verwachtten. Aan de benaming 'koning koper' wist hij sindsdien in België niet meer te ontsnappen.

Interacties tussen zware metalen en bodemecosystemen: een overzicht van experimenteel werk

Een weergave van 10 jaar bodemecotoxicologisch onderzoek bij IB-AB-ALTEERRA-DLO

L.A. Bouwman

J. Bloem

P.F.A.M. Römken

Alterra-rapport 454

Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, 2002

REFERAAT

L.A. Bouwman, J. Bloem, en P.F.A.M. Römken, 2002. *Interacties tussen zware metalen en bodemecosystemen: een overzicht van experimenteel werk. Een weergave van 10 jaar bodemecotoxicologisch onderzoek bij IB-AB-ALTERRA-DLO* Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport 454. 58 blz. 11 fig.; 8 tab.; 50 ref.

Zware metalen in de bodem kunnen het functioneren van bodem (micro)organismen op meerdere wijzen negatief beïnvloeden. Om zinvolle normen voor bodems af te leiden gericht op de bescherming van bodemecosystemen is het daarom noodzakelijk inzicht te hebben in deze beïnvloeding. De invloed van metalen kan daarbij direct zijn waarbij toxische effecten optreden voor bepaalde groepen. Daarnaast kan deze ook indirect zijn waarbij metalen bijvoorbeeld de gewasgroei beperken hetgeen weer het voedselaanbod aan organismen vermindert. In dit rapport wordt een samenvatting gegeven van systeemgericht ecotoxicologisch onderzoek dat in de loop der jaren op IB-DLO, AB-DLO en ALTERRA is verricht en dat zich richt op het ontrafelen van een of meerdere van de genoemde effecten. Er zal een overzicht gegeven worden van de belangrijkste aangetoonde mechanismen volgens welke metalen in de bodem een invloed hebben op het functioneren van bodemecosystemen.

Trefwoorden: ecotoxicologie, metalen, bodem, microorganismen, voedselweb

ISSN 1566-7197

Dit rapport kunt u bestellen door €18,- over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 454. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2002 Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte,
Postbus 47, NL-6700 AA Wageningen.
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: postkamer@alterra.wag-ur.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
1 Inleiding	9
1.1 Historie	9
1.2 Toxiciteit	9
1.3 Chemie en dimensies	9
1.4 Inhoud rapport	10
2 Het bodemecosysteem	11
2.1 Algemeen	11
2.2 Organismen: taxa, aantallen, massa en ruimtelijke verdeling	11
2.3 Processen	12
2.4 Stress, o.a. ten gevolge van contaminanten (Zn, Cu).	12
3 Relatie Zware metalen/Bodemecosystemen	15
3.1 Achtergrond van Rapport Slijkerman et al.	15
3.2 Lopend en recent verricht onderzoek	15
3.3 Chemische parameters	15
3.4 Biologische parameters	16
4 Uitgevoerd onderzoek (IB, AB, ALTERRA) naar de relatie tussen zware metalen en effecten op bodemorganismen	19
4.1 Algemeen	19
4.2 Veldwaarnemingen	19
4.3 Twee potproeven en een veldproef	22
4.3.1 Effect van EDGA op metaalmobiliteit en bodemecosysteem	23
4.3.2 Incubatie proef Cu verontreinigde bodems	26
4.3.3 Incubatie proef grond Maatheide/Lommel	27
4.3.4 Conclusies:	29
4.4 Microcosmos proeven	29
4.4.1 De licht koper gecontamineerde zandgrond	29
4.4.1.1 Inleiding	29
4.4.1.2 Experiment	30
4.4.2 De met koper gespikete ongecontamineerde zandgrond	33
4.4.2.1 Inleiding	33
4.4.2.2 Experiment	33
4.4.3 Conclusies:	36
5 Discussie en conclusie	37
5.1 Inleiding	37
5.2 Discussie	37
5.3 Conclusie	42
5.4 Kennisleemtes	44
Literatuur	47

Aanhangsels

1 Koper en Zink in de bodem	53
2 Chroom, Nikkel, Cadmium en Lood in de bodem	57

Woord vooraf

Een onderzoekstraject over essentiële metalen zoals koper en zink moet binnen een termijn van vier jaren, vóór 2004, leiden naar meer specifieke en verbeterde onderbouwing van bodemkwaliteitsnormen in Nederland. Om dit te realiseren is een gefaseerde aanpak ontwikkeld:

Fase 1

- A) het formuleren van een conceptueel kader dat vooral betrekking heeft op verscherpte normering van de onderzoekscondities bij biologische toxiciteitstesten. Dit onderdeel leidde tot het rapport 'Conceptueel kader voor de afleiding van ecotoxicologische risicogrenzen voor essentiële metalen' van Slijkerman et al. (2000).
- B) het inventariseren van recent uitgevoerd en lopend onderzoek en op basis daarvan identificeren van kennisleemtes. Dit is het onderwerp van het onderhavige rapport waarin vooral wordt ingegaan op de relatie zware metalen – microbiële bodemecosysteem.
- C) Het op basis van de punten A en B opstellen van een werkplan met betrekking tot aanvullend onderzoek.

Fase 2.

Het uitvoeren van onder fase 1 geformuleerd noodzakelijk onderzoek.

Fase 3.

Het afleiden van milieukwaliteitseisen voor essentiële elementen.

In het rapport van Slijkerman et al. (2000) is een 'stappenplan' beschreven dat moet gaan functioneren als een leidraad bij de afleiding van normen voor essentiële metalen. In het kort beslaat dit de volgende 6 stappen:

1. keuze milieutypen
2. vaststellen bijbehorende karakteristieke achtergrondwaarden
3. vaststellen bijbehorende karakteristieke organismen
4. vaststellen NEC waarden voor deze organismen
5. afleiden MTR (Maximaal Toelaatbaar Risico) voor deze organismen en systemen
6. afleiden VR (Verwaarloosbaar Risico)

Ofschoon een dergelijke meer gestructureerde aanpak ruimte laat om verschillen tussen ecosystemen en organismen naar voren te laten komen, zijn er ook discussiepunten die uitgewerkt moeten worden alvorens een dergelijke systematiek leidt tot nieuwe normen. Een aantal belangrijke discussiepunten die ook in belendende terreinen onderwerp van debat zijn (o.a. bij de in te voeren BodemGebruiksWaarden), zijn o.a.:

1. Afleiden van normen op basis van totaalgehalte i.p.v. bio-beschikbare fractie. Er zou wel een correctie voor bodemtype mogelijk zijn;
2. Toevoegen van metalen aan toetsmedia gevolgd door periode van 'veroudering'; dit om acute effecten te reduceren.

3. Gebruik van veiligheidsfactoren om de spreiding in de gevoeligheid van organismen te ondervangen.

Ofschoon de lijst van mogelijke 'tekortkomingen' altijd uitgebreid kan worden, waardoor het risico bestaat dat de meerwaarde van de aanpak -die er wel degelijk is- uit het oog verloren wordt, willen we in dit rapport met name een aantal studies toelichten die in de loop der jaren verricht zijn en waarbij een of meerdere van deze discussie punten aan de orde komen.

Wanneer ten opzichte van een bepaald organisme of groep van organismen de biobeschikbaarheid van een contaminant afgeleid moet worden (op basis waarvan dan weer een kritiek niveau afgeleid kan worden) is het essentieel de blootstelling-routes te kennen die uiteindelijk bepalen of een organisme daadwerkelijk aan een bepaalde concentratie wordt blootgesteld. Het is wel mogelijk dat de totale chemische beschikbaarheid (zoals bijvoorbeeld bepaald na een CaCl_2 extractie, meting van de metaal activiteit of zelfs na een verdunde zuur extractie) hoog is, maar dat de blootstelling van bepaalde organismen toch laag is omdat die beschikbaarheid niet spoort met de opname routes voor dat specifieke organisme.

Uit de proeven die hier gepresenteerd worden blijkt dan ook dat er voor (micro)organismen in terrestrische milieus zeer verschillende blootstellingroutes bestaan, afhankelijk van voedselsoort, voedselaanbod en uiteraard chemische beschikbaarheid. Het onderkennen van deze blootstellingroutes is derhalve cruciaal wanneer resultaten van testen aan specifieke organismen vertaald moeten worden van laboratorium naar ecosysteem, met complexe 'voedselwebben' en consumptiepatronen.

Anders dan in de aquatische milieus waar is aangetoond dat de chemische beschikbaarheid (uitgedrukt in de metaalactiviteit in combinatie met factoren als pH en hardheid) goed te koppelen is aan daadwerkelijke opname én toxiciteit met behulp van het zgn. Biotic Ligand Model (Santore et al., 2001) geldt dat voor terrestrische systemen met name de interactie beschikbaarheid - blootstelling - opname - effect veel complexer is als gevolg van de meer complexe structuur van het ecosysteem. Dit laatste wordt in dit rapport geïllustreerd aan de hand van metingen in pot- en veldstudies waarbij over het algemeen gebruik gemaakt is van niet-behandelde gronden, dwz gronden waaraan bij aanvang van de proef geen metalen meer zijn toegevoegd.

Het doel van dit rapport is om aan de hand van deze voorbeelden na te gaan welke interacties er bestaan tussen metalen in de bodem (zowel in de vaste fase als in oplossing in diverse speciaties) en de -onder veldomstandigheden- gemeten respons van verschillende groepen van organismen. De resultaten die in dit rapport beschreven worden kunnen gebruikt worden om na te gaan in hoeverre de door Slijkerman et al. (2000) voorgestelde methodiek kan resulteren in realistische beschermingsniveaus op ecosysteem niveau. Het is derhalve *niet* de bedoeling om alternatieve methodes te ontwikkelen, maar wel om de nu voorgestelde methodiek van enige kanttekeningen te voorzien. Verder vormt dit rapport een aanvulling op een eerdere inventarisatie die door Mesman (2000) is gemaakt in opdracht van VROM.

1 Inleiding

1.1 Historie

Reeds in de prehistorie veroorzaakte metaalbewerking plaatselijk, maar ten gevolge van water- en atmosferische stromingen ook diffuus over grote afstand, verhoging van gehalten aan zware metalen in bodemlagen, die nu nog goed traceerbaar zijn. Sinds de industriële revolutie en vooral gedurende de 20^{ste} eeuw zijn de emissies van zware metalen enorm toegenomen zodat zowel plaatselijk extreem hoge concentraties als diffuus over uitgestrekte gebieden lichtere concentratie verhogingen tot stand zijn gekomen.

1.2 Toxiciteit

Incidenten met betrekking tot de gewas-, dier-, volksgezondheid zoals het verdwijnen van vegetatie in de omgeving van metaalverwerkende industrie, het dood gaan van schapen die op zandgrond onder hoogspanningsleidingen grazen, of het ziek worden c.q. dood gaan van mensen die kwikgecontamineerde vis eten, vestigden de aandacht op de immer voortschrijdende verhoging van de zware metaalgehalten in bodems en gewassen in de geïndustrialiseerde wereld.

De aanwezigheid van specifieke vegetaties in gebieden waar ertsaders tot aan het aardoppervlak reiken zijn een aanwijzing dat aanpassing / selectie van vegetatie die bestand is tegen hoge gehalten aan zware metalen, mogelijk is; aangezien de geproduceerde vegetatiemassa ter plekke ook aan decompositie en mineralisatie onderhevig bleek, moest het bodemecosysteem toch ook ondanks de contaminatie wel min of meer normaal functioneren. Eenvormig zijn zulke vegetaties wel: zij bestaan vooral uit grassen, en bomen en struiken laten het vaak volledig afweten. Naast metaalresistente variëteiten van grassen als *Agrostis capillaris* en *Festuca rubra* kunnen plaatselijk ook resistente variëteiten van b.v. *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens* en *Viola calaminaria* talrijk zijn in gecontamineerde gebieden terwijl ook onder *Betula* species een zekere resistentie wordt aangetroffen. Hoe sterk het gehalte aan zware metalen in het leefmilieu van mensen in de geïndustrialiseerde wereld is toegenomen wordt gedemonstreerd door loodmetingen aan het menselijk gebeente waarbij een 48 keer verveelvoudiging in het gehalte werd vastgesteld in 20^{ste} eeuwse gebeente ($8,21 \mu\text{mol.kg}^{-1}$) vergeleken met pre-romeins materiaal ($0,17 \mu\text{mol.kg}^{-1}$).

1.3 Chemie en dimensies

De chemie van zware metalen wordt gecompliceerd door de situering van de metalen temidden van de bodemmatrix, waarbij een scala aan fysische, chemische, ruimtelijke, temporele, en biologische variabelen van grote invloed zijn op de chemische vorm en het functioneren van de zware metalen. Een relatief hoog gehalte aan zware metalen

in de grond kan zonder effect op gewas of bodemecosysteem blijven terwijl veel lagere gehalten in andere grond drastische effecten kunnen sorteren; ook kan onder verandering van de fysisch/chemische omstandigheden van de bodem, bij een onveranderd gehalte aan zware metalen, een toxische situatie non-toxisch worden en vice versa. Het is dan ook van groot belang fysische, chemische en biologische kenmerken van een grond in kaart te brengen wanneer interacties tussen zware metalen | bodemecosysteem | gewas onderzocht worden. In dit rapport wordt verslag gedaan van reeds verricht en lopend onderzoek naar het verband tussen zware metalen, bodem en het microbiële bodemecosysteem en van de effecten van gewasgroei hierop. Op basis hiervan worden suggesties gedaan over nog te verrichten onderzoek in verband met de onderbouwing van bij te stellen normering.

In de literatuur gehanteerde grootheden als mg.kg^{-1} of het aantal malen één miljard bacteriën per gram grond zijn moeilijk voorstelbaar. In dit rapport zal worden gepoogd deze grootheden wat visueler te maken. Bijvoorbeeld dat een gehalte van $0.3 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ grond, de gemiddelde concentratie in de bodem, betekent dat in de bouwvoor (25 cm) van 1 ha grond ($\approx 3.25 \cdot 10^6 \text{ kg}$) $\pm 1 \text{ kg Cd}$ voorkomt met een volume van $\pm 115 \text{ ml}$. Een 10x gemiddelde concentratie wordt als potentieel toxisch voor gewasgroei beschouwd: 3 mg kg^{-1} , 10 kg ha^{-1} , ofwel 1.15 L zuivere Cd. Bij een veel minder toxisch metaal als Zn bedragen deze grootheden respectievelijk 175 kg ha^{-1} , 25 L (gemiddelde) en 450 kg ha^{-1} , 65 L (potentieel toxisch). De atoommassa's van Cd en Zn zijn respectievelijk 112 en 65.

1.4 Inhoud rapport

In dit rapport dat aansluit op het rapport Slijkerman, worden achtereenvolgens besproken:

1. het bodemecosysteem: organismen en processen,
2. de relatie zware metalen | microbiële bodemecosysteem, met name zoals die uit lopend en recent onderzoek naar voren komt,
3. de uit het voorgaande gebleken kennisleemtes, en de relatie tot bioassays (Slijkerman).

In twee aparte aanhangsels komt verder nog een korte beschouwing over de gehalten, speciatie en rol van Cu en Zn (Aanhangsel 1) en van Cr, Ni, Cd en Pb in de bodem (Aanhangsel 2).

2 Het bodemecosysteem

2.1 Algemeen

Het microbiële bodemecosysteem is gehuisvest in het labyrint van interstitiele ruimten dat zich bevindt tussen primaire bodempartikels (zandkorrels, kleiplaatjes) en aggregaten van deze partikels. Het bestaat uit een interactief netwerk van organismen dat als belangrijkste activiteit de afbraak van bodemorganische stof (gewasresten, humus, strooisel) verzorgt waarbij mineralen vrijkomen die weer als nutriënten voor de vegetatie dienen. Bovendien draagt het bodemecosysteem bij aan structuurvorming van de bodem die weer de fysische geschiktheid van de grond voor plantengroei bevordert. Behalve organismen met positieve betekenis voor plantengroei maken ook gewasbelagers deel uit van het bodemecosysteem: fytopathogene bacteriën, schimmels, protozoën en nematoden.

2.2 Organismen: taxa, aantallen, massa en ruimtelijke verdeling

In tabel 1 staan de belangrijkste bodembewonende organismen, hun dichtheden, massa en de massa C per ha bouwvoor (25 cm).

Tabel 1. Gemiddelde aantallen organismen per g grond en biomassa als kg C- en kg versgewicht per ha (in de bouwvoor, 0 - 25 cm).

Organismen	Aantal. per gram grond	kg C. ha ⁻¹	Versgewicht ¹ ha ⁻¹
Bacteriën	1-5 x 10 ⁹	250	2500
Schimmels	5-250 meter	50	500
Protozoën	10 ⁴ - 10 ⁶	20	200
Nematoden	10 - 10 ²	1	10

¹ op basis van 25% droge stof en 10% C

Ter vergelijking: een vers gewicht van 2500 kg bacteriën per hectare komt overeen met vier ondergrondse koeien, en 10 kg nematoden met 5 konijnen. Behalve de wormen die zelf hun ruimte in de bodem creëren passen alle overige organismen zich aan aan de geboden ruimte en structuur. Door het uitscheiden van stofwisselingsproducten die het samenkiten van bodemdeeltjes bevorderen dragen naast wormen ook overige organismen bij aan de bodemstructuurvorming. Afgezien van wormen, kevers, pissebedden etc., die in dit rapport niet meer ter sprake komen, wordt het bodemecosysteem bevolkt door enerzijds microflora (bacteriën, schimmels, actinomyceten) en anderzijds door (micro)fauna (protozoën, nematoden, arthropoden, enchytraeiden) die de microflora begraast en elkaar onderling predeert. Deze begrazing en predatie zijn van essentiële betekenis voor de continuïteit van de decompositie- en mineralisatieprocessen doordat bijvoorbeeld stagnatie ten gevolge van nutriëntengebrek wordt voorkomen of verminderd: bij de vertering van micro-organismen en van grotere prooi komen altijd essentiële nutriënten vrij. De processen van decompositie, mineralisatie, begrazing en predatie spelen zich

enerzijds af in zgn. hotspots waar zich lokaal hoge concentraties vers substraat (wortels, gewasresten) bevinden en ten gevolge hiervan ook grote aantallen organismen, anderzijds meer diffuus waar het de afbraak van homogener verdeelde oude organische stof en humus betreft en de afbraak van DOC in het bodemvocht; de veel tragere processen waar oudere organische stof aan onderworpen zijn accumuleren ook veel minder hoge dichtheden organismen dan de snelle hotspotprocessen. De organismen worden vooral aangetroffen in de waterfilm rond de bodempartikels en zijn veel minder talrijk in niet geadsorbeerd bodemvocht. De belangrijkste bacterievore organismen, amoeben en nematoden, kunnen zich uitsluitend voortbewegen over vaste oppervlakten in de waterfilm, waarbij de oppervlaktespanning hen tegen het vaste oppervlak aandrukt. Hoewel een gram grond $10^9 - 10^{10}$ bacteriën bevat betekent dit niet dat de oppervlakte van de vaste fractie dichtbevolkt is met bacteriën. Gemiddeld is niet meer dan 0.5% van het totale oppervlak begroeid. In fijn getextureerde grond bedraagt het oppervlak per gram tot 1000 m^2 , wat aangeeft dat voor iedere bacterie een uitgestrekt oppervlak aanwezig is. De meeste bacteriën komen echter geaggregeerd voor in hoge dichtheden nabij random gedistribueerd substraat.

2.3 Processen

Het bodemecosysteem is in de eerste plaats verantwoordelijk voor de afbraak van zowel boven- als ondergronds primair en secundair geproduceerde organische stof. Waar deze afbraak stagneert doet zich ophoping, bijvoorbeeld veenvorming, voor. Decompositie en mineralisatie van organische stof is ook verantwoordelijk voor structuurvorming in de bodem en het beschikbaar komen van mineralen voor o.a. plantengroei. De enorme variatie aan (primair) gevormde organische stoffen, de gradiënt in weerstand tegen afbraak van deze stoffen en de verschillende vormen van distributie (bereikbaarheid) in de grond, brengen met zich mee dat een grote diversiteit aan micro-organismen nodig is om afbraak van organische stof te bewerkstelligen. De diversiteit aan micro-organismen en hun specifieke ruimtelijk voorkomen is er weer voor verantwoordelijk dat er een grote diversiteit aan microbivoren en hun predatoren in de bodem aanwezig is. In het algemeen worden makkelijk afbreekbare (verse) organische substraten door bacteriën afgebroken terwijl bij stoffen met toenemende weerstand tegen afbraak ook schimmels een rol gaan spelen. Er bestaan dus min of meer specifieke combinaties van type organische stof/micro-organismen consortium/microbivoren consortium/predatoren consortium.

2.4 Stress, o.a. ten gevolge van contaminanten (Zn, Cu).

Het uitermate complexe en gebalanceerde bodemecosysteem wordt in de natuur en onder invloed van menselijk handelen blootgesteld aan vele vormen van stress, fysisch en/of chemisch van aard. Verhoging van gehalten aan essentiële micronutriënten als Cu en Zn is een van de vormen van stress waarbij de marge tussen gebrek en toxiciteit ten opzichte van gewasgroei en bodemecosysteem relatief klein is. Belangrijke vragen in dit verband zijn:

1. Is in het algemeen een vegetatie gevoeliger of ongevoeliger voor verhoogde gehalten aan contaminanten dan het bodemecosysteem?
2. Welke organismen en processen binnen het bodemecosysteem zijn het gevoeligst voor contaminanten en hoe werkt deze gevoeligheid uit op het gehele systeem?
3. Bij welke concentraties contaminanten, en op welke wijze treden adaptatie van organismen en systemen en selectie van resistente typen op en tegen welke prijs?

3 Relatie Zware metalen/Bodemecosystemen

3.1 Achtergrond van Rapport Slijkerman et al.

In het rapport Slijkerman wordt een nieuwe normering van toxiciteitstesten geïntroduceerd die gericht is op een naar milieutype gedifferentieerde aanpak. Als milieutype worden onderscheiden: zandbodems, kleibodems, sedimenten, voedsel-arm water, overig oppervlaktewater en zout water. Uitgangspunt bij toxiciteitstesten is dat aan een natuurlijk medium met karakteristieke achtergrondgehalten aan zware metalen het effect van een additie van zware metalen (toegevoegd risico) op een testorganisme wordt gemeten en de maximaal acceptabele toevoeging op grond van de test wordt geschat. De aangescherpte criteria komen er op neer dat:

- een proeforganisme afkomstig behoort te zijn uit (eventueel gekweekt is in) het milieutype dat onderzocht wordt,
- de test plaatsvindt in dat natuurlijke medium waarvan de achtergrond concentraties van zware metalen karakteristiek zijn voor het milieutype/ecosysteem waarvoor een norm wordt ontwikkeld
- bij toevoeging van zware metalen aan het testmedium een incubatie/verouderingsperiode wordt aangehouden waardoor een evenwicht tussen speciatievormen van zware metalen (achtergrond en toegevoegd) tot stand komt
- voor het te bepalen geen effectniveau het totale teruggemeten gehalte wordt bepaald.

3.2 Lopend en recent verricht onderzoek

Anders dan het type onderzoek zoals besproken in Slijkerman et al. bestaat het onderzoek dat in dit rapport de revue passeert uit veldonderzoek aan gecontamineerde gronden en uit potproeven met planten en microkosmosproeven met gecontamineerde grond waarbij soms sprake was van manipulatie van de grond. In alle gevallen werd een breed scala aan fysische-, chemische- en biologische (organismen en processen) parameters bepaald en aan elkaar gerelateerd. In het onderzoek wordt ook nagegaan of er een hiërarchie in gevoeligheid is van biologische parameters ten opzichte van gradiënten in zware metalen concentraties en welke de waarde is van individuele biologische parameters of bepaalde combinaties van parameters. Ook komt de herstelbaarheid van toxische situaties en het toxisch worden van niet toxische situaties onder invloed van fysische/chemische/biologische manipulaties aan de orde.

3.3 Chemische parameters

Zoals reeds uiteengezet, is veel eerder dan het absolute gehalte van de zware metalen, de beschikbaarheid, gemeten bijvoorbeeld als het gehalte na extractie van de grond met 0.01M CaCl_2 , van biologische betekenis. Dit geldt met name voor organismen die

zware metalen opnemen vanuit het bodemvocht, of waaraan zware metalen adsorberen vanuit het bodemvocht. Het gaat dan om de species zoals Zn^{++} en Cu^{++} , of bij hogere pH (> 6.9) ook om $ZnOH^+$ of $Cu(OH)_2^0$ en de nalevering hiervan na desorptie van de uitwisselbare fractie. Ook de opnamesnelheid en interne speciatie en lokalisatie binnen het organisme speelt een rol in verband met het begrip biologische beschikbaarheid. Het evenwicht tussen de verschillende species van een zwaar metaal wordt vooral bepaald door pH, totale zoutconcentratie in de bodemoplossing (\cong EC), de DOC-concentratie; de gehalten aan organische stof, klei (lutum), Fe- en Mn-oxiden en carbonaten en fosfaten, bepalen de bindingscapaciteit voor zware metalen, zowel adsorptief (\Leftrightarrow beschikbaarheid) als precipitatief (totaal gehalte). Welk deel van het adsorptiecomplex door zware metalen bezet wordt hangt af van factoren als pH, EC, eH etc. Het is duidelijk dat bij lage pH een veel groter deel van de adsorptiecapaciteit (CEC) wordt bezet door H^+ -ionen, dan bij hoge pH en dientengevolge de concentraties zware metalen in oplossing veel hoger zijn bij lage pH, met daaruit voortvloeiende biologische effecten. Het voorgaande maakt duidelijk dat voor het nauwkeurig karakteriseren van grond in fysisch-chemisch opzicht in relatie tot speciatie van zware metalen en de effecten hiervan op de te meten biologische parameters, de volgende parameters gemeten dienen te worden: de texturele samenstelling, het organische stof gehalte, het fosfaat-, carbonaat- en Fe/Mn-oxide gehalte, pH, EC, eH, en DOC- en Ca^{++} -concentratie in de bodemoplossing, en de totaal- en 0.01M $CaCl_2$ -geëxtraheerde gehalten aan zware metalen. In plaats van $CaCl_2$ kunnen andere extractiemiddelen worden gebruikt: KNO_3 , NH_4 -acetaat, EDTA etc. Bij bepalingen aan veldmonsters en aan grond uit laboratorium-experimenten wordt dikwijls volstaan met analyses van geëxtraheerd bodemvocht, in situ gewonnen met behulp van kunstwortels, of destructief d.m.v. centrifugatie van grond. In het bodemvocht worden dan ten minste pH, EC, DOC- en zware metalen concentraties inclusief [Ca^{++}] gemeten. Activiteiten (Zn^{++} , Cu^{++}) kunnen met ionspecifieke elektrodes gemeten of modelmatig op grond van andere bodemparameters berekend worden.

3.4 Biologische parameters

Afbraak van organische stof en mineralisatie van voedingsstoffen zijn de belangrijkste functies van bodemecosystemen. Deze processen zijn echter moeilijk te meten omdat zij traag verlopen, zodat ook effecten van contaminanten op deze processen slechts zeer traag zichtbaar worden.

Door hun primaire rol bij decompositie en mineralisatie van organische stof zijn bodemmicro-organismen en hun activiteit de belangrijkste te meten biologische parameters, gevolgd door de grazers op micro-organismen (protozoën, nematoden etc.) en hun predatoren. Aantallen bacteriën en hun afmetingen worden bepaald door middel van microscopische tellingen en metingen aan grondpreparaten waarin de organismen zijn gekleurd met een specifieke fluorescerende verbinding (Bloem et al., 1995 b,c). Uit het aantal en de afmetingen van de bacteriën worden het biovolume en de biomassa berekend met behulp van een confocale laserscan microscoop en automatische beeldverwerking (Bloem et al., 1995 a).

Schimmels worden eveneens gemeten in grondpreparaten na kleuring met een voor hen specifieke fluorescerende verbinding waarna de totale hyfenlengte gemeten wordt met een epifluorescentiemicroscop en getransformeerd naar biomassa (Bloem et al., 1995 b). Een specifieke kwantitatieve meting voor actinomyceten is er niet, zodat daarvoor nog op plaattellingen moet worden teruggevallen die slechts relatieve aantallen opleveren. Actinomyceten zijn bacteriën, en worden meegeteld bij de microscopische metingen. Functionele diversiteit van de bacteriële populatie wordt gemeten met behulp van de Biolog-methode waarmee bepaald wordt hoeveel en welke van 95 aangeboden substraten worden benut door de bacteriën (Garland, 1996 a en b). Met Denaturatie-Gradient Gel Electroforese (DGGE) wordt een gedetailleerd beeld van de genetische diversiteit van bacteriële populaties verkregen, wat met traditionele kweek(plaat)methoden niet mogelijk is omdat hoogstens 10 % van het bacteriële soortenbestand in een grondmonster op deze wijze kweekbaar is. Bij de DGGE-methode wordt bacterieel bodem-DNA met behulp van toegevoegde primers vermenigvuldigd en vervolgens op een gel in een elektrisch spanningsveld gebracht waarmee een specifiek bandenpatroon wordt gecreëerd dat de genetische diversiteit van de bacteriepopulatie weerspiegelt (Muyzer et al., 1993). Protozoën worden gekwantificeerd met behulp van de most probable number (MPN) methode (Darbyshire et al., 1974), waarbij in een verdunningsreeks aan een grondsuspensie bacteriën als voedsel voor protozoën worden toegevoegd en gecheckt wordt bij welke verdunning geen protozoën (flagellaten, amoeben, ciliaten) meer worden aangetroffen na 2 en 4 weken incubatie bij 18°C. Nematoden worden met behulp van elutriatie ('s Jacob and Van Bezooijen, 1984) uit grond geïsoleerd, onder de stereomicroscop gekwantificeerd en onder de microscoop met sterke vergroting geïdentificeerd (taxa, voedingstypen).

De bodemademhaling wordt gemeten als zuurstofconsumptie en/of koolzuurproductie door middel van gaschromatografie na incubatie van een afgesloten grondmonster tijdens een periode van 6 weken bij 20°C. Hoewel deze meting de som geeft van de ademhaling van alle organismen in het monster moet toch minstens 90% van de gemeten waarden worden toegeschreven aan microbiële, vooral bacteriële activiteit. In dezelfde incubatie kan ook de N-mineralisatie worden bepaald: $N_{6\text{weken}} - N_{0\text{weken}} (\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-)$. De groeisnelheid van bacteriën wordt bepaald door de inbouw van radioactief ^3H -thymidine en ^{14}C -leucine in DNA(T) en in eiwit (L) te meten in één uur incubatie (Michel en Bloem, 1993).

4 Uitgevoerd onderzoek (IB, AB, ALTERRA) naar de relatie tussen zware metalen en effecten op bodemorganismen

4.1 Algemeen

Bij onderzoek naar de relatie zware metalen/bodemecosysteem werden monsters uit gecontamineerde grond gebruikt in een drietal soorten experiment te weten:

1. metingen in veldbodems, waarbij alle relevante chemische en biologische parameters gemeten zijn,
2. potproeven en een veldproef, zowel in aanwezigheid van planten als ook zonder begroeiing, en,
3. microcosmosproeven.

4.2 Veldwaarnemingen

Metingen werden verricht aan monsters afkomstig uit terreinen die als onbedoeld gevolg van industriële activiteit of doelbewust ten behoeve van een experiment waren gecontamineerd met Cu, Zn Cd, Pb, Cr, Ni, of een mengsel hiervan. Van een drietal terreinen met onderling een gradiënt in zwaarte van belasting met overigens verschillende zware metalen worden in dit rapport analyseresultaten vermeld en toegelicht:

1. een relatief lichte, bewust aangebrachte, Cu-verontreiniging te Wageningen in een veldproef op een akkerbouw zandgrond,
2. een matig zware Ni- en Cr-verontreiniging bij een galvanisch bedrijf op een gras-zandgrond en,
3. een zeer zware Zn-verontreiniging rondom een voormalige zinkfabriek te Lommel (Kempen/België) in een onbegroeide zandvlakte (135ha) die een geredieerd en begroeid (gras) perceel van 3ha omsluit (Maatheide).

De belasting met zware metalen op de 3 locaties bedroeg voor Cu 25-200 mg kg⁻¹ (Wageningen), Ni 2800 mg kg⁻¹, Cr 430 mg kg⁻¹ (Gorredijk) en voor Zn 4000 - 16000 mg kg⁻¹ (Lommel). Voor Cu variëren de waarden in het proefveld van gangbaar achtergrondniveau tot iets boven de Nederlandse interventiewaarde van 190 mg kg⁻¹; de verontreiniging met Ni ligt ver boven de interventiewaarde van 210 mg kg⁻¹ en die van Cr ligt iets boven de interventiewaarde van 380 mg kg⁻¹; de zwaarste verontreiniging (met Zn) ligt een tiental malen hoger dan de interventiewaarde van 720 mg kg⁻¹.

Enkele belangrijke fysisch-chemische karakteristieken van de metalen staan in tabel 2a, de resultaten van de biologische bepalingen in tabel 2b. Als referentiemonsters zijn bij de Cu-gecontamineerde grond onbehandelde plots uit het proefveld bemonsterd, bij de Ni/Cr-gecontamineerde grond zijn monsters genomen uit een

naburig ongecontamineerd perceel en bij het Zn etc. gecontamineerde object uit het geremedieerde plot.

Tabel 2a. Basisgegevens zware metalen; alles op droge stof basis en in mg kg⁻¹ (o.a. Alloway, 1990)

Element	Gangbaar bereik gehalten bodem	Kritisch ¹ gehalte bodem	Nederlandse interventie waarde bodem	Gangbaar bereik gehalte plant	Kritisch ¹ gehalte plant
Cadmium	0.01-20	8	12	0.1 - 2.4	30
Chroom	5-1500	100	380	0.03 - 14	30
Koper	2-250	125	190	5 - 20	100
Nikkel	2-750	100	210	0.02 - 5	100
Lood	2-300	400	530	0.2 - 20	300
Zink	1-900	400	720	1 - 400	400

¹ Kritisch gehalte bodem/plant: boven deze gehalten moet rekening gehouden worden met toxiciteit. Bij de kritische gehalten in de plant moet bedacht worden dat de tolerantie range erg groot kan zijn afhankelijk van de gewassen.

Uit tabel 2b blijkt dat bij lichte contaminatie met Cu weliswaar de meeste gemeten biologische parameters negatief zijn beïnvloed, dat echter alleen de bacteriële groeisnelheid, gemeten als thymidine/leucine inbouwsnelheid, significant lager is. In de zwaar Ni/Cr- en zeer zwaar Zn-gecontamineerde monsters zijn naast de bacteriële groeisnelheid ook de andere activiteitsparameters, de respiratie (Zn) en de N-mineralisatie (Zn), de bacterie- en schimmel (Zn)-biomassa, en de aantallen (~biomassa) protozoën en nematoden, inclusief taxa en/of functionele groepen, significant gereduceerd. De zwaarste reductie (%) en de laagste parameterwaarden werden gevonden bij de grootste overschrijding van de interventiewaarde, in het Zn-gecontamineerde monster uit Lommel. Ook de genetische en de functionele diversiteit, hoewel aanzienlijk maar niet significant gereduceerd in de Cu-verontreinigde grond, waren significant gereduceerd in de Zn-verontreinigde grond.

Tabel 2. Ecologische parameters (uitgedrukt per gram droge grond) in met zware metalen verontreinigde grond. De reductie in de verontreinigde grond (+) wordt gegeven als percentage van de waarde in de schone grond (-)

	Verontreiniging											
	160 mg Cu kg ⁻¹			2800 mg Ni kg ⁻¹ / 430 mg Cr kg ⁻¹			10,000 mg Zn kg ⁻¹					
	-	+	Reductie (%)	-	+	Reductie (%)	-	+	Reductie (%)			
Bacteriën												
thymidine inbouw (pmol g ⁻¹ h ⁻¹)	5,3	1,3	76 *	10,0	1,8	82 *	8,6	1,3	85 *			
leucine inbouw (pmol g ⁻¹ h ⁻¹)	82	47	43 *	122	41	66 *	72	8	89 *			
biomassa (µg C g ⁻¹)	69	66	4	338	116	66 *	77	9	88 *			
aantal afgebroken verbindingen (Biolog)	80	50	38	N.B.	N.B.	N.B.	83	45	46 *			
aantal DNA banden (DGGE)	50	42	16	49	48	2	50	31	38 *			
Schimmeldraden (m g ⁻¹)	4,8	3,2	34	N.B.	N.B.	N.B.	5,4	0,0	100 *			
Protozoën (10 ³ g ⁻¹)	42	38	9	N.B.	N.B.	N.B.	73	3	96 *			
flagellaten (10 ³ g ⁻¹)	36	33	9	N.B.	N.B.	N.B.	10	1	90 *			
amoeben (10 ³ g ⁻¹)	5,6	5,0	11	N.B.	N.B.	N.B.	65,0	2,0	97 *			
Nematoden (aantal 100 g ⁻¹)	3721	3019	19	1956	161	92 *	3416	13	100 *			
bacterievoren (aantal 100 g ⁻¹)	1679	1476	12	1095	130	88 *	1890	3				
fungivoren (aantal 100 g ⁻¹)	557	597	-7	137	3	98 *	1526	10				
herbivoren (aantal 100 g ⁻¹)	1380	918	33	567	29	95 *						
omnivoren/predatoren (aantal 100 g ⁻¹)	105	28	73	156	0	100 *						
Respiratie (mg CO ₂ kg ⁻¹ week ⁻¹)	65	44	33	N.B.	N.B.	N.B.	196	2,4	99 *			
N-mineralisatie (mg N kg ⁻¹ week ⁻¹)	2,2	2,0	10	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.			

* Significant verschil (P<0.05)

Uit deze veldwaarnemingen blijkt dat er in met zware metalen verontreinigde bodems een duidelijke afname in het functioneren en de biodiversiteit van de micro-organismen kan worden gemeten. Al bij een relatief lichte koperverontreiniging, net boven de interventiewaarde, bleek de bacteriële groeisnelheid significant gereduceerd, terwijl de aantallen | biomassa van bacteriën, schimmels en microbivoren, en ook de bacteriële diversiteit en functionaliteit, de C- en N-mineralisatie, weliswaar gereduceerd waren, maar niet significant. De sterke, maar niet significante reductie van herbivore nematoden zal eerder door ten gevolge van de koperlast verminderde gewasgroei zijn veroorzaakt, dan door rechtstreekse toxiciteit van het Cu. Metingen aan Ni/Cr-verontreinigde grond tonen aan dat de bacteriële biomassa en -groeisnelheid significant kunnen afnemen terwijl de genetische diversiteit op peil blijft. In de onbegroeide, zwaar Zn-gecontamineerde grond van de Maatheide is de biomassa van alle organismen gering, hun activiteit nihil, maar blijken parameters die gemeten worden na substraattoevoeging, BIOLOG en DGGE weliswaar significant, maar relatief toch slechts bescheiden te zijn gereduceerd; dit indiceert dat de bacteriële restpopulatie die in de grond aanwezig is bij substraatadditie in die mate divers en vitaal blijkt dat herstel goed denkbaar lijkt. De resultaten van de biologische bepalingen aan het gereduceerde proefveld binnen de Maatheide (derde kolom in tabel 8) tonen aan dat dat herstel ook daadwerkelijk plaats vond.

Conclusie:

Uit de veldwaarnemingen blijkt, dat bacteriële groei en predatore/omnivore nematoden de gevoeligste biologische parameters zijn (Cu) en sterk reageren bij een lichte contaminatie van de grond. De overige parameters zoals aantallen/biomassa organismen en een globale activiteitsparameter als bodemademhaling reageren pas significant bij relatief zware contaminatie (Ni/Cr) en voor significante reductie van de bacteriële diversiteit is een zeer zware contaminatie (Zn) nodig.

4.3 Twee potproeven en een veldproef

Ten behoeve van inzichten in de interacties tussen bodemecosysteem, zware metalen en gewasgroei werden experimenten uitgevoerd in met zware metalen gecontamineerde grond, afkomstig uit verontreinigde veldlocaties: licht Zn- en Cd-belaste zandgrond uit Budel (potproef), matig-licht Cu-verontreinigde zandgrond uit het eerder genoemde Wageningse veldexperiment (potproef) en zwaar Zn – (Cu, Pb, Cd) verontreinigde zandgrond uit Lommel (veldproef).

De grond uit Budel bevatte 2 mg Cd. kg⁻¹ en 200 mg Zn.kg⁻¹, gehalten die dus ruim onder de Nederlandse interventiewaarden liggen. De Cu-verontreinigde grond was afkomstig uit een plot dat 13 jaar voordien een additie van 750 kg Cu.ha⁻¹ had ontvangen en waar met behulp van CaCO₃-additie de pH op 4.7 werd gestabiliseerd en waarin 170 mg Cu.kg⁻¹ werd teruggemeten; het kopergehalte in dit plot ligt dus juist beneden de Nederlandse interventiewaarde. In het gereduceerde proefveld op de vooral Zn-verontreinigde Maatheide werden Zn-gehalten van 6600 (range: 2000-16000) mg kg⁻¹ gemeten, en bovendien gehalten aan Cd van 30 mg kg⁻¹, Cu 800 mg kg⁻¹ en Pb 1200 mg kg⁻¹. Deze gehalten liggen allemaal ver boven de Nederlandse

interventiewaarden. Het proefveld werd in 1990 ingericht en ten behoeve van biologisch bodemonderzoek in 1996 bemonsterd. Bij de inrichting van het veld werd, voorafgaande aan de inzaai van Zn-tolerante variëteiten van de grassen *Agrostis capillaris* en *Festuca rubra*, 120 ton beringiet (gemodificeerd aluminiumsilicaat) en 100 ton gecomposteerd stedelijk afval ingeplougd in de bovenste 35 cm van het veld. Beringiet heeft een groot immobiliserend vermogen ten opzichte van zware metalen, dat vooral op een pH verhogend effect en bovendien op eigen sorberend vermogen berust. Additie van compost diende voor nutriëntenvoorziening van de zeer arme zandgrond en ter verhoging van het organische stofgehalte van de stuifgevoelige bodem.

4.3.1 Effect van EDGA op metaalmobiliteit en bodemecosysteem

Met de zeer licht Cd/Zn-gecontamineerde grond uit Budel werd een potexperiment met gras (mengsel 4 soorten, $\pm 70\%$ *Lolium perenne*), lupine (*Lupinus hartwegii*) en gele mosterd (*Sinapis alba*) uitgevoerd waarbij de zware metalen werden gemobiliseerd door toevoeging van EDGA (glycoetherdiaminetetraazijnzuur) aan de grond.

Bestudeerd werden:

- a) de concentraties zware metalen in het poriewater;
- b) de gehalten zware metalen in wortel en loof en de totale extractie van zware metalen door het loof;
- c) de effecten op het bodemecosysteem.

De additie van EDGA verhoogde de concentraties van zware metalen in de bodemoplossing aanzienlijk: Zn x7, Cd x40, Cu x235 en Pb x310 (Tabel 3), gemiddeld voor de 3 gewassen. Ook de opname van zware metalen door de gewassen werd aanzienlijk vergroot door de EDGA-additie, echter niet proportioneel aan de concentratieverhoging in de bodemoplossing en met uitzondering van de opname van Zn door lupine. Ten gevolge van de EDGA-additie werd de gewasproductie van gele mosterd en lupine (wortel en loof) tot 50% gereduceerd, die van gras niet. De oorzaak van de reductie, EDGA en/of zware metalen, is niet bekend. In verband met het onderwerp van dit rapport is het van belang te beseffen dat in dit potexperiment het bodemecosysteem schoksgewijs werd blootgesteld aan een enorme toename van de concentratie van zware metalen in de bodemoplossing die echter weer gebufferd werd door de EDGA. Ondanks deze adsorptie aan EDGA nam de opname van zware metalen door de gewassen sterk toe en vond in de plant een sterke redistributie van de metalen richting loof plaats; dit duidt erop dat het EDGA mogelijk ook werkzaam is in de plant en dat de zware metalen niet slechts als ion, maar ook geadsorbeerd aan het EDGA worden opgenomen door de plant. Ten opzichte van de bodemorganismen zouden vergelijkbare mechanismen mogelijk kunnen zijn: enerzijds worden de organismen blootgesteld aan een acute verhoging van de concentraties zware metalen in oplossing ten gevolge van de EDGA-additie, anderzijds werden de zware metalen in oplossing grotendeels geadsorbeerd aan het EDGA en nam hun activiteit (Cu^{++} -conc.) waarschijnlijk zelfs af. Onder invloed van de EDGA-additie nam de bacteriële biomassa met een factor 2.6 toe, de bacteriële

groeisnelheid gemeten als thymidine- inbouw nam met 20% toe, en nam, gemeten als leucine inbouw met 20% af (Tabel 4).

Tabel 3. Concentraties zware metalen en opgeloste organische stof, pH en EC in de bodemoplossing van grond uit Budel, voor en na additie van citroenzuur en van EDGA aan gras, lupine en gele mosterd in een potproef (DOC, Ca in mg l⁻¹, zware metalen in µg l⁻¹)

		<i>Samenstelling bodemoplossing voor additie</i>							
13-04-1999		pH	EC	DOC	Ca	Cd	Cu	Pb	Zn
Gras	gem.	4.9	nd	68	38	27	24.7	37.8	1832
	S.D.	0.2	-	23	22	15	14.9	21.9	844
Lupine	gem.	4.2	nd	41	173	128	11.0	42.5	9166
	S.D.	0.1	-	9	77	80	2.3	17.9	4172
Gele mosterd	gem.	4.5	nd	39	239	138	6.8	22.2	8208
	S.D.	0.3	-	3	123	83	3.0	17.5	4322

		<i>Samenstelling bodemvocht na additie citroenzuur</i>							
20-04-1999		pH	EC	DOC	Ca	Cd	Cu	Pb	Zn
Gras	gem.	4.8	1207	183	135.9	84.5	17.9	209.0	6007
	S.D.	0.5	869	99	57.4	51.6	9.1	207.4	3699
Lupine	gem.	4.7	1598	327	156	95	24	309	6917
	S.D.	0.4	1136	200	76	43	11	244	2195
Gele mosterd	gem.	4.7	1507	120	141	88	18	52	5376
	S.D.	0.5	1530	106	132	77	12	34	3869

		<i>Samenstelling bodemvocht na additie EDGA</i>							
20-04-1999		pH	EC	DOC	Ca	Cd	Cu	Pb	Zn
Gras	gem.	4.7	1450	1376	116	4139	4176	12974	49788
	S.D.	0.1	561	923	60	1281	898	6187	22044
Lupine	gem.	4.3	2266	744	138	3303	3477	10559	38085
	S.D.	0.1	1316	605	124	500	559	4855	9154
Gele mosterd	gem.	4.4	3339	765	361	4254	2825	8301	40859
	S.D.	0.2	1522	771	235	1964	1403	6370	19829

Tabel 4. Bacteriële biomassa (in µg C g⁻¹ grond) en activiteit (in pmol g⁻¹ grond h⁻¹) in potten met grond uit Budel onder lupine na additie van EDGA en citroenzuur

Behandeling	Microbiële biomassa	Leucine-Incorporatie	Thymidine-incorporatie
Nul	17 ± 17	1.09 ± 0.03	0.20 ± 0.03
0,01 M EDGA	50 ± 12	0.81 ± 0.16	0.26 ± 0.03
0,01 M Citroenzuur	60 ± 38	0.94 ± 0.04	0.26 ± 0.05
0,005 M EDGA/Citroenzuur	53 ± 34	0.88 ± 0.01	0.22 ± 0.05
0,01 M EDGA 2X	29 ± 22	0.72 ± 0.06	0.20 ± 0.04
0,01 M Citroenzuur 2X	65 ± 2	1.16 ± 0.03	0.21 ± 0.04
0,005 M EDGA/Citroenzuur 2X	41 ± 38	0.75 ± 0.01	0.27 ± 0.04
0,02 M EDGA	45 ± 16	0.82 ± 0.02	0.26 ± 0.1

Onder invloed van de EDGA-additie nam onder de drie gewassen de toename van de bacterievore en fungivore nematoden ten gevolge van de gewasgroei sterk af (Tabel 5); het sterkst onder gras dat zelf ten gevolge van de EDGA additie geen

groei-reductie onderging, en waar de dichtheden bacterievoren en fungivoren daalden tot onder de initiële dichtheden vóór inzaai.

Tabel 5. Aantallen nematoden per 100 g grond, verdeeld over vier trophische groepen, in Budel-grond onder gras, lupine en gele mosterd en in grond zonder plant (0), zonder (I) resp. met (II) 0.02 M EDGA additie, na een groeiperiode van 12 weken

Behandeling:	braak	Gewas					
		Gras		Lupine		Gele mosterd	
		- EDGA	+EDGA	- EDGA	+EDGA	- EDGA	+EDGA
Bacterievoren	430	1580	165	5125	1885	7440	1605
Fungivoren	90	200	60	710	60	1470	550
Herbivoren	340	1200	2025	420	355	1990	1145
Omnivoren	40	20	0	0	0	150	0
<i>Totaal</i>	900	3000	2250	6250	2300	11050	3300

Gemiddeld lagen na EDGA additie de aantallen bacterievoren 75% en de fungivoren 70% lager dan in de onbehandelde potten. De toename van herbivore nematoden onder gras was na EDGA additie 2 maal zo sterk als zonder EDGA en was onder lupine vrijwel niet en onder gele mosterd met de helft afgenomen na EDGA additie. Hierbij dient er mee rekening gehouden te worden dat onder lupine ook zonder EDGA additie vrijwel geen toename van herbivore nematoden plaatsvond en de reductie van de toename van herbivoren onder gele mosterd na EDGA additie vooral het gevolg zal zijn geweest van de reductie van de gewasgroei. De waarneming dat de abrupte mobilisatie van zware metalen door de EDGA additie de bacteriële biomassa niet negatief treft maar een vergroting hiervan bewerkstelligt bij min of meer gelijkblijvende bacteriële groeisnelheid zou mede het gevolg kunnen zijn van gereduceerde graasdruk van bacterievore nematoden. Waarom na EDGA additie bacterievore nematoden in absolute (gras) of relatieve (lupine, gele mosterd) zin aanzienlijk afnamen, terwijl herbivoren versterkt (gras) toenamen, niet beïnvloed werden (lupine) of t.g.v. gewasgroei-reductie gereduceerd toenamen (gele mosterd) zou verklaard kunnen worden door een verschillende kwaliteit (zware metalen gehalte) van het specifieke voedsel te veronderstellen: de inhoud van plantencellen versus bacteriën. Beide groepen nematoden staan n.l. aan dezelfde bodemoplossing bloot en van een systematisch verschil in gevoeligheid voor blootstelling aan zware metalen tussen bacterievore, fungivore en herbivore nematoden is in het algemeen geen sprake. Wanneer b.v. bij veldonderzoek naar de relatie zware metalen/nematoden herbivore nematoden specifiek afnemen in een zware metalen gradiënt (Korthals, Yeats) is dit vooral het gevolg van afgenomen primaire productie, terwijl de toename van fungivoren bewerkstelligd wordt door een versterking van de organische stof afbraak door schimmels. Het lijkt er dan ook eerder op dat het niet de blootstelling aan hogere concentraties, aan EDGA geadsorbeerde zware metalen in de bodemoplossing is die de sterke reductie in microbivore nematoden veroorzaakt, maar de kwaliteit van het voedsel, bacteriën en schimmels. Mogelijk bevatten deze voedselorganismen veel hogere gehalten zware metalen dan de inhoud van plantencellen die door herbivoren wordt geconsumeerd. Dat hogere gehalte hoeft niet in de ingeslikte bacteriecel te zitten, maar kan ook aan de celwand geadsorbeerd zijn die een overwegend negatieve lading heeft, of het maakt deel uit van de mee opgeslikte bodemvloei-stof als zware metaal –DOC of – EDGA complex (Plette, 1996).

4.3.2 Incubatie proef Cu verontreinigde bodems

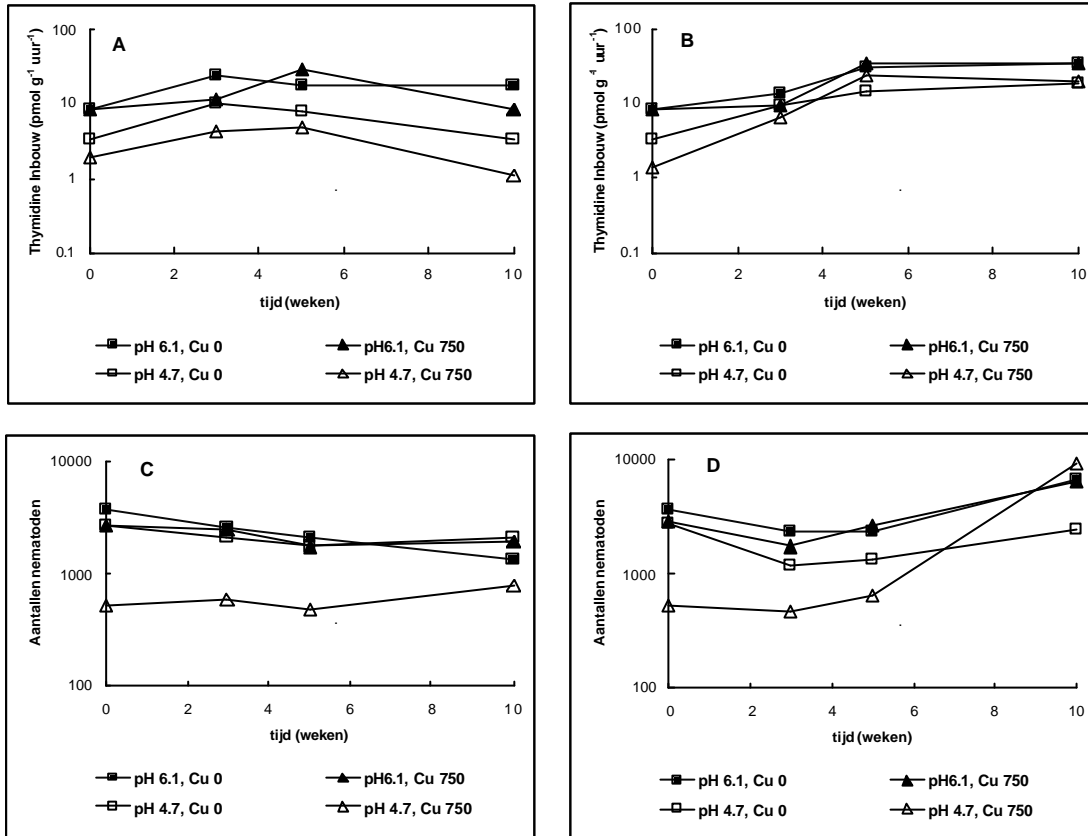
In de potproef met grond uit 4 proefveldjes met combinaties 0 en 750 kg Cu.ha⁻¹, pH 6.1 en 4.7 met en zonder inzaai van de koper tolerante grasvariëteit *Agrostis capillaris* var. Parys Mountain (Barenbrug Research, Wolfheze) werden gedurende een groei/incubatie periode van 10 weken o.a. de volgende biologische parameters bepaald: bacteriële aantallen en -groeisnelheid (thymidine-inbouw), protozoën en nematoden (aantallen, voedingsgroepen, taxa); daarnaast werden in de bodemoplossing pH, DOC-, en Cu-conc. gemeten en werd op basis van deze waarden de Cu-act. berekend (Tabel 6). Significant lagere bacteriële groeisnelheid en nematodenaantallen (alle voedingstypen) bij een zeer hoge, toxische Cu-act. van 10⁻⁵ M werden gemeten in de pH 4.7 Cu 750 braakpotten gedurende de gehele incubatieperiode (Figuur 1). Onder invloed van de groei van het kopertolerante gras verdween het significante verschil met betrekking tot nematoden en bacteriële groeisnelheid tussen de behandeling pH 4.7/Cu750 en de drie overige behandelingen. Het lijkt voor de hand te liggen dat de afname van de toxiciteit van de bodemoplossing ([Cu⁺⁺]) de bacteriële groeisnelheid deed herstellen; dit ten gevolge van de groei van de plant die tevens de aantalstoename van bacterievore en fungivore nematoden initieerde die hierin niet meer geremd werden door de toxiciteit van de bodemoplossing. De toename onder invloed van de groei van het gras van microbivore nematoden in de behandeling pH 4.7/Cu750 was zelfs beduidend groter dan in de overige behandelingen.

In vergelijking met de 3 jaar oudere waarnemingen van Korthals et al. 1996a, in de plotjes met variabele pH en koperlast te Wageningen, werden in de voor de potproef gebruikte monsters lagere totale aantallen nematoden aangetroffen: pH6.1/Cu0 17%, pH4.7/Cu0 33%, pH 6.1/Cu750 38%, pH4.7/Cu750 74%. Duidelijk is dat met name in de behandeling pH4.7/Cu750 de totale aantallen na een voortgezette periode van gereduceerde gewasproductie nog aanzienlijk verder waren gereduceerd, waaronder een disproportioneel sterke afname van herbivoren. De toename van bacterievoren (300 ? 7400.100g⁻¹ grond) en fungivoren (100 ? 1500.100g⁻¹ grond.) in de behandeling pH 4.7/Cu750 onder invloed van het kopertolerante gras leidde tot dichtheden die vele malen hoger lagen dan door Korthals in welk plotje dan ook gemeten (bacterievoren <2200.100g⁻¹ grond, fungivoren <900.100.g⁻¹ grond.)

Tabel 6. Effecten van de groei van een Cu-tolerante grasvariëteit van *Agrostis capillaris* (10 weken) op de Cu-speciatie in Cu onbelaste grond (Cu 0) en in Cu-belaste grond (750 kg.ha⁻¹, Cu 750) en bij pH 4.7 en 6.1

Behandeling		Incubatie periode (weken)							
		0			10				
		braak	braak	gewas	Behandeling	0	10		
					braak	braak	gewas		
pH 6.1/Cu 0	Cu _t	0.48	-	-	pH 4.7/Cu 0	Cu _t	0.47	-	-
	Cu _s	0.05	2.0	3.0		Cu _s	2.0	7	10
	pCu	9.0	7.5	9.5		pCu	7.5	6.5	8.5
pH 6.1/Cu 750	Cu _t	2.94	-	-	pH 4.7/Cu 750	Cu _t	2.42	-	-
	Cu _s	4.0	18	8		Cu _s	11	135	17
	pCu	7.5	6.0	8.5		pCu	7.0	5.0	7.0

*) Cu_t = koper totaal in mmol.kg⁻¹; Cu_s = opgeloste koperconcentratie in μM; pCu = koperactiviteit in de bodemoplossing (pCu = -log[Cu²⁺])



Figuur 1. De dynamiek van de bacteriele activiteit (gemeten als ³H-thymidine incorporatie in pmol. h⁻¹.g⁻¹ droge grond) en van aantallen nematoden (per 100 gram grond) in een potexperiment met koper-gecontamineerde grond (Wageningen) mét (fig. B en D) en zónder (fig. A en C) koper-tolerant *Agrostis capillaris* L. var Parys Mountain.

4.3.3 Incubatie proef grond Maatheide/Lommel

Bodemchemische en -biologische parameters werden gemeten na incubatie gedurende 4 weken van grondmonsters afkomstig van de Maatheide/Lommel:

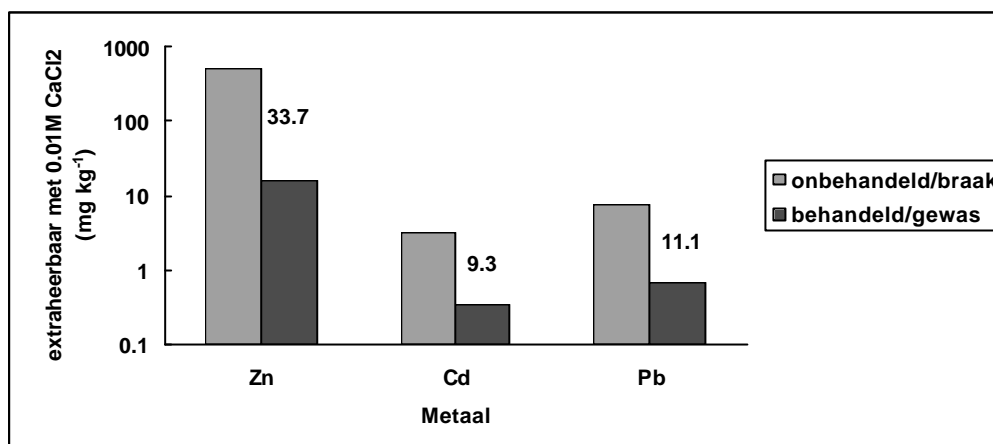
- uit het ongeremedieerde deel
- ongeremedieerde grond verrijkt met makkelijk afbreekbaar vloeibaar substraat
- uit het begroeide geremedieerde proefveld.

In dit onderzoek stonden twee vragen centraal:

- In hoeverre leidde de remediatie tot een normalisering van het ecosysteem?
- In hoeverre wordt de kwaliteit van het bodemecosysteem in de ongeremedieerde grond veroorzaakt door gebrek aan substraatinput ten gevolge van de afwezigheid van vegetatie?

Ten behoeve van de tweede vraagstelling werden aan ongeremedieerde grondmonsters glucose en glycine toegevoegd en na incubatie dezelfde metingen verricht als aan de andere monsters. In tabel 7 en figuur 2 zijn de resultaten van de

chemische en microbiologische bepalingen aan de geïncubeerde Maatheide monsters weergegeven.



Figuur 2. Effect van remediatie met beringiet en gewasgroei op de beschikbaarheid van Zn, Cd en Pb in een 0.01 M CaCl₂ extractie. Het nummer boven de data 'behandeld' is de verhouding tussen de hoeveelheid geëxtraheerd metaal in de onbehandelde en behandelde grond.

Duidelijk is dat de remediatie van het Maatheide proefveld een sterke verlaging van de beschikbaarheid van Zn, Cd en Pb teweeg brengt. Dit was met name het gevolg van de stijging van de pH van 5.8 naar 7.1 (beide gemeten in het CaCl₂ extract). Als gevolg van de verhoging van de DOC-concentratie in het behandelde veld steeg de beschikbaarheid van Cu licht van 0.26 naar 0.28 mg kg⁻¹.

Tabel 7. Organismen, processnelheden en beschikbaarheid van Zink na 30 dagen incubatie van grondmonsters uit de Maatheide: kale ongeremedieerde grond, idem plus substraat (glucose, glycine), -geremedieerde grond

Organismen/Processen	Kale Grond/ Onbehandeld		Begroeide Grond/ Behandeld
	- substraat	+ substraat	+ beringiet/compost
Bacterien x10 ⁹ .g ⁻¹ a,b	0.12 ± 0.02	0.42 ± 0.09	0.99 ± 0.32
Schimmels m.g ⁻¹ b	0.0	0.4 ± 0.6	5.4 ± 2.6
Protozoën x10 ³ .g ⁻¹ a,b	2.5 ± 0.75	104 ± 47	63 ± 30
Nematoden .100 g ⁻¹ b	13 ± 12	13 ± 4	3416 ± 233
¹⁴ C Leucine ngC.g ⁻¹ .h ⁻¹ a,b	8 ± 3.5	49 ± 8	73 ± 15
Respiratie ppmCO ₂ .30d ⁻¹	50	6000	4200
Biolog % (95)	46	n.a.	83
Bacterien ¹⁰ log CFU.g ⁻¹ a,b	5.6 ± 0.2	7.8 ± 0.2	7.5 ± 0.1
Streptomyceten ¹⁰ log CFU.g ⁻¹ a,b	4.8 ± 0.2	6.5 ± 0.3	7.4 ± 0.1
Schimmels ¹⁰ log CFU.g ⁻¹ a,b	5.0 ± 0.1	6.4 ± 0.4	6.0 ± 0.1
Zn _{H2O} mg.kg ⁻¹	53	n.a.	9
Zn _{CaCl2} mg.kg ⁻¹	525	n.a.	16

a,b: significant verschillend tussen kale grond en + en - substraat (a) en tussen kale grond - substraat en begroeide grond (b), (P<0.001)

Onder invloed van deze remediatie normaliseerden de gemeten biologische parameters hetgeen er op neer kwam dat zij één à twee ordes van grootte hoger lagen dan in de ongeremedieerde monsters, en op een vergelijkbaar niveau lagen als in ongecontamineerde grond. De in de substraatverrijkte ongeremedieerde monsters

gemeten parameters indiceren dat deze bodem vooral ook te lijden heeft aan substraatgebrek: aantallen bacteriën en protozoën, respiratie en bacteriële activiteit tonen een redelijke (tot $\pm 50\%$ van de waarde in de geremediateerde grond) tot sterke ($> 100\%$) toename, ondanks de toxiciteit van de bodemoplossing. Nematoden zagen echter geen kans hun aantallen te normaliseren. De zeer sterk toegenomen aantallen protozoën zouden er een verklaring voor kunnen zijn dat de bacteriële dichtheid ongeveer de helft van die in het geremediateerde monster bedraagt. De weliswaar sterk toegenomen bacteriële groeisnelheid bleef wellicht ten gevolge van de toxiciteit van de bodemoplossing toch nog 30% onder de waarde gemeten in het geremediateerde grondmonster.

4.3.4 Conclusies:

De proeven met plantengroei op metaalgecontamineerde grond demonstreren twee belangrijke mechanismen: ten eerste draagt een goed groeiend gewas aanzienlijk bij aan de remediatie van een aangeslagen microbiel bodemecosysteem, zowel door middel van immobilisatie van de zware metalen als door additie van substraat voor het gedepriveerde ecosysteem en ten tweede zijn gewassen in staat door opname van zware metalen bij te dragen aan de reductie van het zware metalen gehalte in de bodem (phyto-extractie); dit laatste mechanisme kan door bodemaddities gestimuleerd worden.

4.4 Microcosmos proeven

Een tweetal microcosmos experimenten werden uitgevoerd om de biologische effecten te onderzoeken van:

1. een niet toxische koperlast in een akkerbouw zandgrond die door een chemische ingreep acuut toxisch werd, en
2. een rechtstreekse additie (spiking) van koper aan een ongecontamineerde andere akkerbouw zandgrond.

4.4.1 De licht koper gecontamineerde zandgrond

4.4.1.1 Inleiding

Het overgrote deel van het bodemkoper is biologisch niet beschikbaar omdat het ligt opgesloten in primaire mineralen en secundaire precipitaten. Een deel van het bijvoorbeeld met varkens/kippen mest toegevoegde Cu (> 900 ton per jaar in Nederland) wordt uitwisselbaar geadsorbeerd aan al of niet opgeloste organische stof, lutum en (hydr-)oxiden. De meest toxische vorm van koper, Cu^{++} -opgelost, vormt doorgaans slechts een minieme fractie van Cu-totaal (b.v. $< 0.002\%$) en is in dynamisch evenwicht met de uitwisselbare fractie. Dit evenwicht kan schoksgewijs zo sterk veranderen dat de Cu^{++} -conc.. met een factor 1000 toe of afneemt. Verantwoordelijk voor het evenwicht zijn vooral pH en totale ion-sterkte in de

bodemoplossing, met name de concentratie van Ca^{++} is in dit opzicht van betekenis. Bij daling van de pH en bij stijging van de Ca^{++} -conc. wordt de plaats van geadsorbeerd Cu ingenomen door H^+ of Ca^{++} . Ten gevolge van deze uitwisseling neemt de Cu^{++} -conc. in de bodemoplossing toe. Tegelijkertijd kan de totale hoeveelheid Cu-opgelost door precipitatie van Cu-DOC sterk afnemen bij dalende pH of stijgende Ca^{++} -conc. Toename van de koperactiviteit kan dus plaats vinden tijdens afname van de Cu-opgelost conc.. In een microcosmos experiment werd de Cu^{++} -conc. in de bodemoplossing van een zwak Cu-gecontamineerde akkerbouw zandgrond (proefveld Wageningen) acuut sterk verhoogd door het opleggen van een gradiënt in toegevoegd CaCl_2 . De effecten van deze ingreep op chemische en biologische parameters werden bestudeerd.

4.4.1.2 Experiment

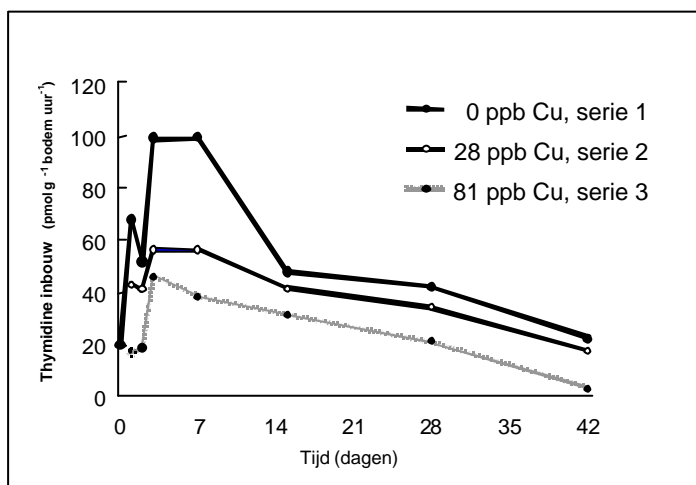
Aan grondmonsters van 250 g uit een veldje met pH 6.1 en 250 kg $\text{Cu} \cdot \text{ha}^{-1}$ ($\pm 75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) werd 0, 160 en 480 mg calcium toegevoegd in de vorm van 25g met CaCl_2 gecoat zand. De monsters werden tot 42 dagen bij 15°C geïncubeerd gedurende welke periode 4 tot 8 maal, afhankelijk van het type parameter, metingen werden verricht: pH, Ca-, DOC-, Cu_{opg} -, Cu^{++} - (Tabel 8) en Al_{opg} -concentraties in het bodemvocht (chemisch), bacteriële groeisnelheid (thymidine-inbouw; Figuur 3), aantallen bacteriën (Figuur 4), protozoën (Figuur 5), nematoden (Figuur 6), N-mineralisatie en zuurstofconsumptie in het gehele monster of in een deelmonster (biologisch).

Tabel 8. De pH, Ca-, DOC, totaal opgelost Cu concentratie, en Cu-activiteit (ppb) in het bodemvocht na additie van Ca als CaCl_2 , 0 (serie 1), 160 (serie 2) en 480 mg (serie 3) plus standaard deviatie, in met 250 kg $\text{Cu} \cdot \text{ha}^{-1}$ belaste grond met pH 6.1 (Wageningen)

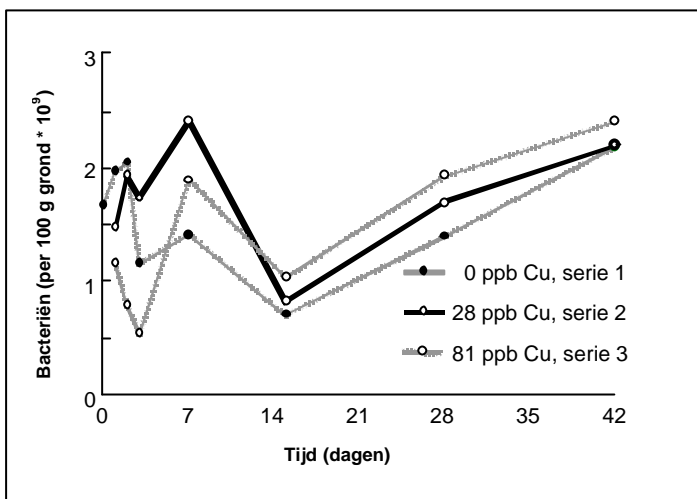
Serie	Samenstelling Bodemvocht					
	Ca additie mg pot^{-1}	pH-eind	Ca (mg L^{-1})	DOC (mg L^{-1})	Cu-totaal (mg L^{-1})	Koperactiviteit (ppb)
1	0	7.0	300	5000	33	<0,06
2	160	5.6	1800	110	0.15	28 ± 19
3	480	5.8	8700	220	0.15	81 ± 43

De proef met door koper verontreinigde grond, geïncubeerd na het aanleggen van een calciumgradiënt, geeft het volgende beeld (zie ook tabel 8). Onder invloed van de schoksgewijs sterk toegenomen Ca^{++} -concentratie in het bodemvocht daalde de pH, zowel meteen na addities als ook gedurende de incubatieperiode (verschil tussen begin- en eind pH bedroeg 0.5 à 1 pH eenheid). Ondanks de daling in pH daalde de concentratie aan Cu in oplossing eveneens als gevolg van de sterk gedaalde DOC concentratie terwijl de koperactiviteit, de concentratie Cu^{2+} , toenam (tabel 8). Na enig fluctueren gedurende de eerste week van de incubatieperiode bleef de bacteriële groei het laagst in de zwaarst belaste behandeling, Ca_{480} , terwijl ook in de behandeling Ca_{160} een remming optrad. De bacteriële biomassa bleek echter juist het kleinst te zijn in de onbehandelde Ca_0 -grond en het grootst in de zwaarst belaste Ca_{480} -grond. Logischerwijs is dus ook de specifieke bacteriële groei sterk gereduceerd, parallel met de aangelegde calciumgradiënt: op dag 28 bijvoorbeeld, bedroeg de thymidine-inbouw

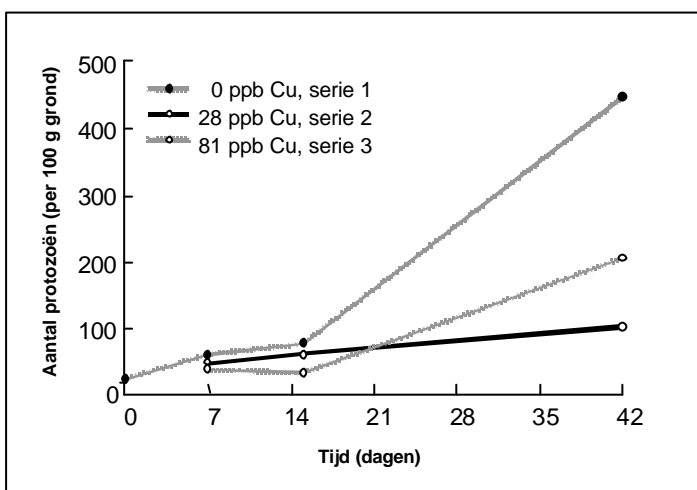
(groeiparameter) in de verschillende behandelingen respectievelijk 30, 20 en 11 pmol/uur* 10^9 bacteriën, in Ca_0 , Ca_{160} en Ca_{480} , en was dus in de calciumbelaste behandelingen met sterk verhoogde koperactiviteit met 33% en 63% gereduceerd. Ook de specifieke zuurstofconsumptie was parallel met de calciumgradiënt gereduceerd, bijvoorbeeld in de periode dag 23-30 bedroeg deze respectievelijk 13.1, 5.4 en 5.0 $\mu\text{g O}_2/\text{dag} \cdot 10^9$ bacteriën, en was dus met resp. 59% en 62% gereduceerd in de met calcium belaste incubaties. De gereduceerde aantallen en de geringe dynamiek van de bacterievore organismen, de protozoën en de nematoden, in de met calcium belaste incubaties wijzen op een afname van de graasdruk op bacteriën, wat ook weer een negatief effect heeft op de mineralisatiesnelheid. Het ligt voor de hand de reductie van aantallen grazers als een belangrijke oorzaak in te schatten voor de relatief hoge aantallen bacteriën in de calciumbelaste en dus ook Cu^{++} -belaste incubaties met sterk verlaagde bacteriële groei. De vrij abrupte Ca^{++} - en Cu^{++} -concentratieverhoging veroorzaakte dus in de relatief korte daaropvolgende meetperiode van 42 dagen een ander reactiepatroon dan wordt waargenomen in akkers die gedurende langere tijd met zware metalen worden belast. In dit experiment, ten gevolge van de toename van de Ca^{++} en Cu^{++} -concentratie, dus geen afname van de aantallen bacteriën bij een ongeveer gelijk blijvende zuurstofconsumptie en een verhoogde specifieke respiratie zoals in de literatuur vaak gevonden wordt, maar verhoogde aantallen bacteriën bij afgenomen bacteriële groei en zuurstofconsumptie en dus ook afname van specifieke respiratie.



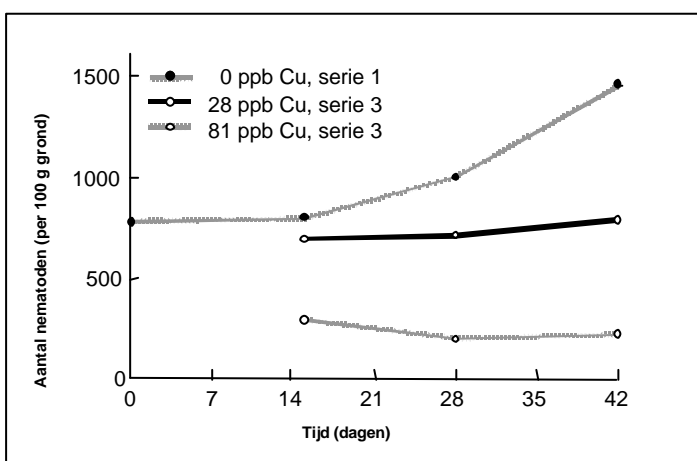
Figuur 3. Effect van koper activiteit (Cu^{2+} activiteit) op het verloop van de bacteriele activiteit (gemeten als ^3H -thymidine-inbouw) in de $250 \text{ kg Cu ha}^{-1}$ belaste grond na verschillende addities van Ca als CaCl_2 (zie tabel 8).



Figuur 4. Effect van koper activiteit (Cu^{2+} activiteit) op het verloop van de aantallen bacteriën (zie tabel 8).



Figuur 5. Effect van koper activiteit (Cu^{2+} activiteit) op het verloop van de aantallen protozoën (zie tabel 8).



Figuur 6. Effect van koper activiteit (Cu^{2+} activiteit) op het verloop van de aantallen nematoden (zie tabel 8)

4.4.2 De met koper gespikete ongecontamineerde zandgrond

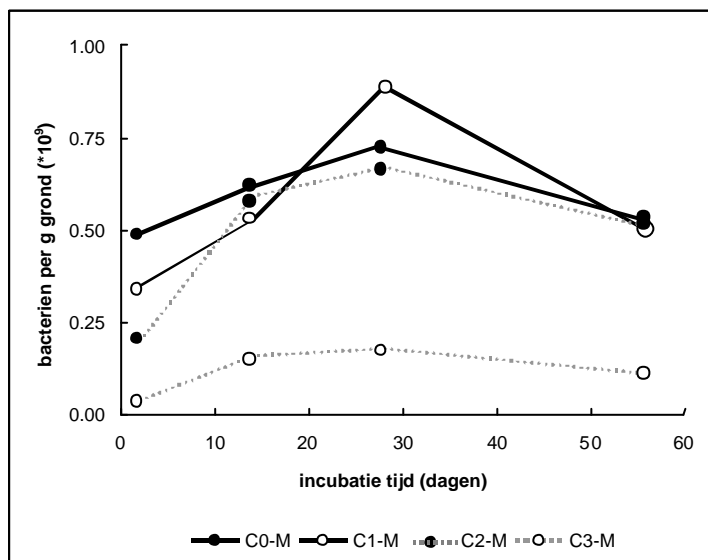
4.4.2.1 Inleiding

Contaminatie van bodems met zware metalen vindt in het algemeen geleidelijk plaats en zal meestal pas na een lange periode van buffering van de metalen leiden tot situaties die potentieel toxisch zijn. Door schoksgewijs optredende fysisch/chemische evenementen kan een nog niet toxische situatie eensklaps toxisch worden voor gewas, voor onderdelen van het bodemecosysteem of voor het gehele ecosysteem. In microcosmosproeven waar aan grond contaminant(en) rechtstreeks worden toegediend treedt ook een acuut toxische situatie op die na enige tijd incubatie afzwakt of verdwijnt. De reacties van organismen en processen vertonen in dergelijke experimenten een verloop waarin adaptatie en selectie een belangrijke rol spelen en mede ten gevolge daarvan aanvankelijke reductie van aantallen en soorten en inhibitie van processen weer verdwijnen en het systeem normaliseert op een nieuw niveau of terugkeert naar de oude situatie.

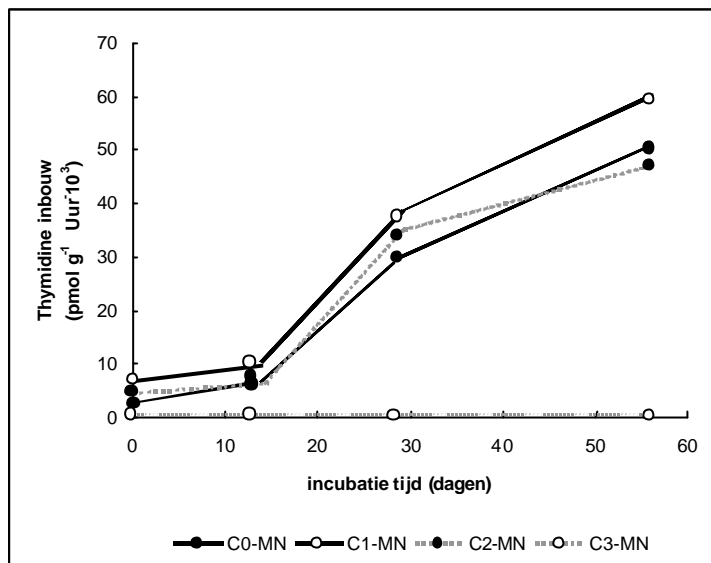
4.4.2.2 Experiment

Aan γ -gesteriliseerde grondmonsters van 250g ongecontamineerde akkerbouw-zandgrond (boerderij IB/Haren) werd 250 mg gemalen tarwestro toegevoegd en werd een kopergradiënt opgelegd door toevoeging van 25 g CuCl_2 -gecoat kwartzand: 0 (Cu_0), 10 (Cu_1), 100 (Cu_2) en 1000 ppm Cu (Cu_3). De behandelingen werden selectief geïnoculeerd met een uit het proefveld afkomstige suspensie micro-organismen (M), met 2 soorten bacterievore nematoden (MN) (*Rhabditis* sp. en *Acroboloides buetschlii*) en met 10 gram verse grond uit het proefveld (MNF⁺). De incubatieduur bij 15°C was 0 (2 dagen), 2, 4, 8 en 16 weken. Gemeten werden pH, DOC-conc. en Cu-activiteit in de bodemoplossing; als biologische parameters werden gemeten aantallen bacteriën en nematoden, bacteriële groeisnelheid (thymidine-inbouw), C- en N-mineralisatie. De pH in de behandelingen Cu_0 , Cu_1 en Cu_2 was ongeveer gelijk, ± 6.21 , en in Cu_3 lag de pH meer dan 1 eenheid lager: ± 4.97 . De koper activiteit in de bodemoplossing vertoonde de volgende gradiënt: 0.08/ Cu_0 , 0.18/ Cu_1 , 0.41/ Cu_2 en 29 ppb Cu^{++} / Cu_3 . De opgelegde kopergradiënt had aanvankelijk (week 0) een parallelle negatieve gradiënt in bacterieaantallen (Figuur 7) tot gevolg die nadat in alle incubaties de aantallen na 2 of 4 weken hadden gepiekt daalden tot ongeveer hetzelfde niveau, $\pm 0.5 \cdot 10^9 \cdot \text{g}^{-1}$, de aantallen die ook in week 0 in Cu_0 werden gemeten; uitzondering op dit verloop waren de aantallen in Cu_3 die gedurende de gehele incubatieperiode lager waren dan $0.2 \cdot 10^9 \cdot \text{g}^{-1}$. De trend van het aantalsverloop van de bacteriën werd vrijwel niet door de aanwezigheid van bacterievore nematoden beïnvloed; onder de graasdruk van nematoden werden wel lagere aantallen bacteriën gemeten (MN versus M). De aantalsontwikkeling van de twee geïnoculeerde soorten nematoden (Figuur 8) werd door de koperbelasting tot en met 100 ppm (Cu_1 en Cu_2) amper beïnvloed terwijl zij de inoculatie in Cu_3 niet overleefden (MN). De bacteriële groeisnelheid (Figuur 9) bleek in de eerste week parallel aan de opgelegde Cu-gradiënt gehinibeerd, $\text{Cu}_0 > \text{Cu}_1 > \text{Cu}_2 > \text{Cu}_3$, (M en MN), en liep na tussentijdse fluctuaties in alle incubaties terug ($\pm 80\%$) tot hetzelfde

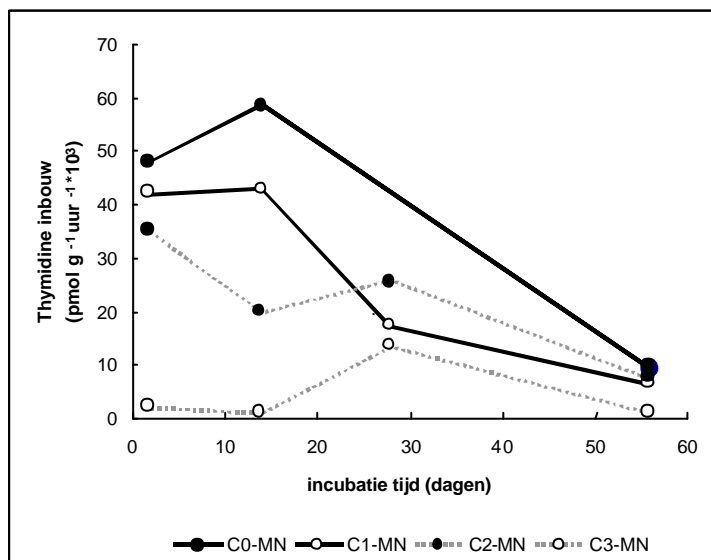
niveau, met uitzondering van Cu_3 , waarin de bacteriële groeisnelheid gedurende de gehele incubatieperiode significant lager bleef. De C-mineralisatie (Figuur 10 a,b) werd door de Cu-additie geremd ($Cu_0 > Cu_1 = Cu_2 >> Cu_3$) in M welk effect door de inoculatie met nematoden in MN weer tenietgedaan werd ($Cu_0 = Cu_1 = Cu_2 >> Cu_3$) in Cu_1 en Cu_2 . De netto N-mineralisatie (Figuur 11) werd vrijwel niet beïnvloed door de lage Cu-addities in Cu_1 en Cu_2 , terwijl de inhibitie in Cu_3 na 4 weken incubatie werd opgeheven (M en MN). De incubatie van Cu_0 met 10 g verse grond toegevoegd, MNF⁺, gaf een indicatie hoe ver aantallen organismen en processnelheden in de incubaties M en MN afstonden van vergelijkbare incubaties met een completer ecosysteem. In MNF⁺ Cu_0 bereikten de beide geïnoculeerde soorten nematoden dichtheden die 70% lager waren dan in MN- Cu_0 , terwijl de C-mineralisatie tweemaal zo hoog was en de netto N-mineralisatie 60% lager. Het totale beeld komt op het volgende neer. De additie van 1000 ppm Cu heeft een duurzaam negatief effect op aantallen bacteriën en nematoden (extinctie), de bacteriële groeisnelheid, en de C-mineralisatie. De additie van 10 en 100 ppm Cu heeft een sterk negatief initieel effect op aantallen bacteriën en op de processen bacteriële groeisnelheid en C-mineralisatie, negatieve effecten die in de loop van de incubatieperiode grotendeels verdwijnen; de effecten van deze Cu-addities op de nematoden en de N-mineralisatie waren gering. De aanwezigheid van bacterievore nematoden deed de negatieve effecten van de additie van 10 en 100 ppm Cu op de C-mineralisatie teniet. Effecten van Cu-additie traden dus eerder op in een incompleet dan in een vollediger ecosysteem. De incubaties met verse grond toegevoegd demonstreerden dat slechts een bescheiden deel van het toegevoegde stro in de incubaties M en MN werd gemineraliseerd en dat het geïnoculeerde ecosysteem slechts een beperkt aantal taken verzorgde, bijvoorbeeld geen predatie op nematoden.



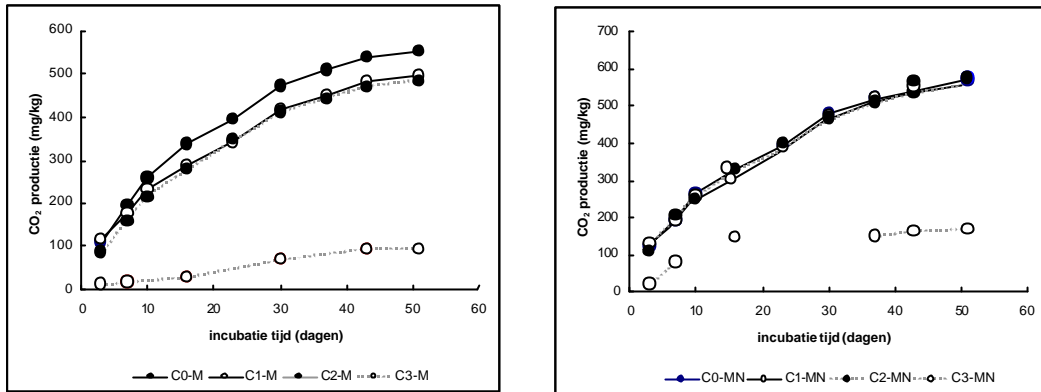
Figuur 7. Verloop van de aantallen bacteriën in ongecontamineerde zandgrond (Haren) waaraan 0(C_0), 10(C_1), 100 (C_2) en 1000 (C_3) ppm Cu als $CuCl_2$ -gecoat zand is toegevoegd



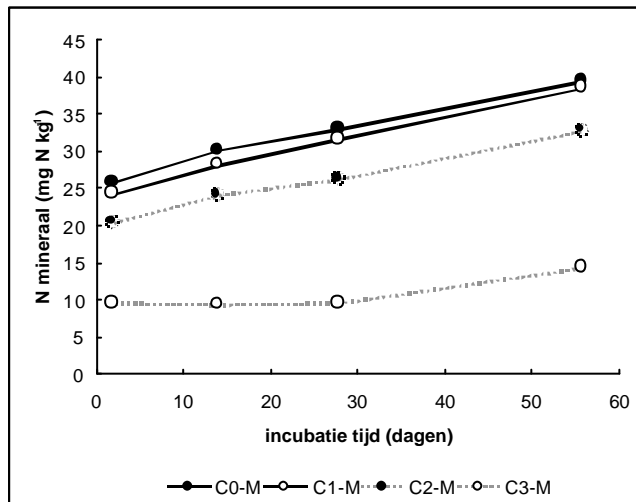
Figuur 8. Verloop van de bacterievore nematode *Acroboloides* in ongecontamineerde zandgrond (Haren) waaraan 0(C₀), 10(C₁), 100 (C₂) en 1000 (C₃) ppm Cu als CuCl₂-gecoat zand is toegevoegd.



Figuur 9. Verloop van de bacteriele activiteit in de aanwezigheid van nematoden (gemeten als ³H-thymidine inbouw) in ongecontamineerde zandgrond (Haren) waaraan 0(C₀), 10(C₁), 100 (C₂) en 1000 (C₃) ppm Cu als CuCl₂-gecoat zand is toegevoegd.



Figuur 10a,b. Verloop van de CO_2 -productie onder af- (M, links) en aanwezigheid van nematoden (MN, rechts) in ongecontamineerde zandgrond (Haren) waaraan 0 (C_0), 10 (C_1), 100 (C_2) en 1000 (C_3) ppm Cu als $CuCl_2$ -gecoat zand is toegevoegd.



Figuur 11. Verloop van de netto N-mineralisatie in ongecontamineerde zandgrond (Haren) waaraan 0 (C_0), 10 (C_1), 100 (C_2) en 1000 (C_3) ppm Cu als $CuCl_2$ -gecoat zand is toegevoegd.

4.4.3 Conclusies:

Uit de beschreven experimenten blijkt dat door verandering van een chemische parameter (EC) een niet-toxische belasting met een contaminant (Cu) toxisch kan worden terwijl bij additie van een toxicant (Cu) aanvankelijk negatieve effecten op de biologische parameters na enige tijd verdwijnen en het toxisch effect geringer is naarmate het ecosysteem completer is. Voor een verklaring van waargenomen effecten is het soms nodig meerdere biologische parameters te meten: in het experiment met additie van $CaCl_2$ werden de hoogste aantallen bacteriën gemeten in de zwaarst belaste behandeling, dit ten gevolge van afgenomen predatiedruk door bacterievoren.

5 Discussie en conclusie

5.1 Inleiding

Onderzoek naar bodembioologische effecten van te hoge concentraties zware metalen laten bij voorbeeld zien dat: I) de organische stof minder snel wordt afgebroken en zich dus op langere termijn ophoopt (Chander and Brookes 1991b; Valsecchi et al. 1995) II) de microbiële biomassa, vooral de bacteriële, wordt gereduceerd (Báath 1989; Chander and Brookes 1991 a,b; Bardgett et al. 1994), III) de bodemrespiratie soms wel, soms niet wordt beïnvloed, IV) de specifieke respiratie – dat is de CO₂-productie per eenheid biomassa C – sterk toeneemt (Chander and Brookes 1991a) V) microbiologische processen zoals nitrificatie, denitrificatie en N-fixatie gevoeliger zijn dan C-mineralisatie (Báath 1989), VI) totale aantallen nematoden veel minder gevoelig zijn dan afzonderlijke taxa of trofische groepen (Weiss and Larink 1991; Korthals et al. 1996a).

Als gevolg van blootstelling aan koper door bemesting met varkensmest bleken reeds aanwezige kopertolerante bacteriën al bij geringe contaminatie uit te selecteren in veldsituaties (Huijsman et al. 1994) en ook na toevoeging van CuSO₄ aan zavelgrond bij incubatie in het laboratorium (Báath 1992). Een vergelijkbaar mechanisme doet zich voor bij het ontstaan van grasvegetaties met metaaltolerante genotypen van *Agrostis capillaris* en *Festuca rubra* (Smith and Bradshaw 1979; Humphreys and Nicholls 1984). Het metabolisme van metaaltolerante bacteriën wordt gekenmerkt door een lagere groei en een hogere CO₂-productie, dikwijls resulterend in geringere biomassa bij gelijkblijvende respiratie in met zware metalen verontreinigde grond. Wellicht gaat dit mechanisme voor veel soorten micro-organismen niet op zodat metaalcontaminatie wel specifieke processen (N-, P-, S-cycli) kan remmen zonder de C-cyclus te beïnvloeden (Kandeler et al. 1996) zoals ook de bedekkingsgraad van gecontamineerde grond dezelfde kan blijven terwijl veel plantensoorten verdwijnen.

5.2 Discussie

Het bodemvoedselweb heeft een pyramidale biomassaverdeling met talrijke relationele omwegverbindingen; biomassa: (organische stof, 30000 kg C ha⁻¹) ↔ bacteriën (250 kg C.ha⁻¹) > schimmels (5-100 kg C) > protozoën (15 kg C) > nematoden (1 kg C) > arthropoden (0.5 kg C).

Omwegen:

1. nematoden consumeren schimmels (hyfen en sporen) terwijl nematofage schimmels de belangrijkste predatoren van nematoden vormen,
2. bacteriën zijn de belangrijkste consumenten van organische stof en worden geconsumeerd door o.a. nematoden maar herbivore nematoden consumeren ook rechtstreeks organische stof, zonder tussenkomst van bacteriën, en produceren substraat voor bacteriën.

Dit web van een groot aantal relaties wordt in de bodem blootgesteld aan (potentieel) toxische concentraties contaminanten die zelf het gevolg zijn van schoksgewijs of geleidelijk tot stand gekomen fysisch/chemische verschuivingen: pH-daling, afname organische stofgehalte, EC-stijging of eH-daling onder omstandigheden van snelle of geleidelijke toename van het contaminantengehalte.

Via verschillende mechanismen kunnen organismen getroffen worden door verhoogde concentraties zware metalen:

1. rechtstreeks doordat in de omringende bodemoplossing de activiteit van de metalen stijgt,
2. doordat zij voedsel opnemen met een verhoogd gehalte aan zware metalen,
3. doordat hun specifieke voedsel in samenstelling (b.v. bacterie-soorten), fysiologie (rustvorm, snelgroeiend) of in biomassa verandert,
4. doordat predatiedruk afneemt.

Mechanisme 1, het directe effect van actieve zware metalenspecies in de bodemoplossing is onderzocht door onder andere Mudry et al., 1982 en door Haight et al., 1982, voor de bacterievore nematodensoort *Panagrellus silusiae* Met betrekking tot acute toxiciteit (LC50), gemeten aan volwassen specimen gedurende 24, 48 en 72 uur werd de volgende rangorde waargenomen: $\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} \gg \text{Cd}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+} \gg \text{Ni}^{2+}$, waarbij voor een incubatieduur van 72 uur respectievelijk 1 (Cu), 2 (Hg), 4 (Pb), 13 (Cd), 47 (Zn), 69 (Cr) en 216 (Ni) mg.l^{-1} waren benodigd. Als gevolg van additie van gelijke hoeveelheden Cu, Zn en Ni aan grond werd door Korthals et al., 1996b, een vergelijkbare effect rangorde geworden met betrekking tot de reductie van nematoden aantallen: $\text{Cu} \gg \text{Zn} > \text{Ni}$.

Voor kortere incubatie perioden zijn veel hogere doses zware metalen (2 tot 40 maal) benodigd om een LC50 te kunnen meten. Juveniele (J2) nematoden zijn aanzienlijk gevoeliger (tot 7 maal) dan volwassenen, met uitzondering van gevoeligheid voor Hg. Vergelijkbare tests met herbivoren als *Pratylenchus penetrans*, *Xiphinema* sp. en *Aphelenchoides* sp. (Pitcher and McNamarra, 1972) indiceerden een ongeveer even grote gevoeligheid voor koper als werd gevonden voor *P.silusiae*.

Ten gevolge van verschillen in mate van binding aan organische substraten tussen de diverse zware metalen ontstaat bij een LC50 test in voedingsmedium of in DOC-bevattend poriewater een ander beeld: bij lood kon bijvoorbeeld ondanks blootstelling aan concentraties tot 500 mg.l^{-1} geen sterfte worden gerealiseerd in voedingsmedium. Bij chronische blootstelling aan sub-letale concentraties zware metalen beschermt *P. silusiae* zich door te vasten hetgeen tot sterfte door uithongering kan leiden. Dit mechanisme is absoluut: de nematode consumeert normaal of in het geheel niet.

Van genoemde mechanismen van effect van zware metalen op organismen zijn in het beschreven onderzoek voorbeelden te vinden, maar ook van het omgekeerde, n.l. dat een toxisch mechanisme wordt opgeheven (remediatie). Het meest drastische korte termijn-effect vormde de additie van 1000 ppm Cu als CuCl_2 aan ongecontamineerde zandgrond welke additie het bodemecosysteem gedurende twee maand incubatie niet

te boven kwam: alle biologische parameters bleven sterk gereduceerd (Figuur 7 tot en met 10). Het meest drastische lange termijneffect werd waargenomen in de Maatheide waar alle gemeten organismen en processen met één tot twee ordes van grootte waren gereduceerd ten gevolge van contaminantenlast en substraatgebrek.

In het geval van de Maatheide bleek het onder invloed van contaminatie geselecteerde bestand aan micro-organismen – bacteriën, actinomyceten, schimmels, protozoën – en ook processen als ademhaling en bacteriële groeisnelheid, sterk op substraatadditie te reageren, de nematoden echter niet. Dit is een indicatie dat bij hoge metaalactiviteit selectie en/of adaptatie beter functioneren aan de basis dan hoger op in het ecosysteem (Tabel 7). Dit hangt samen met de kortere generatietijd van micro-organismen. Dit verschijnsel is ook waar te nemen in het experiment met acute mobilisatie van een lichte koperlast door middel van Ca^{++} -additie in de vorm van CaCl_2 – gecoat zand waarbij de sterkste Cu^{++} -mobilisatie (0.06 → 81 ppb) de nematoden aantallen duurzaam 70% reduceerde. Bij een zwakkere mobilisatie (0.06 → 28 ppb) vond vrijwel geen directe reductie van nematodenaantallen plaats, maar aantalstoename in de loop van de incubatie werd sterk geremd (Figuur 6). Dit experiment toonde ook duidelijk een gevolg van effectmechanisme 4: in de zwaarst belaste incubatie werden de hoogste aantallen bacteriën aangetroffen (Figuur 4) in de periode van 2 tot 6 weken incubatie: $\text{Cu}^{++}_{\text{ppb81}} > \text{Cu}^{++}_{\text{ppb28}} > \text{Cu}^{++}_{\text{ppb0.06}}$, terwijl voor de bacteriële groeisnelheid het omgekeerde gold (Figuur 3). Mechanisme 2, de achteruitgang van een consument die gecontamineerd voedsel opneemt, kwam naar voren in het experiment met mobilisatie van $\text{Zn}/\text{Cd}_{\text{opgelost}}$ door middel van EDGA-additie aan licht gecontamineerde Budel-grond. De directe toxiciteit van de bodemoplossing (Tabel 3) was te gering om herbivore nematoden in aantalsontwikkeling te remmen. Deze betrekken hun voedsel uit de levende plant, maar bevinden zich wel buiten de wortel (ectoparasieten). In dezelfde incubaties werd de aantalsontwikkeling van de bacterievore nematoden onder invloed van de groei van de gewassen echter wel zeer sterk gereduceerd na EDGA-additie terwijl de bacterieaantallen verdrievoudigden (Tabel 4 en 5); deze reductie in aantalstoename is vermoedelijk het gevolg van het toegenomen gehalte aan contaminanten (Zn/Cd) van de bacteriën. Gebrek aan prooi raakt het volgend trofisch niveau negatief maar omgekeerd hoeft een overmaat aan bacteriën bijvoorbeeld niet positief uit te werken op de diverse taxa bacterievoren. Bacterievore nematoden begrazen vooral actief groeiende populaties bacteriën waardoor de afname van bacteriële groeisnelheid, die zich als eerste effect van toxiciteit manifesteert, vaak gekoppeld is aan afname van bacterievore nematoden (mechanisme 3) en vice versa, zoals te zien is in het potexperimnt met *Agrostis capillaris* op Cu-gecontamineerde grond (Figuur 1).

Uit het voorgaande rijst de vraag hoe effecten van contaminanten op plantengroei en op het bodemecosysteem in elkaar grijpen en wat de rol is van adaptatie aan de zware metalen en de selectie van resistente organismen, zowel van bodemorganismen als van gewassen. Met betrekking tot de bacteriële decompositie –route in het bodemecosysteem (meestal het hoofdtraject) lijken de volgende mechanismen te functioneren:

1. *Verhoogde zware metalenactiviteit verlaagt de bacteriële groeisnelheid en verhoogt het gehalte zware metalen van de bacteriën vooral ook door adsorptie aan het negatief geladen oppervlak (Thesis Plette, 1996 LUW).*
2. *Selectie/adaptatie leiden tot een verschuiving naar een minder efficiënt groeiende populatie bacteriën die bij min of meer onveranderde respiratie minder biomassa vormt.*
3. *De verlaagde groeisnelheid en het verhoogde gehalte aan zware metalen doen de waarde van bacteriën als voedsel voor bacterievoren, met name nematoden, afnemen.*
4. *Door afname van de graasdruk op bacteriën kunnen de aantallen (biomassa) onveranderd blijven of zelfs stijgen.*
5. *De bacteriële groeisnelheid wordt al gereduceerd bij relatief lage metaalgehalten (onder de interventiewaarde), terwijl de biomassa en ademhaling pas bij hogere concentraties afnemen.*
6. *Bij sterke verontreiniging kan de bacteriële biomassa zelfs toenemen als de bacterievoren en dus de graasdruk worden gereduceerd.*

Voor de afbraakroute via schimmels gelden andere mechanismen. Een aantal schimmels vertonen juist grote resistentie tegen zware metalen. In zwaar metaal gecontamineerde bodems zoals de Maatheide blijft een organische stof → schimmels → fungivore nematoden decompositiesysteem opvallend intact. Anders dan bacterievore nematoden die complete bacteriën inslikken, voeden fungivoren zich met de inhoud van de schimmelhyfen die na aanprikken met een stylet worden uitgezogen, dus via dezelfde techniek als waarmee herbivore nematoden voedsel betrekken uit plantenwortels. Voor fungivore nematoden geldt in metaal gecontamineerde situaties wellicht hetzelfde als voor herbivoren: zij worden pas kwetsbaar voor zware metalen als de inhoud van de schimmel gecontamineerd raakt; net als onder hogere planten worden ook onder schimmels soorten gevonden die zware metalen accumuleren.

Bij toenemende activiteit van zware metalen in de bodemoplossing zal zich dus eerst een minder efficiënte bacteriepopulatie (adaptatie/selectie) ontwikkelen, vermindert bacteriële groeisnelheid en nemen bacterievore nematoden af. Vervolgens vermindert de plantaardige productie, en na verdwijning van de vegetatie krimpt het bodemecosysteem tot een activiteits/dichtheidsniveau beneden 10% van het onaangetaste systeem. Met behulp van een metaal-resistente vegetatie al of niet in combinatie met bodemaddities (beringiet, kalk, organische mest) kan het bodemecosysteem in aanzienlijke mate herstellen, dus zonder dat het zware metalengehalte wordt verlaagd; dit laatste ook in zeer extreme situaties.

In het veld zijn er complexe interacties tussen verschillende groepen organismen die tot soms onverwachte effecten kunnen leiden. Met het zicht op het beschreven onderzoek lijken bioassays met testorganismen geïnoculeerd in met zware metalen verrijkte testgrond niet eenvoudig te interpreteren. Is het effect van momentane additie (acute verstoring) van zware metalen niet veel groter dan het effect van langzame accumulatie in het veld (chronische stress)? Is het testorganisme niet gevoeliger dan de populaties in het veld? Is de relatie tussen zware metalenadditie en het effect op het organisme direct of indirect en hoe moet een indirect effect geïnterpreteerd worden? Moet een positief effect positief en een negatief effect negatief gewaardeerd worden? Soms leidt stress juist tot een hogere biomassa met

een lagere activiteit. Een kleine verschuiving richting decompositie via schimmels kan een groot effect hebben op bacterievoren; een gevoelige groep als omnivore nematoden wordt door haast iedere bodemingreep negatief geraakt! Hoe moet de toename van fungivore nematoden onder invloed van stijgende metaal activiteit worden gewaardeerd? Wat te denken van het verregaand geremedieerde ecosysteem in een zandbodem met 16000 mg.Zn.kg⁻¹? De effecten kunnen in bioassays veel groter zijn dan in het veld, omdat de organismen niet aangepast zijn aan de verontreiniging. Vooral bij (micro)organismen met een korte generatietijd kan adaptatie snel optreden. Met bioassays wordt inzicht verkregen in potentiële effecten. Potentiële effecten wijzen op een risico, maar betekenen niet dat er ook actuele effecten in het veld zullen zijn. Bioassays hebben het voordeel dat er vrij eenvoudig dosis-respons relaties kunnen worden gemeten. Deze relaties worden vaak gebruikt om normen voor verontreiniging en drempelwaarden af te leiden. De voorspellende waarde van deze relaties voor het veld zijn echter beperkt. Daarom is het essentieel dat er tevens onderzoek wordt gedaan naar de mechanismen achter toxische effecten in het veld (Giller et al., 1998). In het veld worden specifieke processen al bij lage metaalconcentraties (beneden EU normen) beïnvloed. De mate van remming en het aantal effecten nemen gradueel toe bij toenemende verontreiniging. Een norm blijft altijd een arbitraire keuze van wat men nog aanvaardbaar acht. Daarom kan niet worden volstaan met het vaststellen van maximum metaal concentraties, maar dient verdere accumulatie in het algemeen zoveel mogelijk te worden vermeden (Dahlin et al., 1997).

Het hier beschreven bodemecologisch onderzoek op plaatsen die al tientallen jaren zijn verontreinigd met zware metalen toont aan dat de verontreiniging significante effecten heeft op de bodemorganismen (biodiversiteit), hun interacties (voedselweb) en uiteindelijk ook op ecologische processen (life support functies) zoals de afbraak van organische stof en de mineralisatie van nutriënten. Meting van microbiële groeisnelheid, biomassa en ademhaling, microbivoren zoals nematoden, en C en N mineralisatie geeft een beeld van actuele effecten van verontreiniging op het bodemleven en de nutriëntenkringlopen.

Het beleid voor de bescherming van de bodem is gericht op het behoud van biodiversiteit en ecologische processen. Daarom zijn er ecologische gegevens nodig om de kwaliteit van bodemecosystemen te monitoren, de invloed van (veranderend) landgebruik vast te stellen, en beleid te kunnen ontwikkelen (Technische Commissie Bodembescherming 2000 a,b). In diverse projecten (o.a. Biologische Indicator voor het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit, Schouten et al., 2000; TRIADE, Van der Waarde et al., 1999) is de laatste jaren ervaring opgedaan met de toepassing van biologische indicatoren voor bodemkwaliteit. Deze zijn goed bruikbaar om verschillen tussen locaties en trends in de tijd aan te tonen. De waarde van de indicatoren hangt niet alleen af van de mate van bodemverontreiniging maar ook van de grondsoort en het landgebruik.

De vraag wat een normale waarde is kan pas worden beantwoord als er voldoende metingen zijn verricht aan een bepaald type bodem. De gemiddelde waarde per bedrijfstype en grondsoort, gebaseerd op voldoende (10-20) replicaties, kan dienen

als 'normale' referentiewaarde of streefwaarde. Als 1 of meer indicatoren op een bepaalde locatie te ver (bijvoorbeeld meer dan de standaardafwijking of het 5%-percentiel) onder de referentie liggen, kan dat aanleiding zijn tot nader onderzoek. De afwijking van de referentie kan worden gekwantificeerd met een bodemkwaliteitsindex die kan liggen tussen 0 en 100%. Voor het vaststellen van trends en referentiewaarden is uitgebreide toepassing van bodembioologische indicatoren van groot belang. Bij voldoende gegevens kunnen uiteindelijk ook multivariate prognostische modellen worden gemaakt die effecten van een bepaalde milieuvARIABLE op een bepaalde indicator kunnen voorspellen. Het vaststellen van trends vereist langdurige metingen, maar heeft als voordeel dat er geen aannames hoeven te worden gedaan over wat een goede referentiewaarde is.

Daarnaast is er meer fundamenteel onderzoek nodig naar de stabiliteit van (verontreinigde) bodemecosystemen. Het is mogelijk dat ecosysteemprocessen nog niet of nauwelijks zijn aangetast, terwijl bijvoorbeeld door een veranderde biodiversiteit de weerstand (resistance) en de veerkracht (snelheid van herstel of resilience) van het ecosysteem tegen (nieuwe) verstoringen is veranderd of afgenomen (De Ruiter et al., 1995; Giller et al., 1998; Griffiths et al. 2000). Hierover is nog erg weinig bekend. Daarom moeten relaties tussen stress (verzuring, zware metalen, andere verontreinigende stoffen) en de structuur en stabiliteit van microbiële gemeenschappen en ecosysteemprocessen (life support functies) in de bodem worden onderzocht. Ook is er weinig bekend over effecten van stress op de afbraak van moeilijk afbreekbare verbindingen. Deze afbraak levert weinig energie op. Omdat stress leidt tot een lagere bacteriële groei-efficiëntie is het waarschijnlijk dat de afbraak van recalcitrante verbindingen het eerst wordt belemmerd (Wenderoth en Reber, 1999).

5.3 Conclusie

Bioassays versus veldinventarisaties

Uit het beschreven onderzoek in dit rapport komt naar voren dat toegenomen stress op een bodemecosysteem tot kortstondige of duurzame verschuivingen in dit systeem en in zijn functioneren kunnen leiden. Bij het meten van de reactie van één parameter (testorganisme) op toegenomen stress, zoals dat bij bioassays gebruikelijk is en als zodanig deel uitmaakt van de aanpak beschreven in het 'Stappenplan' van Slijkerman et al. (2000), wordt het risico gelopen dat de gemeten parameter geen reactie vertoont terwijl het ecosysteem juist wel reageert. Wordt bijvoorbeeld bodemademhaling gemeten na additie van zware metalen, dan kan de netto ademhaling gelijk blijven terwijl juist de efficiëntie is verkleind. Als ten opzichte van een testorganisme zowel voedsel als predatiedruk afnemen na verhoging van een stress factor, kan ook het netto effect nul zijn. Ook is het mogelijk dat een proces of organisme weliswaar reageert op een toegenomen stress factor maar dat elders in het systeem hiervoor compensatie wordt gevonden en het systeem eigenlijk amper verandert.

Dus, met het gebruik van bioassays wordt het risico gelopen stresseffecten ernstig te onder- of te overschatten. Bioassays zijn echter relatief goedkoop en kunnen wel

gebruikt worden voor een eerste screening van een verdachte situatie. Zij kunnen een aanwijzing geven over een potentieel effect van bodemverontreiniging, maar een veldinventarisatie met bepalingen aan de belangrijkste functionele groepen organismen en processen is nodig als follow up.

Relatie beschikbaarheid - opname - toxiciteit - afleiden beschermingsniveaus

Bij het afleiden van 'functionele' beschermingsniveaus (dwz niveaus die daadwerkelijk blootstelling koppelen aan opname en toxiciteit) is het goed om de eerder genoemde blootstellingroutes in ogenschouw te nemen. Uit de hier gepresenteerde resultaten blijkt dat het optreden van effecten in sterke mate gekoppeld is aan de manier waarop (in dit geval) metalen aan organismen 'aangeboden' worden: direct via het bodemvocht (voor microflora en -fauna) dan wel via de vaste fase (voor meso- en macro fauna), en indirect via voedsel. Het is derhalve cruciaal bij het opstellen van toetsen die gebruikt gaan worden in het stappenplan om MTR en VR niveaus af te leiden rekening te houden met het voor dat organisme geldende blootstellingpatroon en de rol van dat organisme in de voedselketen in een bodem. Wanneer een toetsorganisme in een bepaald systeem nog geen 'last' heeft van een bepaalde 'druk' opgelegd door de aanwezigheid van metalen is het mogelijk dat door predatie van dit organisme andere hogere organismen daar wel last van krijgen.

Dit speelt te meer een rol in de discussie omdat de uiteindelijk af te leiden normen op vaste fase gehalten berekend gaan worden en niet zozeer op beschikbare fracties. In dat kader is het eens te meer zinnig een beeld te schetsen van het concept van biobeschikbaarheid dat zelfs in een gegeven bodem verschillende niveaus kent:

1. *metaalactiviteit in bodemvocht.* Met name organismen die in het poriewater leven en er hun voedsel uit betrekken (bacteriën) zullen een directe respons te zien geven met de vrije metaalactiviteit. Een belangrijke groep als schimmels echter kan naast directe opname via bodemvocht ook via de vaste fase blootgesteld worden aan metalen in de bodem.
2. *metaalconcentratie en samenstelling bodemvocht.* Echter, sommige organismen -en ook hogere planten- zijn in staat naast de metaal activiteit, ook andere opgeloste verbindingen (Cl complexen, kleine organische moleculen) op te nemen. Daarnaast is, analoog aan de 'waterwereld' al aangetoond dat de opgeloste concentratie aan Ca en Zn een positief effect hebben op de opname van andere metalen (die neemt af bij hogere Ca en Zn niveaus)
3. *totaal 'potentieel' beschikbare fractie.* Voor grotere organismen als mollen, wormen en andere dieren die grotere hoeveelheden grond binnen krijgen, geldt wellicht de totale potentieel beschikbare fractie (bijvoorbeeld extraheerbaar met een zwak zuur of EDTA) als beschikbaar
4. *aanbod via voedsel.* Tenslotte mag niet worden vergeten dat een groot deel van de organismen een deel van de metalen waaraan ze worden blootgesteld binnen krijgen via de consumptie van gecontamineerd voedsel. Voor bovengrondse organismen als kerkuil en das is dat bekend en worden blootstellingsscenario's dan ook berekend via doorvergiftiging maar voor bodem (micro)organismen is dat nog niet het geval.

Het onderzoek dat in dit rapport gepresenteerd wordt laat ook voorbeelden van de beschikbaarheid via voedsel en via voedselweb interacties zien. Het voorbeeld van de

Maattheide toont daarbij aan dat ook een beperkt voedselaanbod kan leiden tot vergelijkbare stress 'symptomen' wat betreft het (dis)functioneren van organismen als die onder invloed van metalen gevonden worden.

Het vaststellen van normen blijft tot op zekere hoogte altijd een subjectieve keuze. Wat wil ik beschermen en waarom? Normen zijn altijd onderhevig aan onzekerheid. Er zijn zelfs bij zeer lage concentraties al effecten gemeten, hetgeen zou pleiten voor een beleid waarbij accumulatie niet mag optreden. Omdat dat laatste vaak niet haalbaar is, is het realistischer de interacties tussen metalen (en andere contaminanten) en hun effecten op ecosystemen te meten door 'objectieve' monitoring. Zeker wanneer men er van uit gaat dat blootstellingsexperimenten op *soortniveau* weliswaar een beeld schetsen van de gevoeligheid van individuele soorten, maar niet noodzakelijkerwijs leiden tot normen die te relateren zijn aan eenduidige effecten op *systeemniveau*. In dit rapport worden voorbeelden gegeven die laten zien dat de interactie tussen metalen en organismen op systeemniveau dermate complex is, met een scala aan interactieroutes, dat het afleiden van systeemnormen uit testen op soortniveau per definitie onmogelijk lijkt

Door echter gebruik te maken van monitoring van bodemecosystemen, waarbij verschillende types (grondsoort, gewas, e.v. klimaat) meegenomen worden, kan niet alleen een beeld geschetst worden van de 'normale' variatie in systeemactiviteit en –diversiteit, maar kunnen tevens trends in ruimte en tijd bepaald worden. Deze zijn waarschijnlijk beter te interpreteren dan puntmetingen die vervolgens getoetst worden aan een (subjectieve) referentie of norm (Zie ook Lancaster (2000) voor een kritische beschouwing over het afleiden van ecosystem health normen).

Hiermee wordt nadrukkelijk niet het uitvoeren van testen op soortniveau als nutteloos bestempeld. Deze informatie is wel degelijk bruikbaar om de verschillen in gevoeligheid tussen soorten te bepalen, en na te gaan in hoeverre soorten reageren op een bepaalde 'druk' opgelegd door metalen. Omdat op dit moment echter nog onvoldoende bekend is of een dergelijke opgelegde druk direct te vergelijken is met een zelfde druk onder veldcondities (bijvoorbeeld een zelfde concentratie in oplossing), is de vertaling van testen op soortniveau naar systeemniveau naar de mening van de auteurs op dit moment niet aan de orde.

5.4 Kennisleemtes

Een algemene kennisleemte van veldinventarisaties vormt het referentie probleem. Is de gemeten waarde normaal of afwijkend? Biologische parameters in het veld worden niet alleen beïnvloed door stress maar ook door bodemeigenschappen zoals pH, organische stofgehalte, kleigehalte etc. Daarom moeten per bodem- en vegetatie-type voldoende referentie metingen (circa 20) zijn gedaan om een goede schatting te kunnen maken van de gemiddelde waarde en de spreiding in een bepaald bodemtype. Met het systematisch verzamelen van referenties is een begin gemaakt in het kader van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit (RIVM). Dit richt zich voornamelijk op gangbare landbouwgronden. Daarnaast is nog veel onderzoek nodig op biologische en extensieve landbouwbedrijven, in natuurgebieden en in stedelijke gebieden.

Verder is nog weinig bekend over effecten van verontreiniging op de structuur en stabiliteit van het bodemecosysteem. Het is mogelijk dat stress nog weinig significante effecten heeft op de ecologische processen, maar dat de aangepaste maar gestresste gemeenschap een geringere weerstand heeft tegen nieuwe stress factoren (stress op stress). Daarom moet onderzoek worden verricht naar indicatoren voor stress en stabiliteit van het bodemecosysteem.

Literatuur

'Eigen' werk

Bloem, J., P.R Bolhuis, M.R. Veninga, J. Wieringa, 1995(a). Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In 'Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry' (K. Alef and P. Nannipieri, editors), pp 162-173. Academic Press, London.

Bloem, J., 1995(b). Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In 'Molecular Microbial Ecology Manual' (A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruin, editors), pp 4.1.8 : 1-12. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bloem, J., M.R Veninga and J. Shepherd, 1995(c). Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. Appl and Environ Microbiol 61:926-936.

Boon, G.T., L.A. Bouwman, J. Bloem and P.F.A.M. Römken, 1998. Effects of a copper-tolerant grass (*Agrostis capillaris*) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. Environ Toxicol Chem 17 (10): 1964-1971.

Bouwman, L.A., J. Bloem, P.F.A.M. Römken, G.T. Boon, J. Vangronsveld, 2001. Beneficial effects of the growth of metal tolerant grass on biological and chemical parameters in copper- and zinc contaminated soil. Minerva Biotechnologica 13:19-26.

Griffiths, B.S., K. Ritz, R.D. Bardgett, R. Cook, S. Christensen, F. Ekelund, S. Sørensen, E. Bååth, J. Bloem, P. de Ruiter, J. Dolfing and B. Nicolardot, 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. Oikos 90, 279-294.

Haakma, O, H. Korpershoek, I. Loggers, R. Moerman, 1994. Ecotoxicologisch onderzoek naar koper in een bodemsysteem. Studentenverslag AB-DLO/Haren.

Michel, P.H., J. Bloem, 1993. Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. Soil Biol Biochem 25:943-950.

Muijs, B., M.F.X. Veul, W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, Wei Chun Ma, J. Bloem, 2000. Haalbaarheidsonderzoek databank ecotesten als basis voor ecologische risicobeoordeling. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek. Deel 27. Wageningen.

Muijs, B., W. Hendriks, C.A.M. van Gestel, J. Bloem, W.C. Ma, 2000. Genereren en beoordelen van referentiegegevens voor terrestrische ecotesten. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek. Deel 36. Wageningen.

Römkens, P.F.A.M., L.A. Bouwman and G.T. Boon, 1999. Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. *Environ Poll* 106: 315-321.

Römkens, P.F.A.M., L.A. Bouwman, J. Japenga and C. Draaisma, 2002. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ Poll* 116:109-121.

Ruiter, P.C. de, A.-M. Neutel and J.C. Moore, 1995. Energetics, patterns of interaction strengths, and stability in real ecosystems. *Science*, 269, 1257-1260.

Schouten, A.J., J. Bloem, T. Breure, M. van Esbroek, W. Didden, P.C. de Ruiter en H. Siepel, 2000. Pilotproject Bodembioologische Indicator voor Life Support Functies. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven. Rapportnr. 607604001.

Schouten, A.J., J. Bloem, W.A.M. Didden, M. Rutgers, H. Siepel, L. Posthuma and A.M. Breure, 2000. Development of a Biological Indicator for Soil Quality. *SETAC Globe* 1, 30-32.

Waarde, J. van der, A. Derksen, A. Peekel, H. Keidel, J. Bloem, D. van Ree en H. Siepel, 1999. Risicobeoordeling van bodemverontreiniging met behulp van een TRIADE benadering met chemische analyses, bioassays en biologische veldinventarisaties. Deelresultaat 1. NOBIS projectnr. 98-1-28.

Geraadpleegde overige literatuur

Alloway, B.J., 1990. Heavy metals in soils. Blackie and Son Ltd. Glasgow/London.

Schachtschabel P. et al., 1992 *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

Bardgett, R.D., T.W. Speir, D.J. Ross, G.W. Yeates, H.A. Kettles, 1994. Impact of pasture contamination by copper, chromium, and arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. *Biol Fert Soils* 18: 71-79.

Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Poll* 47: 335-379.

Bååth E., 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenisation/centrifugation. *Soil Biol Biochem* 24: 1167-1172.

Chander, K, P.C. Brookes, 1991a. Microbial biomass dynamics during the decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non-contaminated soils. *Soil Biol Biochem* 23: 917-925.

Chander, K. en P.C. Brookes, 1991b. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. *Soil Biol Biochem* 23: 927-932.

Dahlin, S., E. Witter, A. Mårtensson, A. Turner and E. Bååth, 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1405-1415.

Darbyshire, J.F., R.E. Wheatly, M.P. Greaves, R.H.E. Inkson, 1974. A rapid micro method for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Rev Ecol Biol Soil* 11:465-475.

Garland, J.L., 1996a. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem* 28:213-221.

Garland, J.L., 1996b. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol Biochem* 28:223-230.

Giller, K.E., E. Witter and S. P. McGrath, 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 20: 1389-1414.

Haight, M, T. Mudry, J. Pasternak, 1982. Toxicity of seven heavy metals on *Panagrellus silusiae* the efficacy of the free-living nematode as an in vivo toxicological bioassay. *Nematologica* 28: 1-11.

Humphreys, M.O., M.K. Nicholls, 1984. Relationships between tolerance to heavy metals in *Agrostis capillaris* (*A. Tenuis* Sibth). *New Phytologist* 98: 170-190.

Huysman, F., W. Verstraete, P.C. Brookes, 1994. Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biol Biochem* 26: 103-110.

's Jacob, J.J., J. van Bezooijen, 1984. Practical work in nematology. Wageningen Agricultural University Press, Wageningen, The Netherlands.

Kandeler, E., C. Kampichler, O. Horak, 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils* 23: 299-306.

Korthals, G.W., A. van de Ende, H. van Megen, T.M. Lexmond, J.E. Kammenga, T. Bongers T., 1996a. Short-term effects of cadmium, copper, nickel and zinc on soil nematodes from different feeding and life-history strategy groups. *Appl Soil Ecol* 4: 107-117.

- Korthals, G.W., A.D. Alexiev, T.M. Lexmond, J.E. Kammenga, T. Bongers, 1996b. Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environ Toxicol Chem* 15: 979-985.
- Lancaster, J., 2000. The ridiculous notion of assessing ecological health and identifying the useful concepts underneath. *Human and Ecological Risk Assessment*, 6:213-222.
- Mesman, M., 2000. Inventarisatie onderzoek essentiële metalen m.n. koper en zink. Stageverslag Vrije Universiteit Amsterdam.
- Mudry T, M. Haight, J. Pasternak, 1982 – The effect of some heavy metals on the kinetics of pharyngeal pumping in *Panagrellus silusiae*. *Nematologica* 28: 12-20.
- Muyzer, G., E.C. de Waal, Ag. Uitterlinden, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Pitcher, R.S., D.G. McNamarra, 1972. The toxicity of low concentrations of silver and cupric ions to three species of plant parasitic nematodes. *Nematologica* 18: 385-390.
- Plette, A.C.C., 1996. Cadmium and zinc interactions with a Gram-positive soil bacterium. Ph.D.-thesis LUW.
- Santore, R.C, D.M. di Toro, P.R. Paquin, H.E. Allen and J.S. Meyer, 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environmental Toxicology en Chemistry*, 20:2397-2402.
- Slijkerman, D.M.E., C.A.M. van Gestel, N.M. van Straalen, 2000. Conceptueel kader voor de afleiding van ecotoxicologische risicogrenzen voor essentiële metalen. Rapport D00020, Instituut voor Ecologische Wetenschappen, afd Dierecologie, Vrije Universiteit Amsterdam
- Smith, RAH, A.D. Bradshaw, 1979. The use of metal-tolerant plant populations for the reclamation of metalliferous wastes. *J Appl Ecol* 16: 595-612.
- Technische Commissie Bodembescherming, 2000 a. Advies rol en betekenis bodemecosystemen in relatie tot NMP-4 en de Vijfde Nota Ruimtelijke Ordening.
- Technische Commissie Bodembescherming, 2000 b. Raamwerk voor Ecologische Inbreng.
- Valsecchi, G, C. Gigliotti, A. Farini, 1995. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils with heavy metals. *Biol Fert Soils* 20: 253-259.

Yeates, G.W., V.A. Orchard, T.W. Speir, J.L. Hunt, M.C.C. Hermans, 1994. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity. *Biol Fert Soil* 18: 200-208.

Weiss, B., O. Larink, 1991. Influence of sewage sludge and heavy metals on nematodes in an arable soil. *Biol Fert Soils* 12: 5-9.

Wenderoth DF, Reber HH. 1999. Development and comparison of methods to estimate the catabolic versatility of metal-affected soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 31(13): 1793-1802.

Aanhangsel 1 Koper en Zink in de bodem

Inleiding

In dit rapport wordt de meeste aandacht besteed aan Cu en Zn die kwantitatief de belangrijkste verontreinigende zware metalen zijn en kwalitatief vooral ook betekenisvol omdat zij in tegenstelling tot de meeste andere zware metalen biologisch noodzakelijk zijn.

Koper (Cu)

Dimensies en speciatie

Het gemiddelde gehalte aan Cu (atoommassa 64) in de bodem bedraagt 25 mg.kg^{-1} (81 kg.ha^{-1} , 9L) en hoeveelheden vanaf $\pm 3x$ het gemiddelde worden als potentieel toxisch gezien. Een gemiddelde verdeling van het bodemkoper over verschillende fracties ziet er als volgt uit: $>50\%$ opgesloten of geadsorbeerd in (aan) primaire (klei) mineralen en secundaire precipitaten, 30% organisch gebonden, 15% geadsorbeerd aan Fe- en Mn-oxiden, $1-2\%$ in de bodemoplossing geadsorbeerd aan DOC of als vrij ion, Cu^{++} ($\text{PH} \leq 6.9$) of $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$ ($\text{PH} = 7$). Het geadsorbeerde koper dat in oplossing gaat bij extractie met 0.01 M CaCl_2 is in de volgende rangorde afkomstig van de diverse fracties: organische stof $>$ Fe/Mn-oxiden $>>>$ (klei)mineralen. Deze met lichte extractiemiddelen te mobiliseren koperfractie wordt het beschikbare deel genoemd, dat mogelijk ook aan allerhande biologische processen kan deelnemen. In de bodem behoort Cu met Cr, Fe, Al en Pb tot de minst mobiele elementen. In de bodemoplossing kan de concentratie van het Cu variëren van 0.01 tot $0.6 \mu\text{M}$, terwijl concentraties $>1 \mu\text{M}$ toxisch zijn voor de wortels van de meeste soorten planten, concentraties $>1.5 \mu\text{M}$ voor alle soorten.

Biologische betekenis

Cu is een biologisch essentieel sporenelement dat, indien in te geringe mate aanwezig, tot gebreksziekten kan leiden bij micro-organismen, plant, dier en mens. Gewassen bevatten $5-20 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ droge stof, mensen $\pm 1.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ versgewicht en dienen met hun voedsel per dag $1-5 \text{ mg Cu}$ op te nemen. Cu speelt een belangrijke rol in enzymsystemen. Per hectare wordt met de oogst van een landbouwgewas $\pm 75 \text{ g Cu}$ afgevoerd. Cu-gebrek, ten opzichte van gewasgroei, doet zich voor wanneer minder dan 0.2 mg.kg^{-1} grond extraheerbaar is (0.7 kg.ha^{-1}) en kan worden gereduceerd door bodembemesting of bladbespuiting met $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Cu-gebrek doet zich vooral voor op arme zandgronden en veengronden en met name ook bij relatief hoge Mo-gehalten ($>5 \text{ mg.kg}^{-1}$) in de grond. In de plant wordt Cu zowel via hout (xyleem) als bast (floëem) getransporteerd, meestal gebonden aan aminozuren. De opname van Cu door de plant kan geremd worden door Ca^{++} , K^+ of NH_4^+ . Evenals in de grond is het koper in de plant relatief immobiel. De plant neemt het Cu op als Cu^{++} of $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$.

Rol als contaminant

In Nederland zijn invoer via grote rivieren als Rijn, Maas en Schelde (uiterwaarden), afspoeling van hoogspanningsleidingen, varkens/kippenmest, en zuiveringsslib de belangrijkste bronnen van contaminatie terwijl minerale mest en fungiciden slechts bescheiden bijdragen. Het Cu-gehalte in kunstmest bedraagt tot 100 mg.kg^{-1} . In Nederland is de contaminatie van bodem en oppervlaktewater vanaf midden jaren 80 aanzienlijk gereduceerd, vooral door afname van de met de Rijn geïmporteerde last ($>70\%$) en verlaging van het toegestane gehalte in als mest te gebruiken zuiveringsslib, maar de beoogde reductie van de Cu-toevoeging aan varkens- en kippenvoer is nog niet gerealiseerd. De netto invoer van Cu bedraagt in Nederland 50- tot 60 duizend ton.jaar⁻¹, de emissie naar het milieu bedroeg ooit $\pm 2500 \text{ ton} = \pm 0.55 \text{ kg.ha}^{-1}$, waarvan 85% in de bodem terecht kwam (1980); de verdeling van deze last is echter zeer inhomogeen: de met de rivieren geïmporteerde last komt bijvoorbeeld vrijwel geheel in de uiterwaarden terecht. Zuiveringsslib mag bij gebruik als kunstmest nog slechts 75 mg.kg^{-1} droge stof bevatten, een norm die vroeger in Nederland en ook in de ons omringende landen veel minder scherp was.

Zink (Zn)

Dimensies en speciatie

Het gemiddelde gehalte aan Zn (atoommassa 65) in de bodem bedraagt 50 mg.kg^{-1} (165 kg.ha^{-1} , 23L) en hoeveelheden vanaf 2 à 3 maal het gemiddelde worden als potentieel toxisch voor gewasgroei gezien. Het Zn komt in de bodem voor 1) opgesloten (ingebouwd) in mineralen en secundaire precipitaten, 2) geadsorbeerd (uitwisselbaar) aan klei, organische stof en Fe/Al-oxiden, 3) als Zn^{++} , ZnOH^+ en Zn-DOC opgelost in de bodemvloeistof. Het met lichte extractiemiddelen, b.v. 0.01 M CaCl_2 te mobiliseren Zn is het beschikbare deel dat mogelijk als Zn^{++} of ZnOH^+ aan biologische processen kan deelnemen. In de bodemoplossing varieert de Zn-concentratie meestal in het traject $3 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, van $\pm 150 \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.150 kg.ha^{-1}) bij hoge bodem pH en $\pm 7000 \mu\text{g.l}^{-1}$ (7.0 kg.ha^{-1}) bij lage pH.

Biologische betekenis

Zn is eveneens een biologisch essentieel sporenelement. Gewassen bevatten 25 – 150 mg Zn.kg^{-1} droge stof. Zn speelt evenals koper een belangrijke rol in enzymsystemen. Per ha wordt met de oogst van een landbouwgewas $\pm 400 \text{ g}$ afgevoerd. Zn-gebrek ten opzichte van gewasgroei zal zich voordoen wanneer minder dan 1.5 mg.kg^{-1} grond extraheerbaar (beschikbaar) is (5 kg.ha^{-1}) en kan worden gereduceerd met bodem- of bladbemesting (ZnSO_4). Zn-gebrek treedt vooral op in gronden met relatief hoge pH bij aanwezigheid van hoge gehalten carbonaten of fosfaten. Een Zn-P-antagonisme speelt zich af in de rhizosfeer. Bij lage pH kan zich een $\text{Zn}^{++}/\text{Fe}^{++}$, Mn^{++} antagonisme voordoen. In vergelijking met Cu is Zn in bodem en plant mobieler.

Rol als contaminant

Zn wordt in Nederland vooral aan de bodem toegevoegd met organische mest, atmosferisch etc. nabij Zn-verwerkende industrie (b.v. Budel), met minerale mest (vooral fosfaten), met zuiveringsslib en geïmporteerd via de grote rivieren.

Als antagonist van Cu toegevoegd aan veevoer (varkens, kippen) bevat vooral dierlijke mest van deze herkomst hoge gehalten Zn (tot 450 mg.kg^{-1} droge stof). De Zn-fabriek in Budel zorgde in een gebied van tientallen km^2 voor verhoogde Zn-gehalten in de bodem ($\pm 400 \text{ mg.kg}^{-1}$, 1300 kg.ha^{-1}). De gehalten aan Zn in fosfaatmeststof variëren maar kunnen oplopen tot 1.5 g.kg^{-1} . Aanvoer via de grote rivieren is sinds begin jaren 80 (± 12.000 ton per jaar) steeds verder gereduceerd ($> 80\%$). Ook in het zuiveringsslib is het gehalte aan Zn erg variabel maar inmiddels aan wettelijke normering onderhevig bij toepassing als organische mest ($= 300 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ droge stof), wat Europees gezien een zeer strenge norm is.

Aanhangsel 2 Chroom, Nikkel, Cadmium en Lood in de bodem

Algemeen

In tegenstelling tot Cu en Zn zijn Cr, Ni, Cd en Pb voor gewasontwikkeling en bodemecosysteem praktisch geen essentiële elementen, ook al is er voor met name Ni wel enige biologische relevantie aangetoond.

Dimensies, speciatie en biologische betekenis

Chroom is een element dat vooral de afgelopen 125 jaar in verhoogde mate in het milieu in circulatie is geraakt, met name vanuit de metaalindustrie en de lederbewerking. Het Cr-gehalte in bodems bedraagt 25-50 mg.kg⁻¹ (± 120 kg.ha⁻¹, 17 l.ha⁻¹) en heeft afgezien van sommige specifieke locaties (nabij leerlooierijen en galvanische industrie) niet de neiging te stijgen. Gehalten boven 75 mg.kg⁻¹ worden als potentieel toxisch voor gewasgroei beschouwd. In de bodem is Cr ongeveer even immobiel als Pb en in de plant komt het meestal niet verder dan de wortels. Het wordt dan ook slechts in zeer geringe mate opgenomen en gehalten liggen meestal ruim beneden 1 mg.kg⁻¹, maar kunnen op sterk Cr-gecontamineerde plaatsen bij lage pH etc. enige ordes van grootte hoger liggen. Cr kan in twee beschikbare vormen voorkomen: 1) onder omstandigheden van lage pH en niet erg hoge gehalten aan organische stof als Cr⁺⁺⁺ (Cr^{III}) en 2) bij hoge pH en zeer lage gehalten aan organische stof als het zéér toxische CrO₄²⁻ (Cr^{VI}). Het grootste deel van de globale depositie van Cr (± 65%) is van natuurlijke oorsprong.

Nikkel is een element dat in de metaalindustrie, dikwijls ook als legering, een rol speelt. De gemiddelde concentratie in bodems is 40 mg.kg⁻¹ (130 kg.ha⁻¹, 15 l.ha⁻¹). Door gewassen wordt Ni opgenomen en bereikt in de plant gehalten van gemiddeld 1mg.kg⁻¹ en wordt als potentieel toxisch voor gewasgroei gezien bij bodemgehalten vanaf 100 mg.kg⁻¹. Ni gedraagt zich in bodem en plant als een gangbaar min of meer mobiel metaal met een verhoogde beschikbaarheid als Ni⁺⁺ bij lagere pH. De geleidelijke stijging van het Ni-gehalte in bodems is voor het grootste deel van antropogene oorsprong (± 80%): brandstoffen (olie, steenkool), metaalverwerkende industrie, zuiveringslib en fosfaatmeststof.

Cadmium is een element dat pas recent versterkt in omloop is gekomen ten gevolge van industriële benutting, b.v. vanuit plastics en coatings, bij verbranding van fossiele brandstoffen en vanuit de metaalindustrie in het bijzonder zinksmelterijen en ook vanuit zuiveringslib en fosfaatmeststoffen. Het Cd-gehalte in de bodem bedraagt gemiddeld 0.30 mg.kg⁻¹ (1.0 kg.ha⁻¹, 115 ml.ha⁻¹) en gehalten boven 3 mg.kg⁻¹ (± 10 kg.ha⁻¹) worden als potentieel toxisch voor gewasgroei gezien. In de bodem en in de plant gedraagt Cd zich min of meer zoals Zn, is het even mobiel en neemt de beschikbaarheid, in de bodemoplossing, dus toe bij dalende pH en af bij stijgende pH en toenemend organische stofgehalte, klei- fosfaat of Fe/Mn-oxide. De gehalten Cd in bodem en plant liggen dus één tot drie ordes van grootte lager dan die van de overige besproken zware metalen. De toxiciteit van Cd ten opzichte van mensen en

dieren (ophoping in de nieren) is relatief hoog, vergeleken met die ten opzichte van planten en bodemecosystemen waarbij het Cd toxisch is in concentraties (activiteiten) die vergelijkbaar zijn met andere zware metalen. Mede hierdoor kan de 'itai-itai'-ziekte in Japan, veroorzaakt door de consumptie van Cd-gecontamineerde rijst, over een langere tijd zoveel slachtoffers maken.

Lood is een element dat al van oudsher in menselijke samenlevingen werd gebruikt, bijvoorbeeld door de Romeinen ten behoeve van de watergeleiding. In ongestoorde historische bodemlagen is de toename van het Pb-gehalte sinds de prehistorie goed te traceren. Omdat het bij botvorming de plaats van calcium kan innemen is het Pb-gehalte van menselijke botten dan ook sterk stijgend sinds duizenden jaren. Het wordt vooral gebruikt in de metaalindustrie, is bestanddeel van verf, wordt (werd) gebruikt als antiklop middel in benzine, vormt het belangrijkste bestanddeel in accu's en wordt als bestrijdingsmiddel gebruikt in de vorm van loodarsenaat. Het gehalte in de bodem bedraagt $\pm 50 \text{ mg.kg}^{-1}$ (165 kg.ha^{-1} , 15 l.ha^{-1}). Potentieel toxisch voor gewasgroei worden gehalten vanaf 100 mg.kg^{-1} beschouwd. In bodem en in plant gedraagt Pb zich zeer immobiel en bindt zich sterk aan klei, organische stof, Fe/Mn-oxiden en vooral ook aan fosfaat; het hoopt zich dan ook vooral op in de bovenste bodemlagen. Omdat het door planten slecht opgenomen wordt en zich vooral door de lucht (verkeer) verspreidt als loodstof, vindt contaminatie van gewassen meestal plaats door bovengrondse contaminatie van het loof. In de plant worden gehalten vanaf 30 mg.kg^{-1} als kritisch gezien. In de bodemoplossing stijgt het gehalte aan Pb^{++} bij dalende pH en daalt bij stijgende pH, overmatige fosfaatbemesting en incorporatie van organische stof in de grond. Omdat het ook als fijn loodstof gesuspendeerd voorkomt in de bodemoplossing dient voorafgaande aan een loodopgelost bepaling de oplossing zorgvuldig gefilterd te worden. Ten opzichte van het bodemecosysteem behoort Pb in de praktijk tot de minst toxische zware metalen maar is bij voldoende hoge activiteit (Pb^{++} -conc.) uiteraard toxisch ten opzichte van bodemorganismen en processen.