Effecten van verontreinigde sedimenten op bioturbatie en reproduktie van aquatische Oligochaeta

L.R.M. de Poorter

1989

Vakgroep Toxicologie
Landbouwuniversiteit Wageningen

in opdracht van
Dienst Binnenwateren/RIZA te Lelystad

2200170

VOORWOORD

Dit rapport beschrijft een onderzoek ter bepaling van effecten van verontreinigde sedimenten op oligochaete wormen. Dit onderzoek, dat past binnen de doelstellingen van het Rijnactieprogramma, werd uitgevoerd in opdracht van de Dienst Binnenwateren/RIZA te Lelystad. Het maakt deel uit van het programma "Ecologisch Herstel Rijn", waarin de Dienst Binnenwateren/RIZA, het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne en het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek samenwerken.

Dit onderzoek is tot stand gekomen dankzij de medewerking van diverse personen, waarvan ik een aantal met name wil noemen. Hans van den Berg (Toxicologie, LUW) assisteerde bij de practische werkzaamheden voor dit onderzoek, Ria Mulder (Biologie, DBW/RIZA) verzorgde de determinatie van de wormen en Bobo Freeke (Fotolocatie de Dreyen, LUW) verzorgde de advisering en werkzaamheden op fotografisch gebied. Piet Verdonschot (Rijksinstituut voor Natuurbeheer, Leersum) gaf waardevolle informatie over oligochaete wormen. Kees van de Guchte (Ecotoxicologie, DBW/RIZA) en James Everts (Toxicologie, LUW) begeleidden dit project en gaven, evenals prof. dr. J.H. Koeman (Toxicologie, LUW), adviezen bij het tot stand komen van dit verslag. Ik bedank hen en alle anderen, die op enige wijze aan dit onderzoek hebben bijgedragen, voor hun medewerking.

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING 1

SUMMARY 2

1 INLEIDING 3

2 BIOTURBATIE 4

2.1 Inleiding 4

2.2 Materiaal en methoden 6

2.3 Resultaten 11

2.3.1 Inleiding 11

2.3.2 IJsselmeersediment 12

2.3.3 Ketelmeersediment 13

2.3.4 Haringvlietsediment 16

2.4 Discussie 20

2.5 Conclusies 24

3 REPRODUKTIE 26

3.1 Inleiding 26

3.2 Materiaal en methoden 26

3.3 Resultaten 29

3.3.1 Inleiding 29

3.3.2 IJsselmeersediment 29

3.3.3 Ketelmeersediment 31

3.3.4 Haringvlietsediment 34

3.4 Discussie 36

3.4.1 Overleving 36

3.4.2 Coconproduktie 37

3.4.3 Eiproduktie 37

3.4.4 Eieren per cocon 38

3.4.5 Reproduktie en sedimentkarakteristieken 39

3.4.6 Literatuurgegevens over effecten op overleving, groei en reproduktie 40

3.5 Conclusies 42

4 TOETSPROTOCOLLEN 43

4.1 Inleiding 43

4.2 Bepaling van de toxische effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de bioturbatie door Peloscolex ferox (Tubificidae) 44

4.3 Bepaling van de toxische effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de reproduktie van Peloscolex ferox (Tubificidae) 51

5 AANBEVELINGEN 57

LITERATUUR 59

BIJLAGEN 63

SAMENVATTING

De toxiciteit van verontreinigde sedimenten uit IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet voor aquatische wormen (Oligochaeta) werd bestudeerd met Oostvaardersplassensediment als referentie. De experimenten werden uitgevoerd bij een sediment-water volumeverhouding van 1:1. Effecten op overleving, bioturbatie (menging van het sediment) en reproduktie werden bestudeerd bij verschillende mengsels van het verontreinigde sediment met het referentiesediment.

De overleving en bioturbatie werden bestudeerd aan een mengsel van Oligochaeta-soorten bij een blootstellingsduur van 5 dagen. Er werden geen negatieve effecten op de overleving van de wormen gevonden. Bij een sedimentvolume-aandeel van 67 % van Haringvlietsediment werd op de vierde waarnemingsdag een statistisch significant lagere bioturbatie t.o.v. de referentie gevonden. Alleen bij Haringvlietsediment waren er trends aanwezig die duidden op mogelijke negatieve effecten op de bioturbatie.

Na een blootstelling van drie weken werd voor de coconproduktie van Peloscolex ferox (Tubificidae) en voor de coconinhoud een statistisch significante afname t.o.v. het referentiesediment gevonden bij resp. Ketelmeer- (volume-aandelen 50 en 100 %) en Haringvlietsediment (volume-aandeel 100 %). Bij alle sedimenten vertoonden de cocon- en eiproduktie een trend tot afname bij een toename van het volume-aandeel van de sedimenten. Bij Haringvlietsediment was dit eveneens het geval voor de coconinhoud.

De gevonden trends in de verschillende bestudeerde parameters kunnen duiden op toxische effecten van de verontreinigingen in de sedimenten. Andere mogelijke oorzaken voor deze trends worden bediscussieerd.

Op basis van de resultaten van het reproduktie-experiment lijken langdurige toetsen met Oligochaeta geschikt voor de bepaling van mogelijk toxische effecten van verontreinigde sedimenten. De resultaten van dergelijke experimenten kunnen een belangrijke rol spelen bij de normering van verontreinigingen in waterbodems.

SUMMARY

Effects of contaminated sediments on bioturbation and reproduction of aquatic Oligochaeta.

Survival, bioturbation and reproduction of aquatic Oligochaeta were examined in bioassays using contaminated sediment from IJsselmeer, Ketelmeer and Haringvliet with sediment from Oostvaardersplassen as a reference. Experiments were conducted at a sediment-water volume ratio of 1:1. Effects were examined at different sediment volume ratios of the contaminated sediment and the reference sediment.

Survival and bioturbation were studied in assays which lasted 5 days using a mixture of Oligochaeta species. None of the sediments affected worm survival. In the Haringvliet sediment assay a statistically significant reduction of bioturbation compared with the reference was found on day 4 at 67 % Haringvliet sediment. Only in this assay trends were found which may be indicative of possibly negative effects on bioturbation.

After a 3 weeks exposure cocoon production of Peloscolex ferox (Tubificidae) and cocoon contents were statistically significant reduced in Ketelmeer (sediment volumes 50 and 100 %) and Haringvliet sediment (100 %), respectively. In all sediments cocoon and egg production showed a negative trend with an increasing volume percentage of the contaminated sediment. This trend was also found for the cocoon contents of cocoons produced in Haringvliet sediment.

The negative trends found in bioturbation and reproduction may be indicative of toxic effects of contaminants in the sediments. Other possible causes of these trends are discussed.

Based on the reproduction experiment long-term assays using Oligochaeta may be appropriate for the determination of possibly toxic effects of contaminated sediments. The results of such assays can support the determination of sediment quality criteria.

1 INLEIDING

De bodem van veel Nederlandse rivieren en andere binnenwateren is verontreinigd met zware metalen en organische microverontreinigingen. De waterbodem speelt een belangrijke rol in het aquatische milieu. Het is de plek waar veel plant- en diersoorten hun stand- of rustplaats vinden. Elementen van de waterbodem vormen tevens voedsel voor deze soorten. De benthisch levende organismen vormen op hun beurt weer het voedsel van vissen en vogels, zodat verontreinigingen uit de waterbodem via de voedselketen buiten het aquatische milieu terecht kunnen komen. Verontreinigingen in de waterbodem kunnen dus zowel een bedreiging vormen voor organismen binnen als buiten het aquatische milieu.

Voor het vaststellen van een normering voor verontreinigingen in waterbodems kan gebruik gemaakt worden van experimenten met organismen die in het sediment-water grensvlak leven. Deze experimenten kunnen inzicht geven in de biologische beschikbaarheid van de aanwezige verontreinigingen en de mogelijke effecten op deze organismen onder bekende omstandigheden (van de Guchte & Hooftman, in druk).

Aquatische Oligochaeta zijn wormen, die in vrijwel alle zoetwatersedimenten voorkomen. Ze bevinden zich in de bovenlaag van het sediment en nemen door hun voedingswijze grote hoeveelheden sediment op. Hierdoor staan ze, zowel in- als uitwendig, in nauw contact met verontreinigingen in sedimenten. Daarnaast spelen deze organismen een belangrijke rol in het aquatische milieu doordat hun wijze van voedselopname leidt tot omwoeling van de bovenlaag van het sediment (bioturbatie), waardoor o.a. afbraak- en uitwisselingsprocessen beïnvloed worden.

De doelstelling van dit onderzoek was het vaststellen van effecten van verontreinigde sedimenten op de benthisch levende Oligochaeta. De hiertoe bestudeerde parameters waren overleving, bioturbatie-activiteit en reproduktie. De verontreinigde sedimenten waren afkomstig uit het IJsselmeer, het Ketelmeer en het Haringvliet, terwijl als referentie Oostvaardersplassensediment werd gebruikt.

2 BIOTURBATIE

2.1 Inleiding

Aquatische wormen, vooral Tubificidae en Lumbriculidae, spelen een belangrijke rol bij de menging van de bovenlagen van sedimenten in meren en vijvers (Robbins et al., 1984). Deze bioturbatie (menging van sedimenten door de activiteit van gravende benthische organismen) wordt o.a. verkregen doordat tubificide wormen over het algemeen sedimentdeeltjes opnemen tot maximaal 10 cm onder het sediment-water grensvlak (McCall & Fisher, 1980). De werkelijke voedingsdiepte van de wormen is echter een complexe functie van biotische (wormlengte, populatiedichtheid, soortsamenstelling, bacterieregeneratiesnelheid) en abiotische factoren (temperatuur, korrelgrootteverdeling en chemie van het sediment) (McCall & Fisher, 1980; White et al., 1987).

De onder het sediment-water oppervlak opgenomen sedimentdeeltjes (vnl. $\phi < 100$ µm) bevatten organische detritusdeeltjes en bacteriën, die als voedselbron voor de wormen dienen. De onverteerde delen worden als faecale pellets bovenop het sediment-water grensvlak worden afgezet, zodat er menging van de bovenste sedimentlaag optreedt.

De diepte waar de maximale voedselopname plaatsvindt, is bepalend voor de diepte tot waar deze menging vooral zal optreden (Appleby & Brinkhurst, 1970; McCall & Fisher, 1980). McCall & Fisher (1980) vermelden dat de meeste onderzoeken aantoonden dat de diepte met maximale voedselopname overeenkomt met de diepte met maximale wormabundantie. Robbins (1982) vond voor zowel de diepte waarboven zich 90% van het benthos (vnl. oligochaeten) bevond als voor de C-flux naar het sediment een lineaire relatie met de gemengde diepte (wanneer deze diepte resp. werd uitgedrukt in cm en g m^{-2}). De resultaten van Appleby & Brinkhurst (1970) wijzen er echter op dat er een betere overeenkomst met de diepte met maximale wormbiomassa lijkt te bestaan.

De in de literatuur genoemde diepten tot waar menging van het sediment optreedt, lopen waarschijnlijk als gevolg van verschillen in biotische en abiotische factoren sterk uiteen. Davis (1974) vond belangrijke verstoringen van de gelaagdheid van het sediment tot op een diepte van 12 cm t.g.v. de activiteit van tubificiden. Krezoski et al. (1978) vonden op twee locaties in Lake Huron met voornamelijk amphi-

poden en oligochaeten dat menging tot resp. 3 en 6 cm plaatsvond. Deze verschillen in diepte werden verklaard door verschillen in de dichtheid van de oligochaeten, waarbij deze voornamelijk tot resp. 2 en 4 cm in de bodem doordrongen. In de Laurentian Great Lakes leidde bioturbatie door vnl. oligochaeten (38.000 m^{-2}) tot een sterke menging van de bovenste 9 cm van het sediment (Robbins, 1982).

Bioturbatie speelt een belangrijke rol bij de afbraak van organisch materiaal en de mineralisatie (Hargrave, 1976; Higler, 1985). Een uitgebreid overzicht van effecten van bioturbatie wordt gegeven door Krantzberg (1985). Deze effecten hebben betrekking op:

-de stratificatie van het sediment,
-de deeltjesgrootte, de porositeit en de schuifspanning van het sediment,
-de turbiditeit van de waterkolom,
-het zuurstofgehalte en de doordringing van de redoxpotentiaal discontinuïteit in het sediment,
-de zuurgraad in het sediment,
-de stikstof- en fosfordynamiek,
-de distributie en -dynamiek van metalen en organische microverontreinigingen in sediment en water,
-de distributie, de aantallen en het metabolisme van micro-organismen.

Factoren die van invloed zijn op de bioturbatiesnelheid zijn sedimenttype (fysisch/chemische samenstelling), voedselaanbod (beschikbare koolstof), temperatuur, zuurstofconcentratie, wormsoort, interacties binnen de levensgemeenschap (o.a. dichtheid) en levensstadia (ref. Robbins et al., 1984). De geochemie van het sediment en de geassocieerde bacteriën beïnvloeden zowel de verdeling en abundantie van de verschillende Oligochaeta-soorten (ref. White et al., 1987) als de snelheid, waarmee het voedsel door het darmkanaal passeert (Petr, 1976).

Volgens Lee & Swartz (1980) kan de opname van sediment door oligochaete wormen 18 - 302 kg m^{-2} $jaar^{-1}$ bedragen. White et al. (1987) bepaalden de bioturbatie-activiteit van de oligotrofe soort Stylodrilus heringianus in Lake Michigan sediment. Dit gebeurde door de daalsnelheid van een op het sedimentoppervlak aangebrachte gelabelde laag te bepalen. Zij vonden dat de activiteit per worm niet dichtheidsafhankelijk was (0.73 - 2.16 $x10^{-5}$ cm u^{-1} $worm^{-1}$ bij 10 ^{o}C bij dichtheden van

3 - 134 $x10^3$ m^{-2}). De temperatuur van het water nabij de bodem van de Great Lakes bedraagt echter het gehele jaar ca. 4 °C. Een langzame afname van de temperatuur tot 4 °C tijdens het experiment leidde tot een afname van de activiteit (-0.04 - 0.21 $x10^{-5}$ cm u^{-1} $worm^{-1}$). Dit kwam overeen met een gemiddelde snelheid van $0.78x10^{-2}$ cm $worm^{-1}$ $jaar^{-1}$ (= 0.15 g droge stof). Bij een dichtheid van $100x10^3$ wormen m^{-2} leidt dit tot een sedimentopname van gemiddeld 150 kg m^{-2} $jaar^{-1}$. Gegevens van andere onderzoekers, die experimenten uitvoerden bij temperaturen tussen 10 en 20 °C en waaruit de snelheid bij 4 °C werd afgeleid, lieten echter snelheden van 1 - 1.44 g droge stof $worm^{-1}$ $jaar^{-1}$ zien.

Studies naar de effecten van verontreinigingen op de bioturbatie zijn van belang omdat aangenomen wordt dat biologische menging, in combinatie met resuspensie, een belangrijke rol kan spelen in de persistentie van verontreinigingen in de waterkolom (Robbins, 1982; Thomann & Di Toro, 1983). Anderzijds kan bioturbatie leiden tot opname van verontreinigingen in het sediment en bioaccumulatie door benthische organismen (Södergren, 1985).

De doelstelling van de uitgevoerde experimenten was het bepalen van mogelijke effecten van de verontreinigingen in sedimenten uit IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet op de overleving en bioturbatie-activiteit van benthische wormen.

2.2 Materiaal en methoden

Sedimentbehandeling en -opslag

Sediment uit de Oostvaardersplassen (referentiesediment), het IJsselmeer, het Ketelmeer en het Haringvliet werd door Rijkswaterstaat verzameld en opgeslagen bij een temperatuur van 4 °C. Er werden monsters van genomen ter bepaling van de sedimentkarakteristieken. De analyseresultaten waren bij het verschijnen van dit rapport echter nog niet beschikbaar, zodat ze later aan dit rapport zullen worden toegevoegd (Bijlage X).

Na transport naar Wageningen werden de sedimenten gezeefd m.b.v. een borstel over zeven met een maaswijdte van resp. 750 en 250 µm ter verwijdering van eventueel aanwezige grove delen en organismen (o.a. wormen en eicocons). De gezeefde sedimenten werden opgeslagen bij 2 °C

tot het gebruik in de experimenten. De droogresten van de sedimenten werden bepaald door deze 24 u te drogen bij 105 °C.

Inzetten van de testsystemen

Alle handelingen die tijdens de uitvoering van de experimenten werden verricht, worden hierna uitgebreid beschreven. Een samenvatting hiervan wordt gegeven in tabel 2.1.

In 1 l polyethyleenpotten werden sedimentsuspensies in Dutch Standard Water (Bijlage I) met een totaalvolume van 650 ml bereid. Deze leverden na 24 u schudden bij 20 °C en na 3 dagen bezinken in volglasbakjes van ca. 10x10x10 cm een sedimentlaag van 4-4½ cm op met een waterkolom van ca. 4 cm. De bereidde sedimentsuspensies voor elk experiment bestonden uit mengsels van het relatief schone Oostvaardersplassensediment met één van de overige sedimenten (Bijlage II), zodat na bezinken het volume-aandeel van het te toetsen sediment aan de sedimentkolom 0, 33, 67 of 100 % bedroeg. Elke suspensie werd in triplo bereid. De suspensies werden na het schudden overgebracht in de eerder genoemde volglasbakjes met daarin een bekerglaasje van 50 ml. Op de functie van deze bekerglaasjes zal later worden ingegaan (zie Registratie en bepaling van bioturbatie-activiteit). Bij het experiment met het IJsselmeersediment werden in plaats van bekerglaasjes glazen cilinders gebruikt, die aan één uiteinde langs de cilinderwand van inkepingen voorzien waren. Deze werden na 2 dagen bezinken in het sediment geplaatst met de inkepingen in de waterkolom. De testsystemen stonden opgesteld in een geklimatiseerde ruimte met een temperatuur van 20-21 °C met een dag-nacht cyclus van 16 u/8 u.

Nadat de suspensies gedurende 2½ dag waren bezonken, werd de waterkolom continu met perslucht doorborreld. Uit een laboratoriumkweek (Bijlage III) werd m.b.v. een zeef met een maaswijdte van 250 µm een mengsel van wormen van verschillende soorten verzameld. De wormen werden geteld en per 40 stuks tesamengevoegd (bij het experiment met IJsselmeersediment 50 stuks). Een halve dag na het starten van het doorborrelen met perslucht werd in elk testsysteem een groep wormen op het sedimentoppervlak gebracht m.b.v. een pipetje. Nadat de wormen zich gedurende de daarop volgende avond en nacht in het sediment hadden kunnen ingraven, werd de volgende ochtend per testsysteem 30 g glasparels (ø 160-250 µm) over het sedimentoppervlak verdeeld. Dit laagje

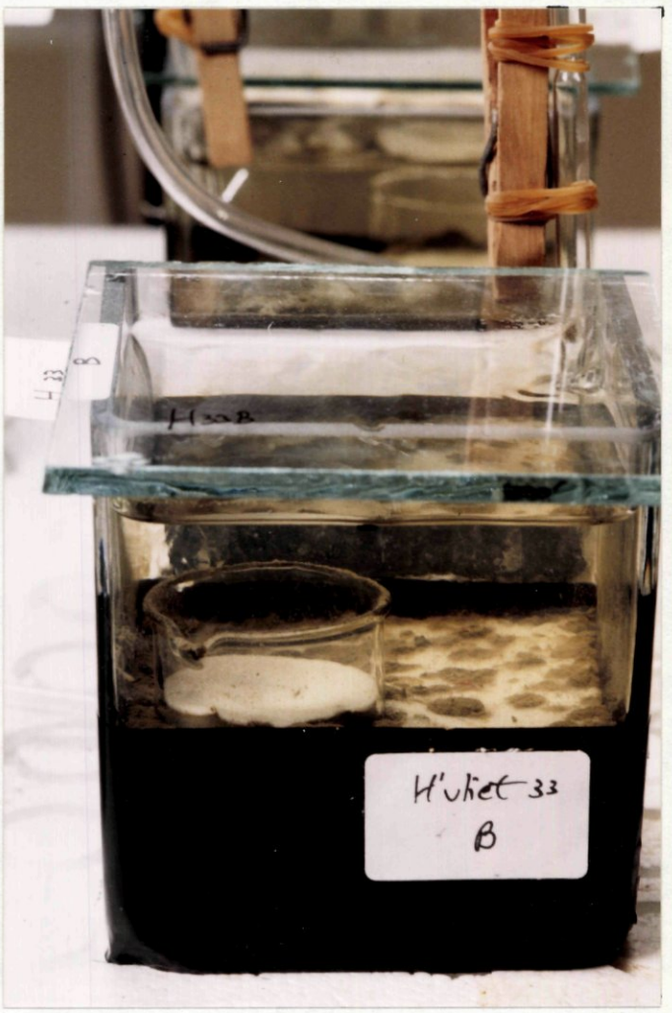
(dikte ca. 2 mm) diende als contrastlaag om de door de wormen geproduceerde en op het sedimentoppervlak afgezette faecale pellets zichtbaar te maken.

Tijdens het experiment werden de wormen niet gevoerd, terwijl elke 48 u het uit de testsystemen verdampte water aangevuld werd met demiwater.

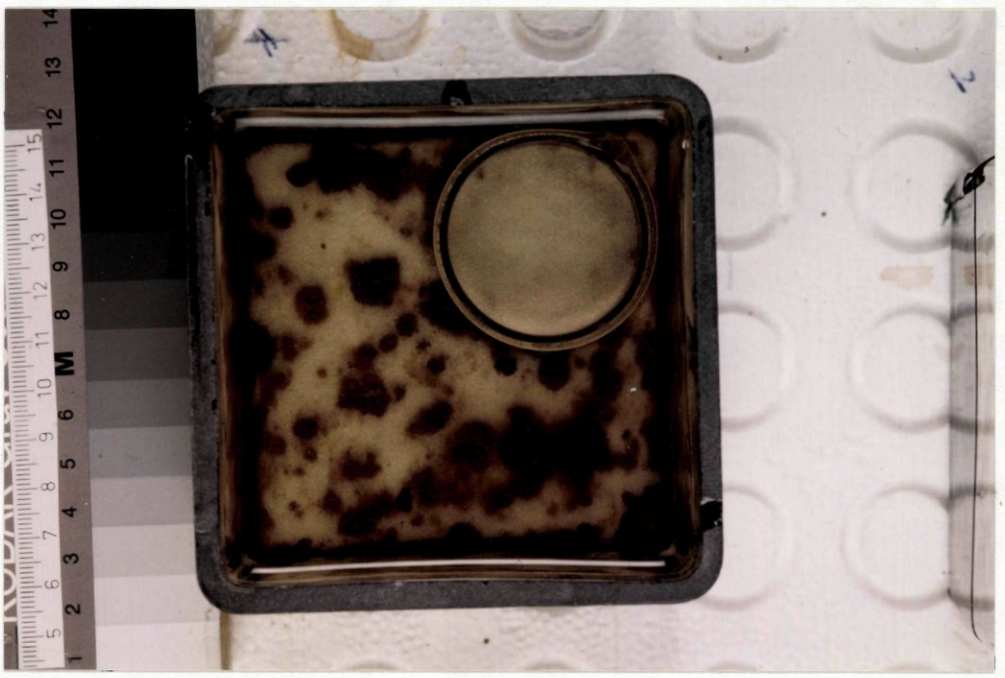
Registratie en bepaling van bioturbatie-activiteit

Vanaf één dag na toevoeging van de glasparels werd iedere 24 u gedurende 5 dagen (experiment met IJsselmeersediment: 4 dagen) de vorming van de faecale pellets gevolgd door foto-opnamen van het sedimentoppervlak te maken. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een spiegelreflexcamera, voorzien van een macro-lens (brandpunt 105 mm), met een zwart-wit negatieffilm (AGFA Ortho 25). De camera hing aan een horizontaal bevestigd statief, waarmee deze loodrecht boven elk bakje geplaatst kon worden. Bij elke opname werd een grijstrap (Kodak grey scale) naast en een witte pyramide van transparant kunststof op het te registreren bakje geplaatst. Deze pyramide werd van twee zijden belicht m.b.v. twee lampen (500 W halogeenlampen) (Figuur 2.1a-c). Alle films van een experiment werden tegelijkertijd ontwikkeld m.b.v. een ontwikkelmachine. De negatieven werden afgedrukt op fotopapier (hardheidsgradatie 4, afdrukschaal 1 : 1.25), waarbij voor de verschillen in de tinten van de grijstrap gecorrigeerd werd m.b.v. een aan de vergroter gekoppelde meetcel. De opnamen van het Haringvlietexperiment werden afgedrukt op gradatie 3, omdat de films na ontwikkelen zwaardere negatieven opleverden dan bij de andere experimenten. Hierdoor werden afdrukken verkregen met dezelfde grijstinten als bij de twee andere experimenten.

(a)



(b)



(c)

Figuur 2.1. (a) Opstelling voor registratie van het contrastlaagoppervlak, (b) zijaanzicht van een testsysteem en (c) een geregistreerd contrastlaagoppervlak met grijstrap.

Op de foto's werd de totale oppervlakte van de contrastlaag, die bedekt werd door faecale pellets, bepaald d.m.v. een beeldanalyseapparaat (Bijlage IV). De detectiegrens, die hierbij gebruikt werd, leidde tot detectie van alle grijstinten donkerder dan grijstrap nr. 6 (1/3 stop onder 18 % reflectie; zie figuur 2.1b). Het contrastlaagje in de bekerglaasjes diende als referentiepunt voor de grijstint van de ongestoorde contrastlaag, zodat bij de oppervlaktebepalingen gecorrigeerd zou kunnen worden voor eventueel aanwezige verschillen in de kleur van de waterkolom. Bij de oppervlaktemetingen werden echter geen correcties m.b.v. de referentiepunten uitgevoerd. Op basis van 14 opnamen van een testsysteem met 67 % Haringvlietsediment op dag 4, waarbij de fotolampen en de pyramide telkens opnieuw op hetzelfde testsysteem werden geplaatst en de camera steeds opnieuw werd scherpgesteld, werd een variatiecoëfficiënt gevonden van 2.3 % bij een gemiddelde oppervlakte van 3331 mm^2.

Overige waarnemingsparameters

Vijf dagen na het aanbrengen van de contrastlaag werd de overleving van de wormen bepaald door ze uit het sediment te zeven m.b.v. een spoelgoot (Bijlage V) en ze op te vangen op een zeef met een maaswijdte van 125 µm. Na telling werden de wormen ter lediging van hun darmkanaal gedurende 1 dag in 10 ml water geplaatst dat afkomstig was uit hun testsysteem. Vervolgens werd de groepsmassa in duplo bepaald door de wormen op muskietengaas gedurende 15 sec. op een papieren filter te leggen, waarna ze overgebracht werden in een getarreerd bakje met water op een analytische balans. Voor de bepaling van de groepsmassa's bij het experiment met IJsselmeersediment werden andere materialen gebruikt, zodat deze massa's niet vergelijkbaar zijn met die bij de andere experimenten.

Tijdens de experimenten werden de zuurgraad en de zuurstofconcentratie in de waterkolom van de testsystemen iedere 24 u geregistreerd vanaf de dag van toevoegen van de contrastlaag.

Statistische verwerking

De verschillen in de aantallen teruggevonden wormen, de groepsmassa's en de door faecale pellets bedekte oppervlakten van de contrastlaag werden op significantie getoetst m.b.v. variantie-analyse (ANOVA).

Ter vaststelling van significante verschillen tussen de hierbovengenoemde parameters bij de testsystemen met het verontreinigde sediment t.o.v. de referentiesystemen werd Dunnett's procedure (Steel & Torrie, 1980) toegepast. Eveneens werd getoetst of er sprake was van een significante lineaire relatie tussen het volumepercentage van het verontreinigde sediment en de door faecale pellets bedekte oppervlakten. Bij alle toetsen werd een onbetrouwbaarheidsdrempel van 5% gehanteerd.

Tabel 2.1. Samenvatting van de tijdens de bioturbatie-experimenten uitgevoerde handelingen.

Dag		Handelingen: Diversen	Handelingen: pH/O_2	Handelingen: Fotografie
1		Suspensies inzetten en schudden		
2		Suspensies bezinken in testsystemen		
3		Idem		
4		Perslucht installeren; telling wormen en toevoegen aan eind van de dag		
5		Contrastlaag toevoegen aan begin van de dag	x	
6	1[a]			x
7	2[a]		x	x
8	3[a]			x
9	4[a]		x	x
10	5[a]	Terugtelling wormen		x[b]
11		Massabepaling wormgroepen		

[a] Dagnummers zoals gebruikt bij de bespreking van de bioturbatie-activiteit in de onderdelen 2.3 t/m 2.5.
[b] Niet uitgevoerd bij het experiment met IJsselmeersediment.

2.3 Resultaten

2.3.1 Inleiding

De waarnemingen van de chemische parameters, de overleving en groepsmassa's van de wormen en de oppervlaktemetingen bij bioturbatie-experimenten met de sedimenten van IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet zijn weergegeven in de bijlagen VI en VII.

2.3.2 IJsselmeersediment

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

Zowel aan het begin als aan het eind van het experiment bleek de zuurgraad een trend tot afname te vertonen bij een toenemend aandeel van het IJsselmeersediment. De zuurgraad bedroeg toen resp. 8.7±0.1 en 8.6±0.1 bij de testsystemen met 100 % Oostvaardersplassensediment en 8.4±0.1 en 8.1±0.1 bij de testsystemen met 100 % IJsselmeersediment.

De zuurstofconcentratie was aan het begin en eind van het experiment bij de verschillende mengsels van dezelfde orde van grootte en bedroeg gemiddeld resp. 8.1±0.2 en 7.9±0.4 mg l^{-1}. Deze relatief hoge zuurstofconcentraties leidden ertoe dat de wormen zich geheel in het sediment bevonden, zodat ze dus niet de bij lage zuurstofconcentraties karakteristieke golfbewegingspatronen met het achterlijf in de waterkolom vertoonden.

Overleving en groepsmassa's

Het gemiddelde aantal teruggevonden wormen na een verblijf van 5 dagen in de verschillende sedimentmengsels is weergegeven in tabel 2.2.

Tabel 2.2. Gemiddeld aantal teruggevonden levende wormen en de gemiddelde groepsmassa (mg) aan het eind van het experiment (± standaarddeviatie; n=3) bij de verschillende volumepercentages van IJsselmeersediment na menging met Oostvaardersplassensediment.

Volume-percentage	Aantal wormen[a]	Groepsmassa[b]
0[c]	57.7±1.2	174± 4
33	56.3±3.1	187±27
67	55.3±4.9	189±32
100	55.7±2.9	184±18

[a] Toegevoegd aantal: 50 stuks.
[b] Afwijkende bepalingsmethode t.o.v. de andere experimenten (zie p. 10: Overige waarnemingsparameters).
[c] 100 % Oostvaardersplassensediment.

Er kon geen significant verschil worden aangetoond in het aantal wormen bij de verschillende volumepercentages (ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden eveneens geen significante

verschillen op ($P > 0.05$). Een opmerkelijk resultaat was dat er meer wormen werden teruggevonden dan de toegevoegde 50 stuks per herhaling.

De gemiddelde massa's van de groepen wormen per behandeling zijn eveneens weergegeven in tabel 2.2. De gemiddelde groepsmassa's bij de verschillende volumepercentages waren niet significant verschillend (ANOVA, $P > 0.05$). Eenzelfde resultaat werd gevonden voor de paarsgewijze vergelijkingen met de referentie.

Bioturbatie-activiteit

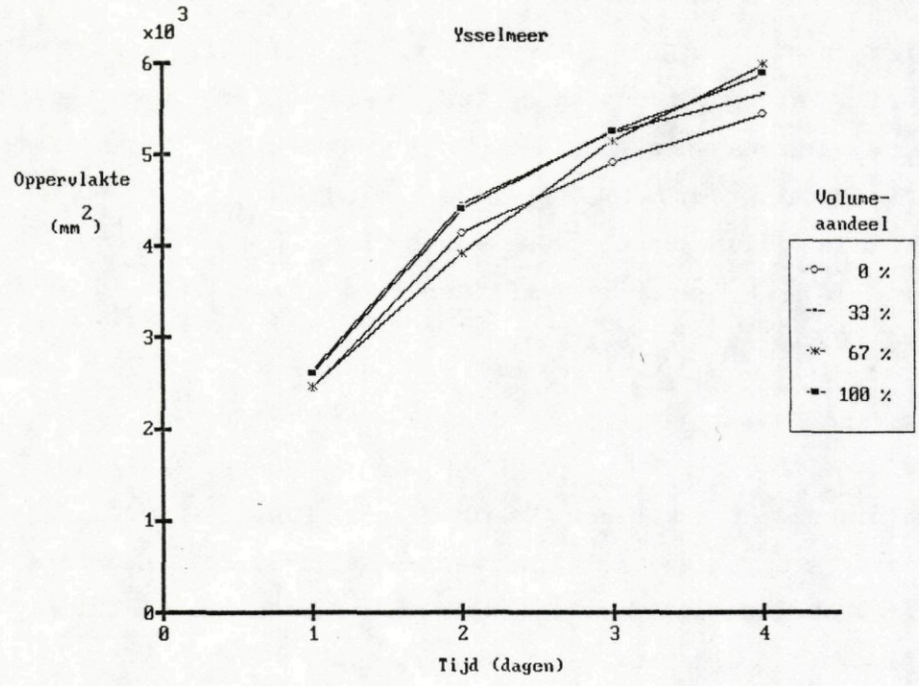
Figuur 2.2a toont de oppervlakten van de contrastlaag, die op de achtereenvolgende dagen bedekt werden door faecale pellets bij de verschillende sedimentmengsels. Na een bijna lineaire toename gedurende de eerste twee dagen van het experiment vond er een afvlakking van het verloop plaats bij alle sedimentmengsels.

De relatie tussen het volumepercentage van het IJsselmeersediment en de gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakte op de verschillende dagen is weergegeven in figuur 2.2b. Er bleek geen duidelijke trend aanwezig te zijn in de oppervlakten bij een toenemend aandeel van het IJsselmeersediment. Er kon dan ook op geen enkele dag een significant verschil in de oppervlakten bij de verschillende volumepercentages worden aangetoond (ANOVA, $P > 0.05$). Eenzelfde resultaat werd verkregen bij de paarsgewijze vergelijkingen met de referentie. De gemiddelde oppervlakten waren eveneens niet significant lineair gerelateerd aan de volume-aandelen van het IJsselmeersediment.

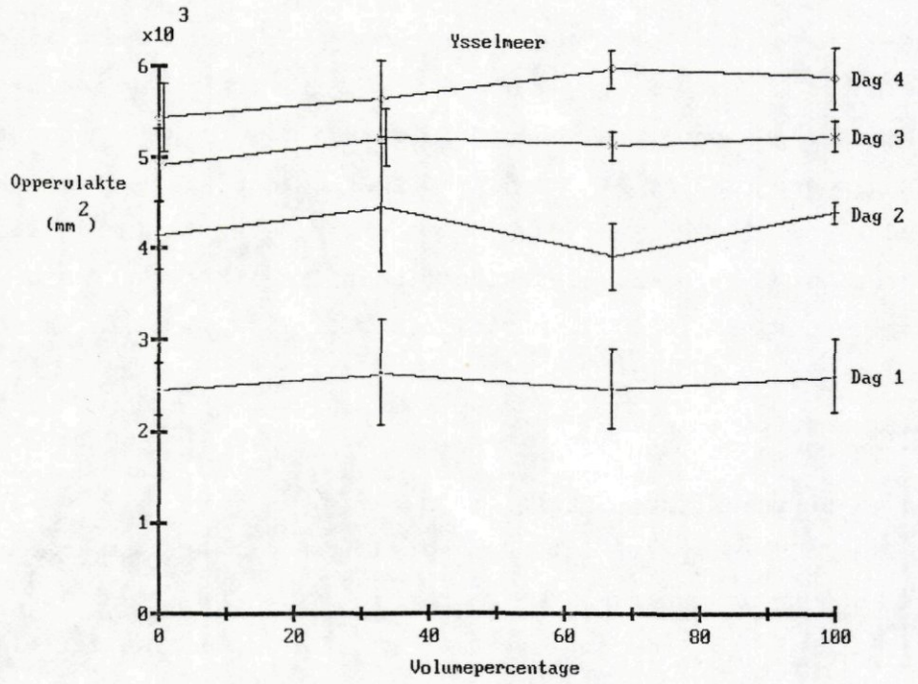
2.3.3 Ketelmeersediment

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

De gemiddelde zuurgraad was aan het begin van het experiment bij alle sedimentmengsels nauwelijks verschillend. Deze bedroeg resp. 8.6 ± 0.1 en 8.5 ± 0.0 bij de testsystemen met 100 % Oostvaardersplassen- en Ketelmeersediment. Evenals bij het IJsselmeersediment was er hier aan het eind van het experiment sprake van een trend tot afname van de zuurgraad van de testsystemen met 100 % Oostvaardersplassensediment naar de testsystemen met 100 % Ketelmeersediment, nl. van $8.6 \pm .0.0$ naar 8.1 ± 0.2.



(a)



(b)

Figuur 2.2. De gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakte als functie van (a) de tijd en (b) het volumepercentage (met standaarddeviaties) tijdens het experiment met IJsselmeersediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

De gemiddelde zuurstofconcentratie op basis van alle testsystemen bedroeg aan het begin en het eind van het experiment resp. 8.2±0.1 en 8.5±0.3 mg l^{-1}. Net als bij het IJsselmeersediment bevonden de wormen zich hier geheel in het sediment.

Overleving en groepsmassa's

Tabel 2.3 toont de resultaten van de terugtelling van het aantal overlevende wormen. Net als bij het experiment met het IJsselmeersediment werden gemiddeld iets meer dan het toegevoegde aantal wormen teruggevonden. Er kon geen significant verschil worden aangetoond tussen het aantal teruggevonden wormen bij de verschillende volumepercentages (ANOVA, $P > 0.05$). Ook paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden geen significante verschillen op.

De gemiddelde massa's van de groepen wormen zijn eveneens weergegeven in tabel 2.3. Voor deze parameter kon geen significant verschil bij de verschillende volumepercentages worden aangetoond (ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie gaven hetzelfde resultaat.

Tabel 2.3. Gemiddeld aantal teruggevonden levende wormen en de gemiddelde groepsmassa (mg) aan het eind van het experiment (± standaarddeviatie; n=3) bij de verschillende volumepercentages van Ketelmeersediment na menging met Oostvaardersplassensediment.

Volume-percentage	Aantal wormen[a]	Groepsmassa
0[b]	40.7±2.3	82± 5
33	40.3±2.1	107±23
67	43.0±3.5	99±14
100	43.0±1.0	88±10

[a] Toegevoegd aantal: 40 stuks.
[b] 100 % Oostvaardersplassensediment.

Bioturbatie-activiteit

Figuur 2.3a toont het verloop van de gemiddelde oppervlakten van de contrastlaag, die op de achtereenvolgende dagen bedekt werden door faecale pellets bij de verschillende sedimentmengsels. Er bleek sprake

te zijn van een lineaire toename van de gemiddelde oppervlakten gedurende de eerste 3 dagen van het experiment, waarna er een afvlakking van het verloop plaatsvond.

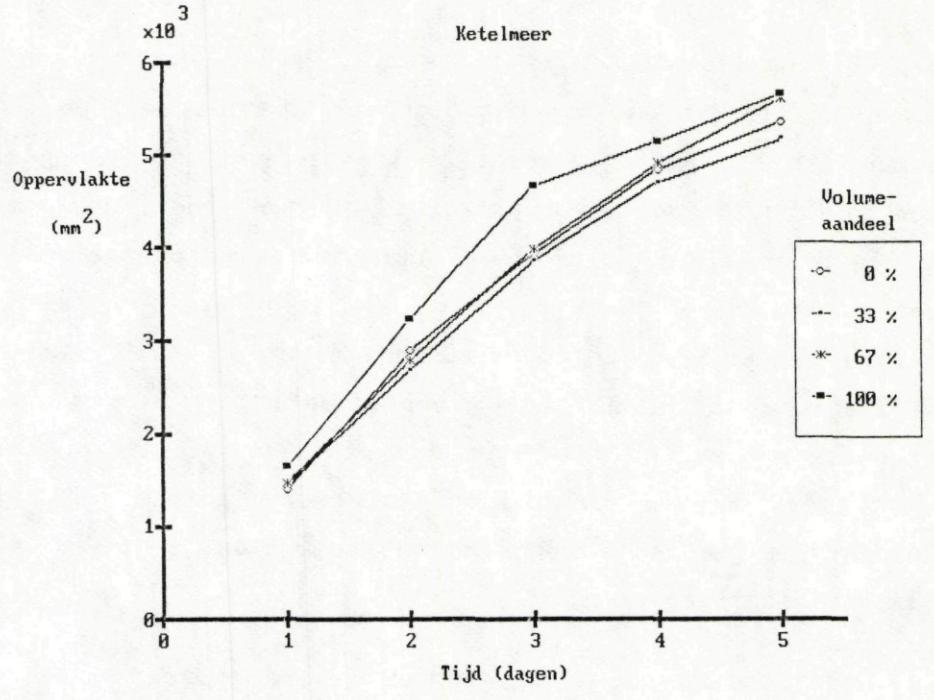
Figuur 2.3b toont de oppervlakten als functie van de volumepercentages van het verontreinigde sediment op de verschillende dagen. Er was geen duidelijke trend aanwezig in de gemiddelde oppervlakte bij een toenemend volumepercentage. Hoewel er geen sprake was van een hoog significantieniveau van de verschillen tussen de gemiddelde oppervlakten (ANOVA, $P > 0.1$), werd op dag 1 voor de lineaire relatie tussen het volumepercentage en de bedekte oppervlakte een significantieniveau met een waarde tussen 5 en 10 % gevonden ($r= 0.91$). Alleen op dag 5 kon er een significant verschil worden aangetoond tussen de oppervlakten bij de verschillende volumepercentages (ANOVA, $P < 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie gaven daarentegen op geen enkele dag significante verschillen te zien ($P > 0.05$). Er was eveneens op geen enkele dag sprake van een significante lineaire relatie met het volume-aandeel ($P >> 0.05$, behalve op dag 1: $0.05 < P < 0.1$).

2.3.4 Haringvlietsediment

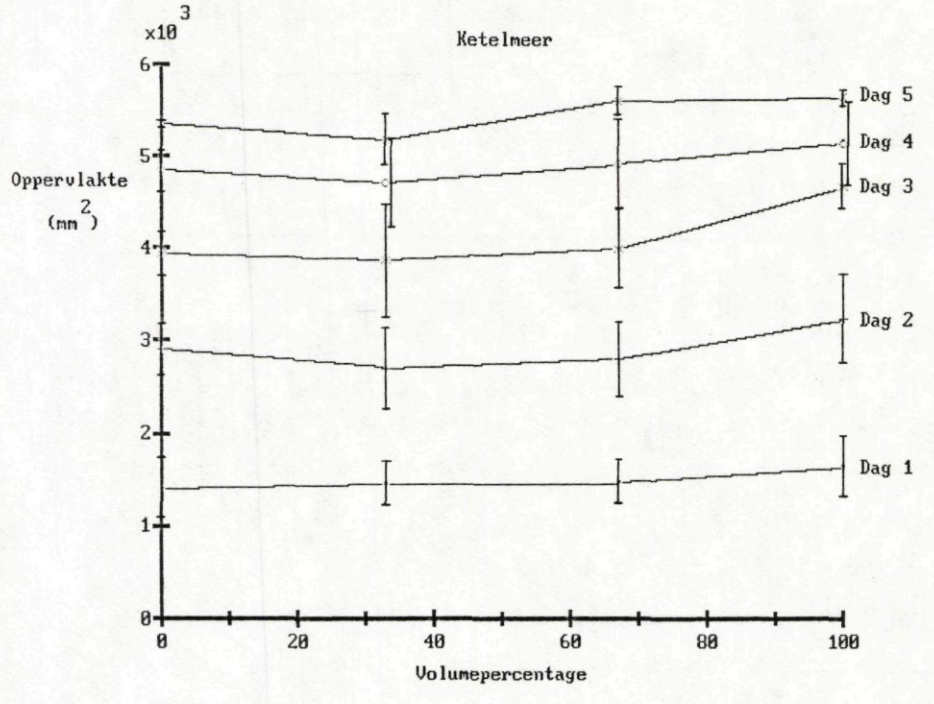
Zuurgraad en zuurstofconcentratie

De gemiddelde zuurgraad vertoonde zowel aan het begin als eind van het experiment een trend tot afname bij een toename van het volume-aandeel van het Haringvlietsediment. Deze bedroeg toen resp. 8.4 ± 0.1 en 8.6 ± 0.2 bij 100 % Oostvaardersplassensediment en 8.1 ± 0.1 en 8.3 ± 0.1 bij 100 % Haringvlietsediment.

De gemiddelde zuurstofconcentratie op basis van alle testsystemen bedroeg aan het begin en eind van het experiment resp. 7.9 ± 0.2 en 7.4 ± 0.1 mg l^{-1} en deze vertoonde geen duidelijke relatie met het volume-aandeel van het Haringvlietsediment. Ook tijdens dit experiment bevonden de wormen zich geheel in het sediment.



(a)



(b)

Figuur 2.3. De gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakte als functie van (a) de tijd en (b) het volumepercentage (met standaarddeviaties) tijdens het experiment met Ketelmeersediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

Overleving en groepsmassa's

Uit tabel 2.4 blijkt dat bij het bioturbatie-experiment met Haringvlietsediment er bij al de verschillende volumepercentages gemiddeld minder dan de toegevoegde 40 wormen werden teruggevonden. Het gemiddelde aantallen wormen bij de verschillende volumepercentages was niet significant verschillend (ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie gaven hetzelfde resultaat te zien.

Tabel 2.4 laat de gemiddelde groepsmassa's bij de verschillende volumepercentages zien. Ook hiervoor kon er geen significant verschil worden aangetoond bij de verschillende volumepercentages (ANOVA, $P > 0.05$). De paarsgewijze vergelijkingen met de referentie lieten ook geen significante verschillen zien.

Tabel 2.4. Gemiddeld aantal teruggevonden levende wormen en de gemiddelde groepsmassa (mg) aan het eind van het experiment (± standaarddeviatie; n=3) bij de verschillende volumepercentages van Haringvlietsediment na menging met Oostvaardersplassensediment.

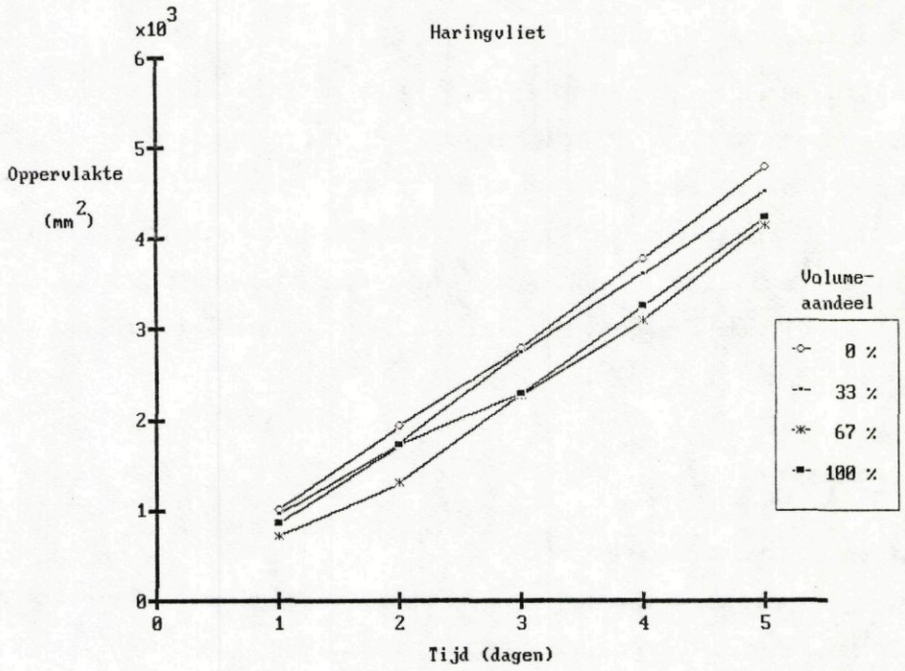
Volume-percentage	Aantal wormen[a]	Groepsmassa
0[b]	38.7±3.2	83± 9
33	37.3±4.2	89± 7
67	38.7±2.9	78± 0
100	39.7±1.2	81±20

[a] Toegevoegd aantal: 40 stuks.
[b] 100 % Oostvaardersplassensediment.

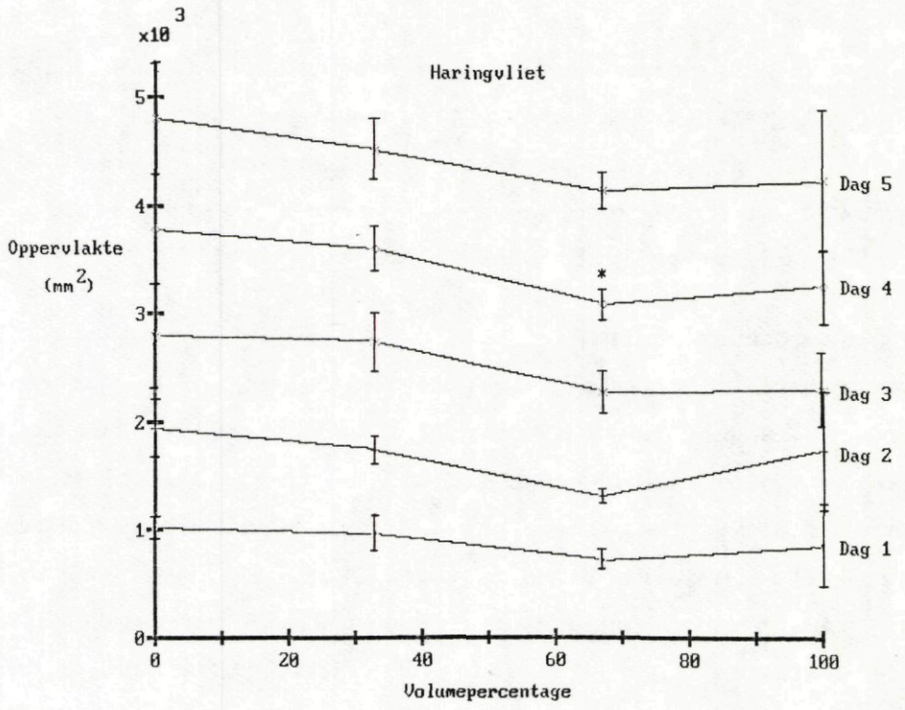
Bioturbatie-activiteit

Figuur 2.4a laat het verloop van de gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakten van de contrastlaag in de tijd zien bij de verschillende sedimentmengsels. Hieruit blijkt dat deze oppervlakten gedurende het gehele experiment lineair toenamen.

Figuur 2.4b toont de relaties tussen het volumepercentage van het Haringvlietsediment en de gemiddelde bedekte oppervlakten op de verschillende dagen. Op de laatste drie dagen van het experiment leek er een trend aanwezig tot een afname van de oppervlakte bij toename van het aandeel van het Haringvlietsediment. Hierbij moet worden opgemerkt dat de gegevens voor de testsystemen met 100% Haringvlietsediment op deze dagen slechts gebaseerd waren op twee herhalingen (zie bijlage VII).



(a)



(b)

Figuur 2.4. De gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakte als functie van (a) de tijd en (b) het volumepercentage (met standaarddeviaties) tijdens het experiment met Haringvlietsediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

Er kon echter op geen enkele dag een significant verschil worden aangetoond tussen de oppervlakten bij de verschillende volumepercentages (ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijking met de referentie m.b.v. Dunnett's procedure gaf echter op dag 4 een significant verschil te zien bij 67 % Haringvlietsediment ($P = 0.05$). Op dag 3 en 5 werden er significantieniveaus beneden 10 % gevonden voor de lineaire relaties tussen de volumepercentages en de door faecale pellets bedekte oppervlakten (beiden $r = -0.91$).

2.4 Discussie

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

Bij alle experimenten was er een afnemende trend aanwezig van de zuurgraad van het referentiesediment naar 100 % van het te toetsen sediment. Omdat de zuurgraad mogelijk van invloed is op de microbiële ontwikkeling in de sedimenten, kan hierdoor het voedselaanbod voor de wormen beïnvloed zijn. Een gewijzigd voedselaanbod kan leiden tot een verandering in de opnamesnelheid van sediment door wormen: de opnamesnelheid is lager bij sedimenten met een hoog voedselaanbod (Petr, 1977). Omdat onbekend is wat de directe en indirecte invloeden zijn van de zuurgraad op de sedimentopname door wormen, is onduidelijk wat de rol hiervan bij de waargenomen bioturbatie-activiteit was.

Overleving en groepsmassa's

Het percentage teruggevonden wormen na afloop van de blootstelling bij de verschillende getoetste sedimenten was hoog ($\geq$ 93 %) en was niet significant afwijkend t.o.v. van dat bij de referentie. Zowel bij het experiment met het IJsselmeer- als het Ketelmeersediment werden er meer wormen teruggevonden dan er waren toegevoegd. Dit was waarschijnlijk het gevolg van het over het hoofd zien van kleine exemplaren en bijna uitkomende eicocons tijdens het uittellen voorafgaand aan het inzetten van de wormen. Ook zouden er wormen in meerdere delen uiteengevallen kunnen zijn. Bij het experiment met Haringvlietsediment werden er echter bij alle sedimentmengsels gemiddeld minder wormen teruggevonden dan het toegevoegde aantal. Dit was waarschijnlijk het gevolg van een algehele slechtere kwaliteit van de wormen, want bij alle volumepercentages werd een vergelijkbaar aantal wormen teruggevonden. Deze slech-

tere kwaliteit werd waarschijnlijk veroorzaakt door een langere periode tussen het uittellen van de wormen en het toevoegen aan de testsystemen in vergelijking met de andere experimenten.

Bij het bioturbatie-experiment met het IJsselmeersediment werden 50 wormen per systeem toegevoegd, terwijl dit bij de twee andere experimenten 40 stuks waren. Een inleidend experiment had namelijk aangetoond dat de bedekking van de contrastlaag na 5 dagen door de activiteit van 50 wormen per systeem niet leidde tot een sterke overlapping van de gevormde pellets met de reeds aanwezige patronen. Tussen het inleidend experiment en het experiment met het IJsselmeersediment werden er echter nieuwe wormen aan de laboratoriumkweek toegevoegd. Blijkbaar waren deze wormen van een iets groter formaat, wat leidde tot een te sterke overlapping bij het experiment met IJsselmeersediment. Daarom werd het aantal wormen voor de twee andere experimenten verminderd tot 40 stuks per systeem.

De groepsmassa's van de wormen uit de verschillende sedimentmengsels bleken aan het eind van de experimenten niet significant te verschillen, zodat deze de bioturbatie-activiteit waarschijnlijk niet beïnvloed hebben.

Bioturbatie-activiteit

De resultaten van het experiment met IJsselmeersediment lieten geen statistisch significante verschillen in de door faecale pellets bedekte oppervlakten zien. Er was dus blijkbaar geen sprake van negatieve effecten van het sediment op de wormen.

Bij het experiment met Ketelmeersediment werd er op de vijfde dag een significant verschil gevonden tussen de bedekte oppervlakten bij de verschillende volumepercentages. Er was echter geen sprake van significante verschillen met de referentie of een significant lineair verband. Hoge volume-aandelen van Ketelmeersediment (67 en 100 %) leidden tot een hogere gemiddelde bioturbatie-activiteit in vergelijking met de referentie. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn een geringer voedselaanbod bij deze hoge volume-aandelen van Ketelmeersediment, wat kan leiden tot een grotere sedimentopnamesnelheid (Petr, 1977) of een verhoogde activiteit van de wormen t.g.v. de aanwezigheid van verontreinigingen (zie hierna: Keilty et al. (1988b) en de Poorter (1988)).

Bij het experiment met Haringvlietsediment werd er op de vierde dag een significante, negatieve afwijking in de gemiddelde oppervlakte t.o.v. de referentie gevonden bij 67 % Haringvlietsediment en werden er op dag 3 en 5 negatieve lineaire relaties gevonden met een significantieniveau kleiner dan 10 % (r= -0.91). De m.b.v. Dunnett's procedure aangetoonde significante afwijking op dag 4 kan echter een artefact zijn van de toegepaste methode: de door Steel & Torrie (1980) beschreven methode voor vergelijking van gemiddelden, die gebaseerd zijn op ongelijke aantallen herhalingen, was namelijk niet op geldigheid onderzocht. De bovengenoemde bevindingen kunnen erop wijzen dat er sprake was van een verminderde bioturbatie-activiteit van de wormen bij een verhoogd volume-aandeel van het Haringvlietsediment. Hiervoor kunnen de in het sediment aanwezige verontreinigingen verantwoordelijk geweest zijn.

Effecten op de bioturbatie door oligochaete wormen kunnen bij zeer lage concentraties van verontreinigingen optreden. Keilty et al. (1988b) vonden voor de oligotrofe soort Stylodrilus heringianus (Lumbriculidae) een negatief effect van endrin op de bioturbatie bij een concentratie die 5.5 orde beneden de LC_{50}(96 u) (2588±1974 mg kg^{-1} droge stof (Keilty et al., 1988a)) lag. De laagste concentratie, waarbij gedurende het gehele experiment (ca. 1200 u) een significant verminderde bioturbatie werd gevonden, bedroeg 541 µg kg^{-1} droge stof. Er werden echter al bij concentraties van 3.1 en 20.6 µg kg^{-1} droge stof (uitgevoerd in verschillende experimenten) significant lagere bioturbatiesnelheden gevonden in het tweede gedeelte van de experimenten (600-1200 u), terwijl er in het eerste gedeelte sprake was van een verhoging. Bij 27 µg kg^{-1} droge stof werd gedurende de gehele blootstellingsduur geen significant verschil t.o.v. de controle gevonden. De sterfte bij de bovengenoemde concentraties bedroeg maximaal 5.3 %. Aan het eind van het experiment werd ook voor de individuele wormmassa een verhoging gevonden bij lage endrinconcentraties, terwijl er een reductie zichtbaar was bij hoge concentraties. Bioturbatie leidde tot een verhoogde endrinconcentratie in de bovenlagen (0-1 en 2-3 cm) van het sediment t.o.v. testsystemen zonder wormen. Bij een lagere bioturbatie-activiteit was deze verhoging minder duidelijk of afwezig. Karickhoff & Morris (1985) vonden eveneens een soortgelijk effect van de activiteit

van Tubificidae op de redistributie van hexa- en pentachloorbenzeen en trifluralin. Boddington et al. (1979) vonden dat Tubificidae een dichtheidsafhankelijk verlies van anorganisch en methylkwik uit sediment veroorzaakten. Het grootste verlies trad op in de bovenste centimeter van het sediment.

In tegenstelling tot de hierboven genoemde stimulatie van de bioturbatie door Stylodrilus heringianus (Keilty et al., 1988b) vonden Keilty et al. (1988c) geen stimulatie bij blootstelling van Limnodrilus hoffmeisteri (Tubificidae) aan lage endrinconcentraties. Ook vonden zij bij een gecombineerde blootstelling van L. hoffmeisteri en S. heringianus dat de eerstgenoemde soort voordeel ondervond van de aanwezigheid van de andere soort (hogere bioturbatie-activiteit, betere overleving en hogere drooggewichten). Het omgekeerde bleek echter niet het geval te zijn. Dergelijke interacties tussen soorten m.b.t. toxische effecten, groei en respiratie werden eveneens door Brinkhurst et al. (1972), Chua & Brinkhurst (1973), Brinkhurst & Austin (1979) en Chapman et al. (1982) gevonden. Hieruit bleek dat toxische effecten vaak minder groot zijn in toetsen met meerdere soorten Tubificidae t.o.v. testen met één soort.

De Poorter (1988) vond bij een blootstellingsduur van 5 dagen van een mengsel van Tubificidae-soorten aan subletale koperconcentraties (25 $\mu g\ l^{-1}$ in combinatie met 13.5 mg (nominaal) kg^{-1} droge stof) een verhoogde faecale pelletvorming tijdens de eerste twee dagen. Bij hogere subletale concentraties (59 $\mu g\ l^{-1}$ en 54 mg (nominaal) kg^{-1} droge stof) werd vanaf de vierde dag een significante afname van de bioturbatie geconstateerd. Op alle dagen bleken de door faecale pellets bedekte oppervlakten van de op het sediment aangebrachte contrastlaag sterk significant lineair gerelateerd te zijn aan zowel de koperconcentratie in de waterkolom als de totale kopergift per testsysteem. Bij de bepaling van deze relaties werd het gebied tussen de controle en de laagste kopergift buiten beschouwing gelaten vanwege de stimulatie aldaar.

Het is mogelijk dat de tijdens het hier beschreven onderzoek bestudeerde sedimenten uit IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet bij een langere blootstellingsduur wel duidelijke effecten op de bioturbatie laten zien. Uit de hierboven beschreven literatuurgegevens blijkt

namelijk dat er bij lange blootstelling effecten van lage concentraties van toxische stoffen op de bioturbatie gevonden worden. Zoals reeds beschreven heeft dit gevolgen voor de redistributie van de stof in de bovenlaag van het sediment. Dit betekent dat er bij studies, waarbij gekeken wordt naar de effecten van bioturbatie op de verdeling van een stof in het sediment, rekening gehouden moet worden met toxische effecten op de activiteit van de organismen. Het is niet onwaarschijnlijk, dat behalve de redistributie van een stof, ook andere, in de inleiding van dit hoofdstuk genoemde processen en eigenschappen onder invloed van een gewijzigde bioturbatie veranderingen zullen ondergaan. Wat de exacte gevolgen hiervan voor het functioneren van de waterbodem zijn is niet geheel duidelijk. Echter gezien de veelheid aan processen en eigenschappen die hierdoor een wijziging kunnen ondergaan, dienen de gevolgen niet op voorhand onbelangrijk geacht te worden.

2.5 Conclusies

De experimenten met verontreinigde sedimenten van IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet lieten bij een blootstelling van maximaal 5 dagen geen afwijkingen in de overleving van aquatische Oligochaeta zien t.o.v. de referentie (Oostvaardersplassensediment). Wel werden er marginale afwijkingen in bioturbatie-activiteit gevonden bij Ketelmeer- en Haringvlietsediment.

Op de vijfde waarnemingsdag werd bij het experiment met Ketelmeersediment een significante afwijking gevonden in de gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakte bij de verschillende volume-percentages gevonden ($P < 0.05$), maar paarsgewijze vergelijkingen met de referentie gaven geen statistisch significante verschillen te zien. Er werd eveneens geen correlatie met de volume-aandeel van het Ketelmeersediment gevonden. De gemiddelde door faecale pellets bedekte oppervlakten waren hoger bij de testsystemen met een hoog volume-aandeel van het Ketelmeersediment dan bij de referentiesystemen, zodat er geen aanwijzingen waren voor negatieve effecten van het Ketelmeersediment op de bioturbatie.

Op de vierde dag werd een significante afname van de bioturbatie t.o.v. de referentie gevonden ($P < 0.05$) bij een volume-aandeel van 67 % van het Haringvlietsediment. Op de derde en vijfde waarnemingsdag

werden bovendien negatieve lineaire relaties tussen de volumepercentages van het sediment en de door faecale pellets bedekte oppervlakten met een significantieniveau beneden 10 % vastgesteld. Deze bevindingen kunnen duiden op mogelijke effecten van de verontreinigingen in het Haringvlietsediment op de wormen.

Hoewel de resultaten van de bioturbatie-experimenten niet zeer duidelijk aantoonden dat er sprake is van een verschillende verontreinigingsgraad van de getoetste sedimenten uit IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet, waren er met name bij het Haringvlietsediment tendensen aanwezig die duidden op een sterkere verontreinigingsgraad. Er kunnen echter ook andere fysisch-chemische factoren, waaronder de sedimentkarakteristieken, verantwoordelijk geweest zijn voor de gevonden trends.

Om duidelijke effecten van anthropogeen verontreinigde sedimenten op de bioturbatie door aquatische Oligochaeta te kunnen registreren, is het noodzakelijk om de blootstellingsduur te verlengen. Dit zal gepaard moeten gaan met een vergroting van de testsystemen of een reductie van de wormdichtheid in de testsystemen.

3 REPRODUKTIE

3.1 Inleiding

Om na te gaan of de verontreinigingen in de sedimenten uit het IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet van invloed zijn op de reproduktie van aquatische Oligochaeta, werd een semi-statisch toxiciteitsexperiment uitgevoerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van wormen van de soort Peloscolex ferox (Tubificidae). Deze wormsoort is volgens Milbrink (1983) en Howmiller & Scott (1977) resp. kenmerkend voor oligotrofe en mesotrofe tot organisch licht verrijkte wateren. De soort heeft bovendien een voorkeur voor siltige bodems (= dominante korrelgrootte 2-50 µm) en zuurstofrijk water.

De overleving van de wormen van deze soort en het aantal geproduceerde cocons en eieren werden, evenals bij de bioturbatie-experimenten, bestudeerd bij een sediment-water verhouding van 1:1.

3.2 Materiaal en methoden

Sedimentbehandeling en -opslag

Voor dit experiment werd, met uitzondering van het Oostvaardersplassensediment, gebruik gemaakt van dezelfde gezeefde sedimentmonsters als bij de bioturbatie-experimenten (zie 2.2). Voor het Oostvaardersplassensediment werd echter een ander monster gebruikt, dat tegelijk met het bij de bioturbatie-experimenten gebruikte monster in het veld werd bemonsterd. Ook dit tweede monster had dezelfde behandeling en opslag als de andere sedimentmonsters ondergaan (zie 2.2).

Inzetten van de testsystemen

Voor dit experiment werden suspensies van Oostvaardersplassen-, IJsselmeer-, Ketelmeer- en Haringvlietsediment met een volume van 150 ml in triplo bereid in polyethyleenpotten van 250 ml. De suspensies werden 24 u bij 20 °C geschud, waarna ze werden overgebracht in glazen potjes (inwendige ø: 6 cm, hoogte: 6.5 cm). De toegevoegde hoeveelheden nat sediment leidden na bezinken tot een sedimentkolom van ca. 2½ cm bij een totale hoogte van de sediment-water kolom van ca. 5 cm, zodat een 1:1 v/v sediment-water verhouding werd verkregen. Daarnaast werden mengsels van resp. IJsselmeer-, Ketelmeer- en Haringvlietsediment met

Oostvaardersplassensediment bereid, die leidden tot een aandeel van de beide sedimenten van 50 % aan het totale sedimentvolume na bezinken. De toegevoegde hoeveelheden sediment zijn vermeld in bijlage VIII.

Na 2½ dag bezinken werd gestart met de doorborreling van de waterkolom van de testsystemen met perslucht. Elke 48 u werd het uit de testsystemen verdampte water aangevuld met demi-water.

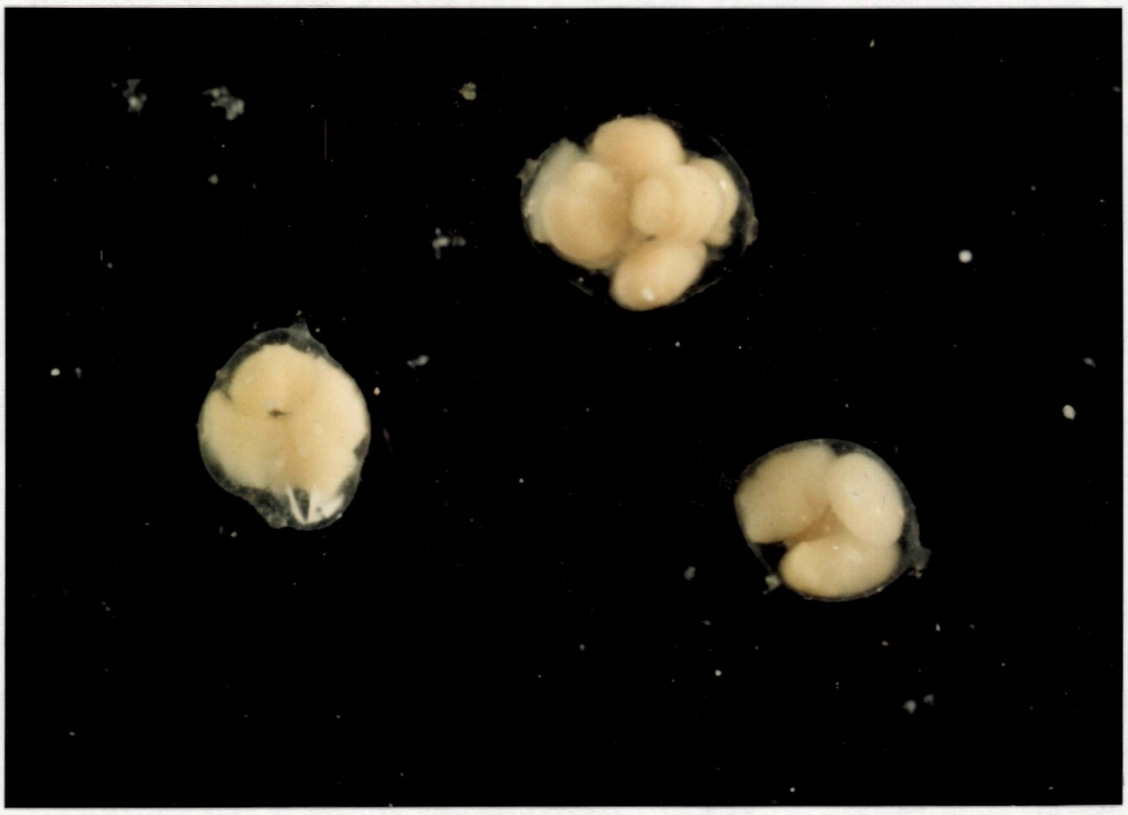
De testsystemen stonden opgesteld in een geklimatiseerde ruimte met een temperatuur van 20-21 °C en een dag-nacht ritme van 16 u/8 u.

Omdat het experiment semi-statisch werd uitgevoerd, werden voorafgaand aan het uitzeven van de wormen en de gevormde cocons steeds nieuwe suspensies bereid op de hierboven beschreven wijze.

Inzetten en uithalen van de wormen

Wormen uit een laboratoriumkweek (Bijlage III) werden verzameld m.b.v. een spoelgoot en een zeef met een maaswijdte van 125 µm (Bijlage V). Hieruit werden 210 adulte exemplaren van de soort Peloscolex ferox geselecteerd, zodat na 3 dagen bezinken van het sediment 10 wormen per testsysteem konden worden toegevoegd. Tijdens het experiment werd geen extra voedsel aan de testsystemen toegevoegd. Na 7, 14 en 23 dagen werd de inhoud van de systemen uitgespoeld en werden de wormen opgevangen m.b.v. een zeef met een maaswijdte van 125 µm. De overlevende wormen werden geteld en uit de uitgezeefde fractie verwijderd. De wormen werden vervolgens overgezet in systemen met nieuw bereidde sedimentmengsels. Om het tellen van de geproduceerde eicocons te vereenvoudigen werd de uitgezeefde fractie na verwijdering van de wormen over een zeef met een maaswijdte van 250 µm gespoeld, zodat de grote hoeveelheid aanwezige sedimentdeeltjes verwijderd werd. De op de zeef achtergebleven restanten werden verzameld. Deze fractie werd m.b.v. een binoculair gecontroleerd op de aanwezigheid van eicocons. Het aantal geproduceerde cocons en het aantal eieren per cocon werden geregistreerd (Figuur 3.1).

Omdat er tijdens het experiment sterfte optrad onder de wormen, werd het gemiddelde aantal wormen per periode gebruikt voor de berekening van de cocon- en eiproduktie per worm. Aan de hand van het aantal getelde cocons en het gemiddeld aantal aanwezige wormen per periode werd de gemiddelde coconproduktie per worm voor het gehele experiment



Figuur 3.1. Eicocons van oligochaete wormen (vergroting ca. 30 x).

voor elke herhaling berekend. Op dezelfde wijze werd de eiproduktie per worm berekend. Op basis van de telling van het aantal eieren en het bijbehorende aantal cocons werd het gemiddelde aantal eieren per cocon voor elke herhaling bepaald (exclusief herhalingen met minder dan 3 geproduceerde cocons). Op basis van de herhalingsgemiddelden werd voor elke parameter een gemiddelde per behandeling (=sedimentvolume-aandeel van het verontreinigde sediment) bepaald.

Overige waarnemingsparameters

Aan het begin en einde van elke periode werden de zuurgraad en de zuurstofconcentratie van de waterkolom in de testsystemen met de verschillende sedimentmengsels bepaald.

Statistische verwerking

De verschillen in de gemiddelde cocon- en eiproduktie per worm en het gemiddeld aantal eieren per cocon bij de verschillende volumepercentages van het verontreinigde sediment werden getoetst m.b.v. variantie-analyse (ANOVA). Afwijkingen t.o.v. de referentie werden paarsgewijs getoetst m.b.v. Dunnett's procedure. Bij beide toetsmethoden werd een onbetrouwbaarheidsdrempel van 5 % gehanteerd.

3.3 Resultaten

3.3.1 Inleiding

De resultaten van de tellingen van overleving, cocon- en eiproduktie tijdens het reproduktie-experiment zijn weergegeven in bijlage IX.

3.3.2 IJsselmeersediment

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

De gemiddelde zuurgraad tijdens het experiment bedroeg 8.4±0.2 bij het referentiesediment. De zuurgraad vertoonde een afnemende trend van het referentiesediment naar 100 % IJsselmeersediment met een gemiddelde waarde van resp. 8.2±0.2 en 8.0±0.2 bij 50 en 100 % IJsselmeersediment.

De gemiddelde zuurstofconcentratie bij 100 % Oostvaardersplassensediment, 50 en 100 % IJsselmeersediment bedroeg resp. 7.3±0.5, 7.3±0.3 en 7.4±0.4 mg/l.

Overleving

De overleving van de wormen in het Oostvaardersplassensediment was lager dan bij de getoetste sedimenten. Het aantal overlevende wormen aan het eind van het experiment in de triplo's van het Oostvaardersplassensediment bedroeg 6, 7 en 10 wormen. De hoge sterfte in de twee herhalingen trad voornamelijk tijdens de eerste week op.

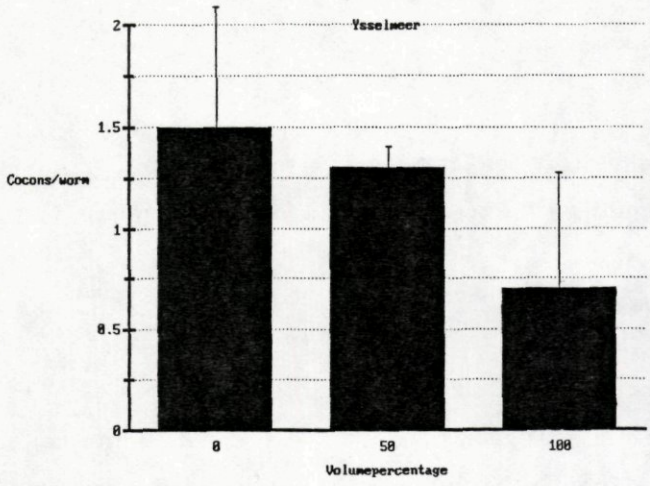
Bij de mengsels met IJsselmeersediment overleefden, met uitzondering van één herhaling bij 100 % IJsselmeersediment (60 % overleving), alle wormen het experiment.

Coconproduktie

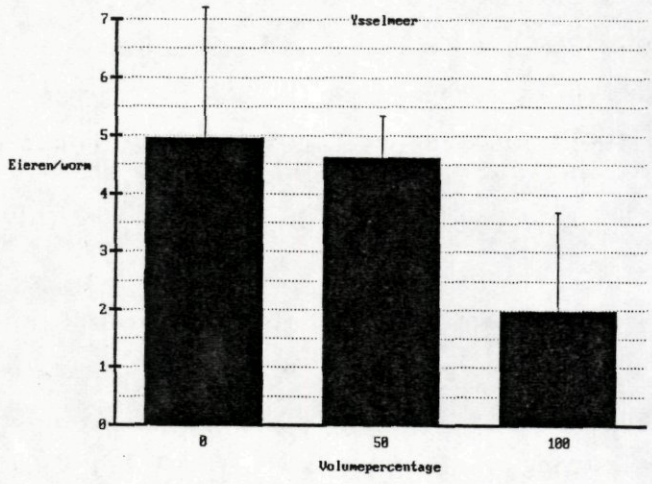
Figuur 3.2a toont de coconproduktie per worm voor de verschillende sedimentmengsels. De coconproduktie vertoonde een trend tot afname bij een toenemend aandeel van het IJsselmeersediment, nl. gemiddeld resp. 87 en 47 % bij 50 en 100 % IJsselmeersediment t.o.v. het referentiesediment. De spreiding binnen de verschillende behandelingen was echter groot.

Er kon geen significant verschil in de coconproduktie bij de verschillende mengsels met het IJsselmeersediment worden aangetoond

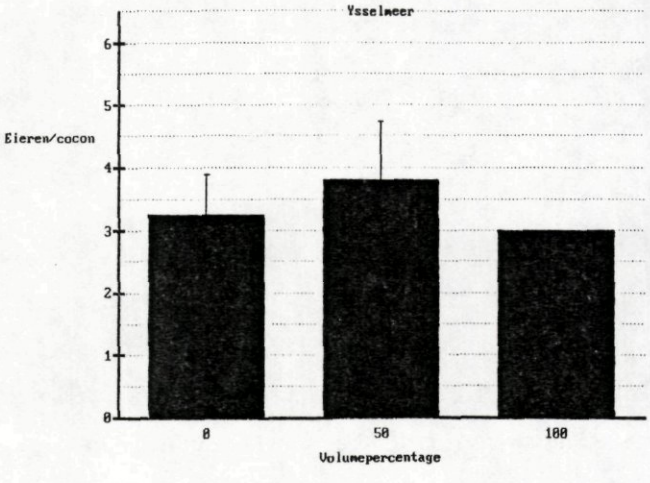
(a)



(b)



(c)



Figuur 3.2. Gemiddelde waarden met standaarddeviaties van (a) coconproduktie per worm, (b) eiproduktie per worm en (c) aantal eieren per cocon bij verschillende volume-aandelen van IJsselmeersediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

(ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden eveneens geen significante verschillen op.

Eiproduktie

Figuur 3.2b toont de eiproduktie per worm bij de verschillende volumepercentages van het IJsselmeersediment. Deze vertoonde een vergelijkbare trend met een toenemend volumepercentage als de coconproduktie (Figuur 3.2a). De eiproduktie bij 50 en 100 % IJsselmeersediment bedroeg gemiddeld resp. 93 en 40 % van die bij het referentiesediment.

De verschillen in eiproduktie per worm bij de verschillende sedimentpercentages waren echter niet significant (ANOVA en Dunnett's procedure, $P > 0.05$).

Aantal eieren per cocon

In figuur 3.2c is het gemiddelde aantal eieren per cocon weergegeven bij de verschillende aandelen van het IJsselmeersediment. Er was hier geen sprake van een duidelijke trend bij een toenemend volumepercentage. Het gemiddelde aantal eieren per cocon bij 50 en 100 % IJsselmeersediment bedroeg resp. 117 en 92 % t.o.v. het aantal bij het referentiesediment.

De gevonden verschillen in het aantal eieren per cocon waren niet significant (ANOVA en Dunnett's procedure, $P > 0.05$).

3.3.3 Ketelmeersediment

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

De gemiddelde zuurgraad vertoonde een afnemende trend bij toename van het aandeel van het Ketelmeersediment. Bij het referentiesediment bedroeg de gemiddelde zuurgraad 8.4 ± 0.2, terwijl dit bij 50 en 100 % Ketelmeersediment resp. 8.1 ± 0.1 en 7.9 ± 0.1 was.

De gemiddelde zuurstofconcentratie tijdens het experiment bedroeg resp. 7.3 ± 0.5, 7.3 ± 0.3 en 7.4 ± 0.4 mg/l bij 100 % Oostvaardersplassensediment, 50 en 100 % Ketelmeersediment.

Overleving

Op de overleving van de wormen in het Oostvaardersplassensediment werd reeds in onderdeel 3.3.2 ingegaan.

Bij de mengsels met Ketelmeersediment overleefde minimaal 80 % van de wormen tot het eind van het experiment. Er was geen duidelijke relatie tussen het volume-aandeel bij 50 en 100 % Ketelmeersediment en de overleving bij deze percentages.

Coconproduktie

In figuur 3.3a is de coconproduktie per worm in de verschillende sedimentmengsels weergegeven. De gemiddelde coconproduktie per behandeling vertoonde een duidelijke afname bij de aanwezigheid van Ketelmeersediment, nl. resp. 32 en 40 % bij 50 en 100 % Ketelmeersediment t.o.v. het referentiesediment.

Er kon een significant verschil worden aangetoond tussen de coconproduktie bij de verschillende mengsels met Ketelmeersediment (ANOVA, $P < 0.01$). Paarsgewijze vergelijking met de referentie gaf zowel voor 50 als 100 % Ketelmeersediment een significant verschil te zien ($P < 0.05$).

Eiproduktie

Figuur 3.3b laat het gemiddelde aantal geproduceerde eieren per worm voor de verschillende sedimentmengsels zien. De aanwezigheid van 50 en 100 % Ketelmeersediment leidde tot waarden, die resp. 37 en 36 % waren van de waarde bij het referentiesediment.

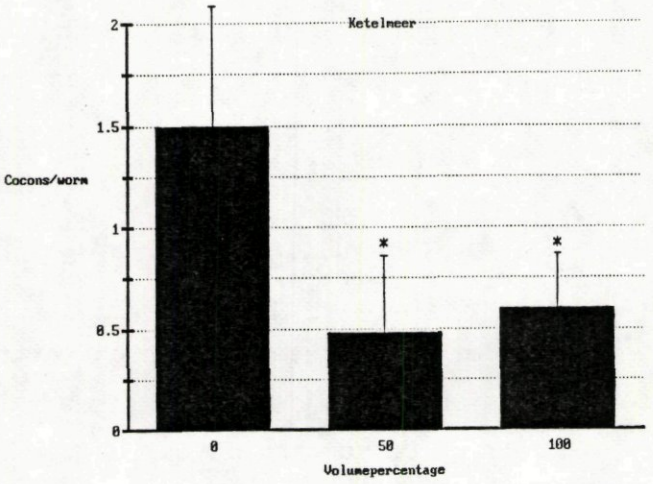
Door de grote variatie in de eiproduktie per herhaling had het verschil in deze parameter bij de verschillende sedimentpercentages een significantieniveau net boven de 10 % (ANOVA). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie resulteerden ook niet in significante verschillen ($P > 0.05$)

Aantal eieren per cocon

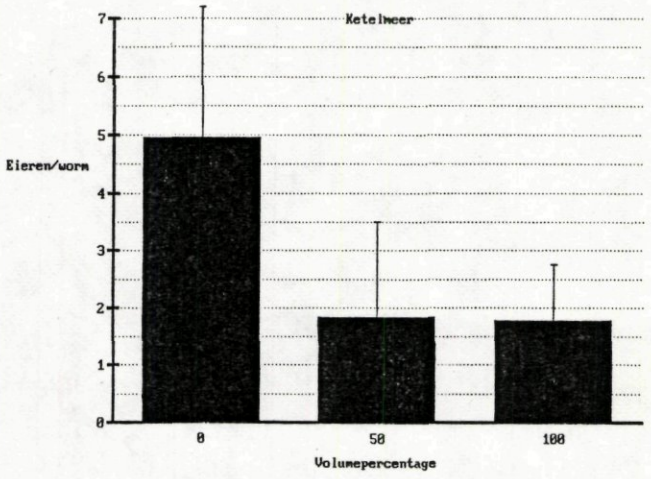
In figuur 3.3c is het aantal eieren per cocon weergegeven voor de verschillende sedimentmengsels. Deze parameter vertoonde geen afnemende trend met het toenemend aandeel van het Ketelmeersediment. De waarde van deze parameter bij 50 en 100 % Ketelmeersediment bedroeg resp. 129 en 89 % t.o.v. de waarde bij het referentiesediment.

Het gevonden verschil in het aantal eieren per cocon bij de verschillende sedimentmengsels had een significantieniveau van minder dan 10 % (ANOVA). Paarsgewijze vergelijking met de referentie leverde

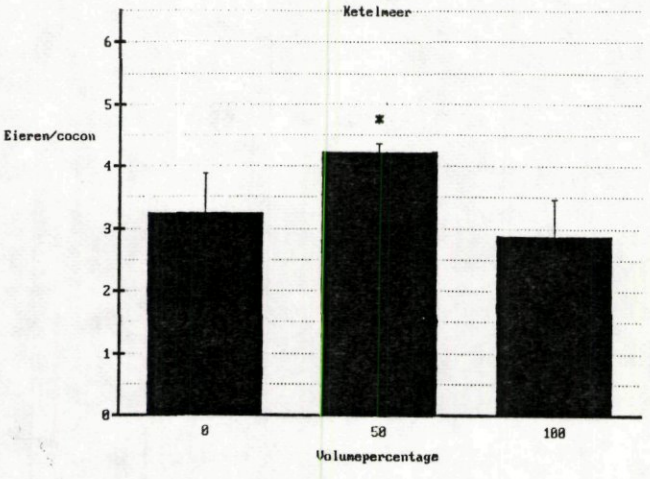
(a)



(b)



(c)



Figuur 3.3. Gemiddelde waarden met standaarddeviaties van (a) coconproduktie per worm, (b) eiproduktie per worm en (c) aantal eieren per cocon bij verschillende volume-aandelen van Ketelmeersediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

alleen voor de vergelijking van de referentie met 50 % Ketelmeersediment een significant verschil in de coconinhoud gevonden ($P < 0.05$). De gemiddelde coconinhoud bij 50 % Ketelmeer was echter hoger dan bij de referentie, nl. resp. 4.22 ± 0.13 en 3.26 ± 0.64.

3.3.4 Haringvlietsediment

Zuurgraad en zuurstofconcentratie

Net als bij de twee andere getoetste sedimenten vertoonde de gemiddelde zuurgraad ook bij het Haringvlietsediment een afnemende trend bij een toenemend volume-aandeel. De zuurgraad verliep van 8.4 ± 0.2 bij 100 % Oostvaardersplassensediment naar resp. 8.3 ± 0.2 en 8.1 ± 0.1 bij 50 en 100 % Haringvlietsediment.

De gemiddelde zuurstofconcentratie bij de volumepercentages van het Haringvlietsediment van 0, 50 en 100 % bedroeg resp. 7.3 ± 0.5, 7.4 ± 0.4 en 7.4 ± 0.3 mg/l.

Overleving

Op de overleving van de wormen in het Oostvaardersplassensediment werd reeds in onderdeel 3.3.2 ingegaan.

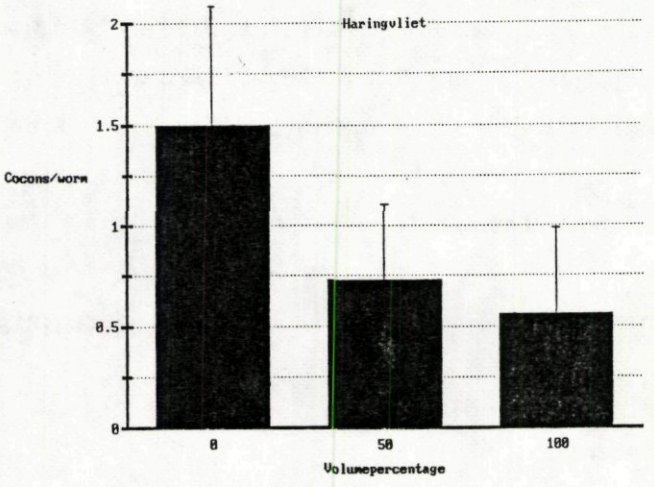
Bij de mengsels met Haringvlietsediment overleefde minimaal 80 % van de wormen het experiment. Er was geen duidelijk negatief effect van de toename van het volume-aandeel van het Haringvlietsediment van 50 naar 100 % op de overleving zichtbaar.

Coconproduktie

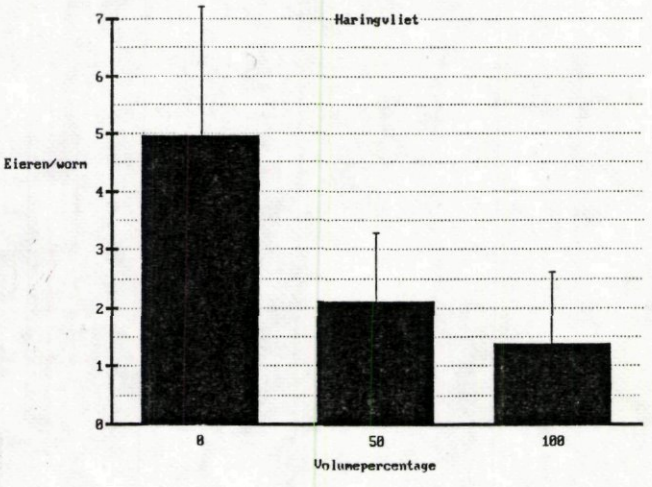
Figuur 3.4a toont de coconproduktie per worm in de verschillende sedimentmengsels. De gemiddelde coconproduktie per behandeling vertoonde een duidelijke afname bij de aanwezigheid van Haringvlietsediment. De gemiddelde produktie bij 50 en 100 % Haringvlietsediment bedroeg resp. 49 en 37 % *t.o.v.* het referentiesediment.

Het significantieniveau voor de verschillen in de coconproduktie bij de verschillende volumepercentages van het Haringvlietsediment lag net boven de 10 % (ANOVA). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden geen significante verschillen op ($P > 0.05$).

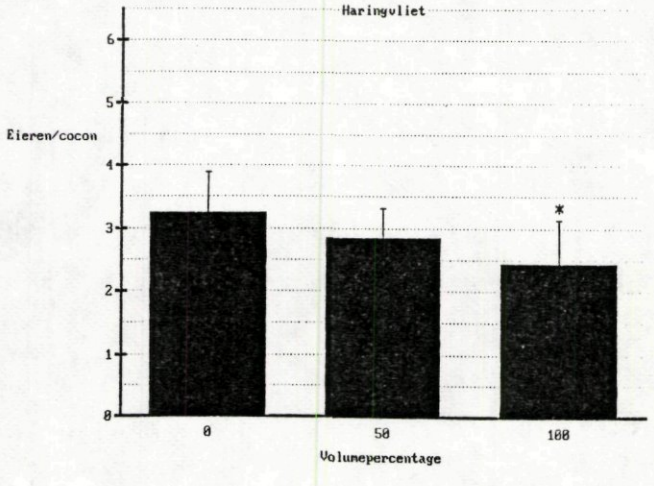
(a)



(b)



(c)



Figuur 3.4. Gemiddelde waarden met standaarddeviaties van (a) coconproduktie per worm, (b) eiproduktie per worm en (c) aantal eieren per cocon bij verschillende volume-aandelen van Haringvlietsediment (*: significant afwijkend van de referentie ($P < 0.05$)).

Eiproduktie

Figuur 3.4b laat het gemiddelde aantal eieren per worm voor de verschillende volumepercentages zien. De aanwezigheid van 50 en 100 % Haringvlietsediment leidde tot waarden, die resp. 43 en 28 % bedroegen van het gemiddelde aantal eieren per cocon bij het referentiesediment.

De verschillen in eiproduktie bij de verschillende volumepercentages hadden een significantieniveau van minder dan 10 % (ANOVA). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden geen significante verschillen op ($P > 0.05$).

Aantal eieren per cocon

Figuur 3.4c toont het aantal eieren per cocon voor de verschillende volumepercentages. Het aantal eieren per cocon vertoonde een afname bij een toenemend aandeel van het Haringvlietsediment. De gemiddelde waarde van deze parameter bij 50 en 100 % Haringvlietsediment bedroeg resp. 87 en 75 % t.o.v. de waarde bij het referentiesediment.

Er was geen sprake van een significant verschil tussen het aantal eieren per cocon bij de verschillende sedimentmengsels (ANOVA, $P > 0.05$). Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie leverden alleen een significant verschil op tussen de coconinhoud bij de referentie en 100 % Haringvlietsediment ($P < 0.05$).

3.4 Discussie

3.4.1 Overleving

Opmerkelijk bij dit experiment was de hoge sterfte van de wormen in het Oostvaardersplassensediment. Bij de bioturbatie-experimenten was er echter geen sprake van een verhoogde sterfte in het referentiesediment (zie 2.3.2 t/m 2.3.4). Omdat de gevonden sterfte in het reproduktie-experiment voornamelijk optrad tijdens de eerste week, was deze waarschijnlijk het gevolg van een verminderde kwaliteit van een deel van de wormen t.g.v. het selecteren en bewaren voorafgaand aan het experiment.

3.4.2 Coconproduktie

De resultaten van de gemiddelde coconproduktie voor de drie getoetste sedimenten laten allen een trend tot een afname zien van de coconproduktie van de wormen in het referentiesediment naar 100 % van het verontreinigde sediment. Ondanks de grote reducties in de gemiddelde coconproduktie per worm bij de verschillende sedimentmengsels (gemiddelde coconproduktie 32-49 % t.o.v. Oostvaardersplassensediment, behalve bij 50 % IJsselmeersediment: 87 %) konden echter alleen bij het Ketelmeersediment significante verschillen worden aangetoond t.o.v. de gemiddelde coconproduktie in Oostvaardersplassensediment (ANOVA: $P < 0.01$; Dunnett's procedure: $P < 0.05$ (zowel voor 50 als 100 % volumeaandeel)). De onbetrouwbaarheid voor significantie van de verschillen bij het Haringvlietsediment lag net boven 10 %. Paarsgewijze vergelijkingen met de referentie gaven hier geen significante verschillen te zien.

De afwezigheid van meer significante verschillen kan het gevolg zijn van de grote variatie in de coconproduktie bij de herhalingen van de verschillende volumepercentages. Deze variatie was waarschijnlijk het gevolg van de heterogene samenstelling van de gebruikte wormen. Er werd gebruik gemaakt van individuen van de soort Peloscolex ferox vanwege de gemakkelijke uiterlijke herkenbaarheid van deze soort. Deze wormen werden via de handel verkregen en vervolgens in het laboratorium in kweek gehouden. Hierdoor werd er gewerkt met exemplaren van een onbekende en wellicht sterk uiteenlopende leeftijd. Omdat het aandeel van de adulte exemplaren in de kweek beperkt was, werden de wormen niet verder op grootte geselecteerd. Deze grootteverschillen kunnen eveneens van invloed zijn geweest op de waargenomen coconproduktie.

3.4.3 Eiproduktie

Net als de coconproduktie liet de gemiddelde eiproduktie per worm een afname zien van het referentiesediment naar 100 % van de verontreinigde sedimenten (gemiddelde waarden 28-43 % t.o.v. het referentiesediment, behalve bij 50 % IJsselmeersediment: 93 %). Deze percentages kwamen sterk overeen met die bij de coconproduktie. Er kon hier echter bij geen enkel sediment m.b.v. ANOVA of Dunnett's procedure een signi-

ficant verschil worden aangetoond in de gemiddelde eiproduktie bij de verschillende volumepercentages. De oorzaak hiervan was waarschijnlijk de grote variatie in de eiproduktie, waarvoor de mogelijke oorzaken reeds bij de coconproduktie werden besproken. Wel hadden de verschillen tussen de gemiddelde waarden bij het Haringvlietsediment en het Ketelmeersediment een significantieniveau met een waarde resp. beneden en net boven de 10 %. Een dergelijke waarde werd ook gevonden voor de coconproduktie bij het Haringvlietsediment (ca. 10 %), terwijl de waarde voor deze parameter bij het Ketelmeersediment slechts 1 % bedroeg. De sterke afwijkingen voor beide parameters bij de verschillende sedimentmengsels van deze twee sedimenten t.o.v. het referentiesediment zouden kunnen wijzen op negatieve effecten van de sedimenten op de wormen. Deze effecten kunnen veroorzaakt zijn door de in het sediment aanwezige verontreinigingen.

3.4.4 Eieren per cocon

In tegenstelling tot de andere reproduktieparameters vertoonde het aantal eieren per cocon niet altijd een lagere waarde t.o.v. de waarde bij het referentiesediment. De hogere waarden werden echter alleen gevonden bij de mengsels met 50 % IJsselmeer- en Ketelmeersediment (resp. 117 en 129 %), terwijl dit de overige getoetste mengsels 75-92 % was. De laatstgenoemde percentages liggen ongeveer een factor 2 hoger dan de percentages die gevonden werden voor de twee andere reproduktieparameters. Alleen op basis van Dunnett's procedure werden significante afwijkingen in het aantal eieren per cocon t.o.v. de referentie gevonden voor de testsystemen met 50 % Ketelmeer- en 100 % Haringvlietsediment ($P < 0.05$). De coconinhoud bij het Ketelmeersedimentmengsel was echter hoger dan bij de referentie, terwijl er bij het Haringvliet sprake was een gereduceerde coconinhoud. De gevonden significantie bij 50 % Ketelmeersediment kan echter het gevolg zijn van een artefact van de toegepaste methode: de door Steel & Torrie (1980) beschreven methode voor vergelijking van gemiddelden, die gebaseerd zijn op ongelijke aantallen herhalingen, was namelijk niet op geldigheid onderzocht.

Gezien de toe- en afnamen van het aantal eieren per cocon bij de verschillende mengsels lijkt deze parameter niet erg gevoelig voor de getoetste sedimenten. Misschien zijn de gevonden afwijkingen slechts

het gevolg van de natuurlijke variatie van deze parameter. Daarnaast kunnen ook het verschillende aantal herhalingen en aantal cocons per herhaling, waarop de gemiddelde coconinhouden gebaseerd zijn, hierbij een rol gespeeld hebben.

3.4.5 Reproduktie en sedimentkarakteristieken

Wanneer de gemiddelde cocon- en eiproduktie en het aantal eieren per cocon in de testsystemen met 100 % van de verontreinigde sedimenten wordt vergeleken met de systemen met het referentiesediment, dan kunnen de sedimenten steeds als volgt gerangschikt volgens een afnemende waarde van de parameters: Oostvaardersplassen-, IJsselmeer-, Ketelmeer- en Haringvlietsediment. Op basis van deze trend zou, met de grote variaties rond de gemiddelden in gedachten, voorzichtig kunnen worden vastgesteld dat de getoetste sedimenten ongunstigere omstandigheden boden aan Peloscolex ferox dan het referentiesediment. Op basis van de gevonden statistisch significante verschillen m.b.t. de coconproduktie zouden Ketelmeer en Haringvliet echter in de rangschikking omgewisseld moeten worden, terwijl dit volgens de resultaten van de coconinhoud niet het geval zou zijn.

De gevonden rangschikking van de sedimenten kan een maat zijn voor de toxische effecten van de erin aanwezige verontreinigingen. De gevonden verschillen kunnen echter ook hun oorsprong vinden in o.a. de sedimentkarakteristieken en in de zuurgraad bij de verschillende sedimentmengsels tijdens het experiment. Verschillen in de sedimenteigenschappen, zoals het gehalte aan organisch koolstof en de korrelgrootteverdeling, kunnen van invloed zijn op de geschiktheid van het sediment voor een normale ontwikkeling van Peloscolex ferox. De verschillen in zuurgraad bij de verschillende sedimentmengsels (ca. 8.4 bij 100 %-Oostvaardersplassensediment en ca. 8.0 bij 100 % van de overige sedimenten) kunnen echter ook aanleiding tot verschillen hebben gegeven.

Een ander punt, dat van belang is bij de vergelijking van de verschillende sedimentmengsels, is de invloed van de zuurgraad op de biologische beschikbaarheid en de speciatie van de in de testsystemen aanwezige verontreinigingen. Aangezien de zuurgraad bij alle getoetste sedimenten een trend tot afname vertoonde bij toename van het aandeel van het te toetsen sediment, is het mogelijk dat de gevonden verschil-

len met het referentiesediment hiermee verband houden. Aangezien de zuurgraad bij de verontreinigde sedimenten wel sterk overeenkomstig was, zullen de onderlinge verschillen hierdoor waarschijnlijk weinig beïnvloed zijn.

Behalve de hierboven genoemde parameters kunnen er ook andere parameters, die niet tijdens het reproduktie-experiment bepaald werden, van invloed zijn geweest op de toetsresultaten. Van de Guchte & Maas-Diepeveen (1987) vonden namelijk dat ammoniak en zouten wellicht een rol speelden bij de resultaten van toxiciteitstesten met o.a. muggelarven en sedimenten uit sedimentatiegebieden van de Rijn. Aangezien Stammer (1953) vond dat oligochaeten gevoeliger zijn voor ammoniak dan muggelarven, is het mogelijk dat deze factor ook hier een rol gespeeld heeft bij de gevonden trends in de reproduktie.

3.4.6 Literatuurgegevens over effecten op overleving, groei en reproduktie

In de recente literatuur werd een aantal onderzoeken gevonden, waarbij de reproduktie van aquatische Oligochaeta, nl. Tubificidae, in sedimenten met een verschillende trofie- en verontreinigingsgraad in het laboratorium onderzocht werd.

Wiederholm et al. (1987) stelden vijf Tubificidae-soorten gedurende ca. 500 dagen bloot aan sedimenten uit eutrofe en oligotrofe meren, waarvan één sediment uit een eutroof meer sterk verontreinigd was met zware metalen (1870 mg Cu kg^{-1}, 5090 mg Zn kg^{-1}, 2.6 mg Hg kg^{-1} en 10.4 mg Cd kg^{-1}). Daarnaast werden twee soorten blootgesteld aan een kunstmatig met koper verontreinigd sediment. Peloscolex ferox behoorde echter niet tot de getoetste soorten. De wormen werden blootgesteld in 1½ cm sediment, terwijl geen gegevens werden vermeld over de hoogte van de waterkolom.

Bij blootstelling van juvenielen van Tubifex tubifex aan het verontreinigde eutrofe sediment waren deze binnen een maand dood wanneer er geen voedsel werd toegediend. Er vond hier geen groei of reproduktie plaats. Bij een lage voedseldosering overleefden de wormen maximaal 200 dagen, terwijl de sterfte in de andere sedimenten op dat tijdstip maximaal ca. 20 % bedroeg. Er vond nu echter wel groei en reproduktie plaats. De wormen begonnen echter pas later te groeien en bereikten een

lager maximumgewicht dan in de andere sedimenten. De reproduktie na 200 dagen bedroeg in de andere sedimenten ca. 60 - 125 juvenielen worm^{-1} tegenover <1 juveniel worm^{-1} in het verontreinigde sediment.

Voor Limnodrilus hoffmeisteri werden enigzins afwijkende resultaten gevonden. Bij de lage voedseldosering was de groei van deze soort beter in het verontreinigde sediment dan in het oligotrofe sediment, wat in tegenstelling was met de resultaten voor T. tubifex. Er trad hier echter geen reproduktie op. De sterfte was in het begin hoog (20 % binnen 80 dagen), maar de resterende wormen overleefden tot een blootstellingsduur van 320 tot 400 dagen.

L. hoffmeisteri en T. tubifex werden eveneens blootgesteld aan het kunstmatig met koper verontreinigde sediment, dat afkomstig was uit een eutroof meer. Bij een concentratie van 4.5 g kg^{-1} trad bij beide soorten volledige sterfte op binnen 90 dagen. Bij een concentratie van 1.6 g kg^{-1} trad er nauwelijks sterfte op na 105 dagen. L. hoffmeisteri vertoonde echter een geringere groei en produceerde geen juvenielen. Voor T. tubifex werd een afwijkende groei en reproduktie gevonden, die echter statistisch niet significant waren.

Milbrink (1987) bestudeerde de overleving, groei en reproduktie van juveniele exemplaren van Tubifex tubifex in o.a. sterk met zware metalen verontreinigde sedimenten. Deze sedimenten waren afkomstig uit hetzelfde meer als de door Wiederholm et al. (1987) bestudeerde sedimenten. De volumeverhouding van sediment en water in de testsystemen was 1:2. In vergelijking met minder verontreinigde sedimenten bleken de wormen in een statisch experiment met voedseltoediening in het verontreinigde sediment nauwelijks te groeien. Alle wormen waren binnen 200 dagen dood, terwijl er slechts enkele juvenielen geproduceerd werden gedurende de eerste 100 dagen van de blootstelling. De reproduktie in de andere sedimenten was vele malen hoger. In een semi-statisch experiment, waarbij het verontreinigde sediment gemengd werd met een referentiesediment, trad binnen 60 dagen een snelle sterfte op bij mengsels met meer dan 75 % volume-aandeel van het verontreinigde sediment (bij 100 % reeds binnen ca. 30 dagen). Alleen bij een aandeel van ten hoogste 25 % trad er groei en reproduktie op, waarvan de waarden na 200 dagen ca. 50 % bedroegen van de waarden in het referentiesediment.

Geconcludeerd werd dat toediening van voedsel leidt tot een vermindering van de toxische effecten.

De hierboven beschreven resultaten tonen aan dat zware metalen effecten kunnen hebben op de overleving, groei en reproduktie van Tubificidae. Groei en reproduktie werden over het algemeen eerder beïnvloed dan de overleving. Hieruit blijkt dat de resultaten van toxiciteitsexperimenten met Tubificidae en verontreinigde sedimenten een belangrijke basis kunnen vormen voor de ecotoxicologische onderbouwing van de voorgestelde normering voor waterbodemverontreinigingen.

3.5 Conclusies

De reproduktie van Peloscolex ferox werd in vergelijking met de referentie (Oostvaardersplassensediment) negatief beïnvloed door Ketelmeer- en Haringvlietsediment. Op basis van de coconproduktie per worm werd namelijk voor zowel een mengsel van Ketelmeer- en Oostvaardersplassensediment (met elk 50 % volume-aandeel) als voor 100 % Ketelmeersediment een statistisch significante reductie gevonden. Dit was eveneens het geval voor het aantal eieren per cocon bij blootstelling aan 100 % Haringvlietsediment. De eiproduktie per worm was echter bij deze sedimenten nooit statistisch significant afwijkend. Voor het IJsselmeersediment werd voor geen enkele van de drie reproduktieparameters een statistisch significant verschil gevonden.

Ondanks de soms sterke reducties van de gemiddelde waarden van de drie reproduktieparameters t.o.v. de referentiewaarden werd de afwezigheid van meer statistisch significante verschillen veroorzaakt door de grote variatie in deze parameters. Deze variatie was waarschijnlijk het gevolg van de niet-homogene samenstelling van de proefdierpopulatie.

De gevonden significante verschillen en de trends in de gemiddelden van de reproduktieparameters bij de blootstellingen met 100 % volume-aandeel van de getoetste sedimenten kunnen duiden op negatieve effecten van de verontreinigingen in de sedimenten. Op basis van hiervan lijken het Ketelmeer- en Haringvlietsediment een groter effect op de reproduktie te hebben dan het IJsselmeersediment. Het is echter mogelijk dat de gevonden verschillen (mede) veroorzaakt werden door afwijkende sedimenteigenschappen en chemische omstandigheden t.o.v. het referentiesediment.

4 TOETSPROTOCOLLEN

4.1 Inleiding

Op basis van de resultaten van dit en voorgaand onderzoek werden voor de bioturbatie- en reproduktietoets protocollen opgesteld. Deze protocollen moeten worden gezien als voorlopige richtlijnen voor de uitvoering van toetsen met oligochaete wormen, aangezien de beide toetsmethoden nog in ontwikkeling zijn (zie ook H5 Aanbevelingen). Omdat het toetsprotocol voor de reproduktietoets op sommige punten identiek is aan het protocol voor de bioturbatietoets, zal in onderdeel 4.3 steeds naar onderdeel 4.2 worden verwezen om herhaling van grote delen te voorkomen.

Het protocol voor de bioturbatietoets beschrijft naast de hier toegepaste methode voor het bepalen van effecten van anthropogeen verontreinigde sedimenten ook een methode voor de bepaling van effecten van sedimenten, die op kunstmatige wijze met een te toetsen verbinding verontreinigd zijn. In dit protocol wordt lössgrond genoemd als te gebruiken sediment voor deze toepassing. Eerder onderzoek heeft namelijk aangetoond dat löss afkomstig uit Eysden een geschikt substraat is voor Tubificidae. Voor een verdere standaardisering van deze toepassing van de toets zal er echter gebruik gemaakt moeten worden van een kunstmatig substraat met een constante samenstelling. Dit standaardsediment wordt daarom in het protocol reeds vermeld. De samenstelling van dit standaardsediment dient na nader onderzoek te worden vastgesteld.

In beide toetsprotocollen wordt de soort Peloscolex ferox als toetsorganisme genoemd. Voor deze soort is gekozen vanwege de uiterlijke herkenbaarheid, zodat selectie van deze wormen uit een mengsel van soorten voor reproduktietoetsen mogelijk is. Voor het gebruik in bioturbatietoetsen is selecteren zeer arbeidsintensief, zodat het gebruik van deze soort alleen realiseerbaar is wanneer er een kweek van beschikbaar is. Uiteindelijk zal er voor beide toetsen een kweek van een Oligochaeta-soort beschikbaar moeten zijn, waarbij de keuze vooral bepaald zal worden door de gevoeligheid, de kweekbaarheid en de ecologische eisen van de soort.

4.2 Bepaling van de toxische effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de bioturbatie door Peloscolex ferox (Tubificidae)

Onderwerp

Dit protocol beschrijft een methode voor de bepaling van effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de bioturbatie-activiteit van aquatische wormen.

Toepassingsgebied

De beschreven methode kan worden toegepast bij de bepaling van de toxiciteit van:

(a) een stof, waarmee één of, ter vergelijking, meerdere sedimenten kunstmatig worden verontreinigd,

(b) een anthropogeen verontreinigd sediment.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van gestandaardiseerd water en löss, een gestandaardiseerd kunstmatig sediment of een aantal onderling te vergelijken sedimenten (toepassing a) of een schoon equivalent van het te toetsen verontreinigde sediment (toepassing b).

Definities

$LC_{50}(t)$ van een stof c.q. verontreinigd sediment: de concentratie van een stof c.q. het percentage (hierna eveneens aangeduid met "concentratie") van een verontreinigd sediment na menging met een schoon vergelijkbaar sediment waarbij 50% van de blootgestelde proefdieren na een blootstellingsduur t dood is.

$EC_{50}(t)$ van een stof c.q. verontreinigd sediment: de effectieve concentratie van een stof c.q. sediment die 50% remming t.o.v. de controle geeft na een blootstellingsduur t.

Bioturbatie: het omwoelen en mengen van sedimenten t.g.v. de activiteit van gravende benthische organismen (Petr, 1977).

Beginsel

Als maat voor de toxiciteit van een stof of een verontreinigd sediment worden de sterfte (LC_{50}) en de remming van de bioturbatie-activiteit bij subletale concentraties (EC_{50}) door Peloscolex ferox gebruikt. Als maat voor de bioturbatie-activiteit wordt de bedekking van een op het sedimentoppervlak aangebrachte contrastlaag met faecale pellets bepaald. De sterfte en de bioturbatie-activiteit worden vergeleken met die in controlegroepen.

Benodigdheden

- Wormen van de soort Peloscolex ferox (Tubificidae): afkomstig uit een laboratoriumkweek of uit de handel, individueel natgewicht: ca. 2 mg.
- Proefruimte met een temperatuur van 20 °C en een lichtperiode van 12 uur per dag.
- Perslucht en beluchtingsmaterialen (pasteurpipetjes, slangen, verdeelkraantjes).
- Volglasbakjes (10x10x10 cm) die langs de buitenwanden tot een hoogte van 5 cm voorzien zijn van een lichtwerende laag.
- Potjes (volume 15-25 ml) voor uittellen en bewaren van de wormen.
- Glazen afdekplaatjes (12x12 cm).
- Dunwandige glazen cilindertjes, die aan één zijde gesloten zijn (inw. ø: 4 cm; hoogte: 6 cm).
- Spiegelreflexcamera met macrolens (brandpunt ca. 105 mm).
- Zwart-wit negatieffilms (type Ortho).
- Grijstrap (Merk: Kodak) en cm-maatverdeling.
- Belichtingsapparatuur (flitsers of halogeenlampen (500 W)).
- Afgeknotte pyramide van wit, transparant kunststof, die aan de boven- en onderzijde open is (hoogte 35 cm, zijvlakken: breedte oplopend van 20 naar 40 cm) (Figuur 2.1a).
- Vergroter met meetcel.
- Fotografisch zwart-wit papier (hardheidsgradatie 4).

- Stabiel werkplateau met erboven een rail, waaraan een camera en indien mogelijk de belichtingsapparatuur bevestigd kunnen worden, die in horizontale richting te manipuleren zijn (Figuur 2.1a en Bijlage V). Op het plateau ligt een polystyreenplaat, waarop de testsystemen geplaatst worden.
- Voorraadvat met standaardwater (DSW).
- Löss-grond of onderling te vergelijken sedimenten (toepassing a), een schoon equivalent van het verontreinigde sediment (toepassing b) of een kunstmatig standaardsediment (beide toepassingen) (fractie <250 µm; verkregen d.m.v. zeven zonder toevoeging van (extra) water).
- Glasparels (ϕ ca. 125-250 µm) en spatel.
- Pipetten en maatcilinders (diverse volumes).
- Potten van 1 l (polyethyleen, glas) met hermetisch afsluitende deksels.
- Schudmachine(s).
- Spoelgoot en roestvrij-stalen zeven (maaswijdte ca. 125, 250 en 500-1000 µm; diameter 20 cm) (Bijlage V).
- Witte kunststof bakken (ca. 25x35x5 cm).
- Glazen buisjes (lengte ca. 10 cm, ϕ ca. 5 mm) met speentjes.
- Zuur en base (1 M HCl en 1 M NaOH).
- pH-meter.
- Zuurstofmeter.
- Micro-balans (nauwkeurigheid tot in mg; bereik tot 500 mg).
- Balans (nauwkeurigheid tot in g; bereik tot 1 kg).
- Beeldanalyse-apparatuur (Quantimet) of lijnen- of puntenraster.

Uitvoering

A Voorbereidingen

Wormen

De wormen worden in het laboratorium in een kweeksysteem gehouden bij 20 °C. Dit systeem bestaat uit een bak met daarin 5-10 cm löss met daarboven een waterkolom van 20-30 cm, die continu ververst en met perslucht doorborreld wordt. De kweek wordt in stand gehouden door eens

per week organisch materiaal (Brinta, Tetramin, visvoederpellets) toe te voegen.

Wanneer de wormen rechtstreeks uit de handel worden verkregen, dan verdient het aanbeveling deze minimaal 4 weken in het kweeksysteem te laten acclimatiseren.

Op de dag van gebruik worden de wormen uit het sediment van het kweeksysteem gespoeld. Dit gebeurt m.b.v. een spoelgoot, waarbij de wormen worden opgevangen m.b.v. een zeef met een maaswijdte van 250 µm. Nadat ze in witte bakken zijn overgebracht, worden groepen van 40 stuks per in te zetten testsysteem uitgeteld en in 10 ml DSW bewaard.

Aanbrengen van de verontreiniging

Verontreiniging van water en sediment met een stof.

Er wordt een concentratiereeks van minimaal 4 oplossingen van de stof en een blanco-oplossing (eventueel inclusief oplosmiddel) gemaakt. Deze worden toegevoegd aan löss (eventueel een ander sediment) in potten van 1 l (totaalvolume na samenvoegen 650 ml), waarna deze gedurende 24 u bij 20 °C geschud worden. Voor sterk lipofiele stoffen worden suspensies bereid met verschillende concentraties door het sediment gedurende een langere periode d.m.v. een recirculatiesysteem in evenwicht te laten komen met een verontreinigd absorbens.

De suspensies moeten na bezinken resulteren in een sediment- en een waterkolom van elk ca. 4 cm. Elke suspensie wordt voor de bepaling van de effecten op de bioturbatie in vijfvoud uitgevoerd. Voor een rangefinding van de subletale concentraties worden minimaal 5 suspensies met verschillende concentraties in duplo gebruikt.

Na de kunstmatige verontreiniging van het sediment worden de potten geleegd in de volglasbakjes op het werkplateau, zodat het sediment kan bezinken. In elk van deze bakjes is tevoren in een hoekpunt een glazen cilindertje geplaatst met de gesloten zijde naar onderen. Bij het leeggieten van de potten worden deze cilindertjes eveneens gevuld met de suspensies.

Verontreiniging met een anthropogeen verontreinigd sediment.

Van de te gebruiken sedimenten wordt de hoogte van de sedimentkolom van drie verschillende hoeveelheden nat sediment na bezinken bepaald. Hiertoe worden deze hoeveelheden tevoren met DSW gedurende 24 u bij 20 ^{o}C geschud (totaalvolume 650 ml). Op basis hiervan worden mengsels van de beide sedimenten (verontreinigd en schoon equivalent) bereid die resulteren in een sediment- en waterkolom van ieder ca. 4 cm. Het aandeel van het te toetsen sediment aan de totale sedimentkolom na bezinken bedraagt hierbij 0 en 100% met tenminste 3 tussenliggende percentages (equidistante stappen).

De volglasbakjes zijn op dezelfde wijze ingericht als beschreven in het voorgaande deel. De suspensies worden hierin overgegoten, zodat het sediment kan bezinken.

B De eigenlijke toets

Na 3 dagen bezinken van het sediment, wordt gestart met de doorborreling van de waterkolommen met perslucht. Na 2-3 uur worden de zuurstofconcentratie en de zuurgraad bepaald. De zuurgraad wordt indien nodig gecorrigeerd m.b.v. zuur of base tot binnen de range die gevonden wordt bij de controlesystemen.

Vervolgens worden de reeds beschikbare groepjes wormen in de testsystemen overgebracht m.b.v. een glazen buisje met een speentje. Ze worden in het midden van het systeem onder het wateroppervlak losgelaten, zodat ze zich daarna in alle richtingen over het sedimentoppervlak kunnen verspreiden en zich kunnen ingraven in het sediment.

Indien de toets plaatsvindt ter bepaling van de effecten van een stof op de bioturbatie, dan wordt de volgende dag in elk systeem een egaal laagje glasparels (30 g) op het sedimentoppervlak aangebracht. Bij de uitvoering van een range-finding-experiment worden de wormen 4 dagen later uit het sediment gespoeld en opgevangen m.b.v. een zeef met een maaswijdte van 125 um, zodat de sterftepercentages bepaald kunnen worden.

Indien de toets wordt uitgevoerd ter bepaling van de effecten van een anthropogeen verontreinigd sediment, dan worden de wormen na 1 week uit het sediment gespoeld. Na bepaling van de overleving worden de

wormen in nieuw bereide belaste testsystemen overgebracht, waarin ze nogmaals een week worden blootgesteld. Na deze week worden deze handelingen herhaald. Op de vierde dag na het overzetten van de wormen wordt nu echter in elk van de systemen een egaal laagje glasparels (30 g) aangebracht op het sedimentoppervlak.

Vier dagen na het toevoegen van de glasparels worden van elk systeem foto-opnamen gemaakt van de faecale pelletpatronen op de contrastlagen. Dit gebeurt na het plaatsen van een afgeknotte pyramide boven het te registreren systeem (Figuur 2.1a). De pyramide wordt langs twee zijden belicht m.b.v. lampen of flitsers. Hierbij worden de grijstrap en de maatverdeling telkens meegefotografeerd. De wormen worden daarna uit het sediment gespoeld, zodat de overleving bepaald kan worden.

Tijdens de toets wordt de zuurgraad, indien mogelijk, dagelijks (toepassing a) of 3x per week (toepassing b) bepaald en gecorrigeerd tot binnen de aan het begin van de toets bepaalde range bij de controlesystemen. Eveneens wordt de zuurstofconcentratie geregistreerd; deze moet minimaal 7 mg/l bedragen en bij alle systemen van dezelfde orde van grootte zijn. Eventuele verschillen tussen systemen (bv. kleuring van de contrastlaag en de waterkolom, aantal wormen op de contrastlaag) worden geregistreerd.

Bij toetsing na toevoeging van een stof worden aan het begin, halverwege en aan het eind van het experiment monsters genomen van de waterkolom ter bepaling van de opgeloste concentraties van de stof. Een aantal extra systemen met wormen, die niet gebruikt worden voor de range-finding of de meting van de bioturbatie, kunnen worden gebruikt voor de analyse van de stof in het sediment.

Eventueel kunnen extra waarnemingen gedaan worden, zoals registratie van subletale effecten en bepaling van de groepsmassa's aan het eind van de toets (zie 2.2 Materiaal en methoden: overige waarnemingsparameters).

Tijdens de toets kunnen aan de extra systemen aanvullende metingen worden verricht, die van belang kunnen zijn voor de beoordeling van de gevonden effecten op de bioturbatie (bv. opgelost organisch C-gehalte (DOC), gehalte aan organische C-deeltjes (POC), zwevende stof, alkaliniteit, hardheid, concentraties van zouten en ammoniak).

C Verwerking van de negatieven

De negatieven worden afgedrukt op het fotopapier. Indien er t.g.v. verschillen in kleuring van de sediment- of waterkolom sprake is van verschillende grijstinten van de ongestoorde contrastlaag in de glazen cilindertjes, dan wordt de grijstint in één van de controlesystemen als referentie gebruikt voor het afdrukken van de overige negatieven.

D Verwerking van de gegevens

De sterfteresultaten, die gevonden worden bij de bepaling van de subletale range van de toegevoegde stof, worden gecorrigeerd voor de sterfte in de controles plaats m.b.v. Abbott's formule:

$$p_i^* = \frac{p_i - p_0}{100 - p_0} \times 100$$

p_i^* = gecorrigeerd sterftepercentage bij concentratie i
p_i = waargenomen sterftepercentage bij concentratie i
p_0 = waargenomen sterftepercentage bij de controle

Indien mogelijk worden de LC_{50}-waarden voor de concentraties in water en sediment (toepassing a) of de concentratie van het sediment (toepassing b) bepaald m.b.v. de methode van Litchfield & Wilcoxon (1949).

De resultaten van de systemen, waarbij maximaal 10% sterfte optrad na correctie voor de sterfte in de controlesystemen, worden gebruikt voor de bepaling van de effecten op de bioturbatie. De met faecale pellets bedekte oppervlakten worden bepaald d.m.v. telling met een punten- of lijnenraster of m.b.v. een beeldanalyse-apparaat.

M.b.v. variantie-analyse (ANOVA) wordt bepaald of er een significant verschil is in de gemiddelde oppervlakten bij de verschillende concentraties. Afwijkingen t.o.v. de controle worden getoetst m.b.v. Dunnett's procedure (Steel & Torrie, 1980). M.b.v. lineaire regressie-analyse wordt de relatie bepaald tussen de concentraties en de gemiddelde oppervlakten per concentratie. Indien mogelijk worden op basis van deze relaties de EC_{50}-waarden voor de water- en sedimentconcentra-

tie c.q. het sedimentaandeel bepaald. Wanneer er sprake is van een stimulerend effect, dan worden de controle en eventueel de laagste concentraties, waarbij stimulatie optreedt, buiten beschouwing gelaten bij de regressie-analyse.

Verslag

Bij de rapportering worden de volgende gegevens verwerkt:

- karakteristieken van de gebruikte sedimenten:
  droogrest, korrelgrootteverdeling (o.a. lutumgehalte), organisch koolstofgehalte, gehaltes aan totaal N (Kjeldahl), totaal P (P_2O_5), Fe en Mn, concentraties van aanwezige verontreinigingen
- analyseresultaten van sediment en/of water (indien van toepassing)
- zuurgraden en zuurstofconcentraties
- beschrijving van de toegepaste methode voor de oppervlaktebepaling, LC_{50}-waarde (indien van toepassing), resultaten van de oppervlaktemetingen, variantie- en regressie-analyse en Dunnett's procedure, EC_{50}-waarde voor bioturbatie (eventueel waarden voor geringer effect), concentraties waarbij stimulatie optrad
- groepsmassa's en daaruit berekende individuele massa's (indien bepaald)
- overige waarnemingen (kleurverschillen bij verschillende concentraties, aantal wormen op de contrastlaag)
- eventuele afwijkingen van het protocol.

4.3 Bepaling van de toxische effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de reproduktie van Peloscolex ferox (Tubificidae)

Onderwerp

Dit protocol beschrijft een methode voor de bepaling van effecten van verontreinigingen in sediment-water systemen op de reproduktie van aquatische wormen.

Toepassingsgebied

Zie 4.2 Toepassingsgebied.

Definities

Zie 4.2 Definities.

Beginsel

Als maat voor de toxiciteit van een stof of een verontreinigd sediment worden de sterfte (LC_{50}) en de remming van de reproduktie bij subletale concentraties (EC_{50}) door Peloscolex ferox gebruikt. Als reproduktieparameters worden de gemiddelde cocon- en eiproduktie per individu en de coconinhoud (eieren/cocon) gebruikt. De sterfte en de reproductie worden vergeleken met die in controlegroepen.

Benodigdheden

- Wormen van de soort Peloscolex ferox (Tubificidae): afkomstig uit een laboratoriumkweek of uit de handel.
- Proefruimte met een temperatuur van 20 °C en een lichtperiode van 12 uur per dag.
- Perslucht en beluchtingsmaterialen (pasteurpipetjes, slangen, verdeelkraantjes).
- Glazen potjes (inwendige ϕ: ca. 6 cm, hoogte: ca. 6.5 cm)
- Potjes (volume 15-25 ml) voor uittellen en bewaren van de wormen.
- Voorraadvat met standaardwater (DSW).
- Löss-grond of onderling te vergelijken sedimenten (toepassing a), een schoon equivalent van het verontreinigde sediment (toepassing b) of een kunstmatig standaardsediment (beide toepassingen), waarin geen wormen of cocons aanwezig zijn (fractie <250 um; verkregen d.m.v. zeven met gebruik van een borstel zonder toevoeging van extra water).
- Pipetten en maatcilinders (diverse volumes).
- Potten van 250 ml (polyethyleen, glas) met hermetisch afsluitende deksels.
- Schudmachine.

- Spoelgoot en roestvrij-stalen zeven (maaswijdte ca. 125, 250 en 500-1000 µm; diameter 20 cm) (Bijlage V).
- Witte kunststof bakken (ca. 25x35x5 cm).
- Glazen buisjes (lengte ca. 10 cm, ø ca. 5 mm) met speentjes.
- Zuur en base (1 M HCl en 1 M NaOH).
- pH-meter.
- Zuurstofmeter.
- Balans (nauwkeurigheid tot in g; bereik tot 1 kg).
- Binoculair.

Uitvoering

A Voorbereidingen

Wormen

De wormen worden in het laboratorium in een kweeksysteem gehouden of worden uit de handel verkregen en geacclimatiseerd (zie 4.2 Uitvoering).

Op de dag van gebruik worden de wormen uit het sediment van het kweeksysteem gespoeld. Dit gebeurt m.b.v. een spoelgoot, waarbij de wormen worden opgevangen m.b.v. een zeef met een maaswijdte van 125 µm. Nadat ze in witte bakken zijn overgebracht, worden groepen van 20 wormen per in te zetten testsysteem uitgeteld en in 10 ml DSW bewaard.

Aanbrengen van de verontreiniging

Verontreiniging van water en sediment met een stof.

Er wordt een concentratiereeks van minimaal 4 oplossingen van de stof en een blanco-oplossing (eventueel inclusief oplosmiddel) gemaakt. Deze worden toegevoegd aan löss (eventueel een ander sediment) in potten van 250 ml (totaalvolume na samenvoegen 150 ml), waarna deze gedurende 24 u bij 20 °C geschud worden. Voor lipofiele stoffen: zie 4.2 Uitvoering. De suspensies moeten na bezinken resulteren in een sediment- en een waterkolom van elk ca. 2½ cm. Elke suspensie in het subletale gebied wordt in drievoud uitgevoerd. Voor een range-finding

van de subletale concentraties worden minimaal 5 suspensies met verschillende concentraties in duplo gebruikt.

Na de kunstmatige verontreiniging van het sediment worden de potten geleegd in de glazen potjes, waarna het sediment kan bezinken.

Verontreiniging met een anthropogeen verontreinigd sediment.

Van de te gebruiken sedimenten wordt de hoogte van de sedimentkolom van drie verschillende hoeveelheden nat sediment na bezinken bepaald. Hiertoe worden deze hoeveelheden tevoren met DSW gedurende 24 u bij 20 ^{o}C geschud (totaalvolume 150 ml). Op basis hiervan worden mengsels van de beide sedimenten (verontreinigd en schoon equivalent) bereid die resulteren in een sediment- en waterkolom van ieder ca. 2½ cm. Het aandeel van het te toetsen sediment aan de totale sedimentkolom na bezinken bedraagt hierbij 0 en 100% met tenminste 1 tussenliggend percentage (equidistante stappen).

B De eigenlijke toets

Na 3 dagen bezinken van het sediment, wordt gestart met de doorborreling van de waterkolommen met perslucht. Na 2-3 uur worden de zuurstofconcentratie en de zuurgraad bepaald. De zuurgraad wordt indien nodig gecorrigeerd m.b.v. zuur of base tot binnen de range die gevonden wordt bij de controlesystemen.

Vervolgens worden de reeds beschikbare groepjes wormen van 20 wormen in de testsystemen overgebracht m.b.v. een glazen buisje met een speentje.

Na 1 week worden de wormen uit het sediment gespoeld en opgevangen op een zeef met een maaswijdte van 125 um. Na bepaling van de overleving worden ze in nieuw bereide belaste testsystemen overgebracht. De restanten van het sediment, waaruit de wormen werden gehaald, worden vervolgens gezeefd over 250 um. De uitgezeefde fractie wordt onder een binoculair bestudeerd op de aanwezigheid van eicocons. Het aantal eicocons en het aantal eieren per cocon wordt per herhaling geregistreerd. De hiervoor beschreven handelingen worden gedurende de twee volgende weken herhaald.

Tijdens de toets wordt de zuurgraad 3x per week bepaald en gecorrigeerd tot binnen de aan het begin van de toets bepaalde range bij de controlesystemen. Eveneens wordt de zuurstofconcentratie geregistreerd; deze moet minimaal 7 mg/l bedragen en bij alle systemen van dezelfde orde van grootte zijn. Eventuele verschillen tussen systemen (bv. kleuring van de waterkolom, aantal wormen op het sedimentoppervlak) worden geregistreerd.

Bij toetsing na toevoeging van een stof worden aan het begin, halverwege en aan het eind van het experiment monsters genomen van de waterkolom ter bepaling van de opgeloste concentraties van de stof. Een aantal extra systemen met wormen, die niet gebruikt worden voor de range-finding of de bepaling van de reproduktie, kunnen worden gebruikt voor de analyse van de stof in het sediment.

Eventueel kunnen extra waarnemingen gedaan worden, zoals registratie van subletale effecten.

Ook tijdens deze toets kunnen aan de extra systemen aanvullende metingen worden verricht, die van belang kunnen zijn voor de beoordeling van de gevonden effecten op de reproduktie (zie 4.2 Uitvoering).

C Verwerking van de gegevens

Evenals bij de bioturbatietoets wordt, indien mogelijk, de LC_{50} na 1, 2 en 3 weken bepaald (zie 4.2 Verwerking van de gegevens).

Op basis van de overlevingsresultaten van elke periode van een week wordt het gemiddelde aantal aanwezige wormen berekend. Tesamen met de cocon- of eiproduktie levert dit voor elke week de produktie per individu, die vervolgens voor de gehele toetsduur gesommeerd worden.

M.b.v. variantie-analyse (ANOVA) wordt bepaald of er sprake is van een significant verschil tussen de gemiddelden van de cocon- en eiproduktie en de coconinhoud bij de verschillende concentraties. Afwijkingen t.o.v. de controle worden getoetst m.b.v. Dunnett's procedure (Steel & Torrie, 1980). Als er meer dan drie verschillende sedimentaandelen werden gebruikt, wordt m.b.v. lineaire regressie-analyse bestudeerd of er sprake is van een significante relatie tussen elk van de reproduktieparameters en de concentratie van de verontreiniging. Indien mogelijk worden EC_{50}-waarden voor de water- en sedimentconcentratie c.q. het sedimentaandeel voor beide parameters bepaald.

Verslag

Bij de rapportering worden de volgende gegevens verwerkt:

- karakteristieken van de gebruikte sedimenten (zie 4.2 Verslag)
- analyseresultaten van sediment en/of water (indien van toepassing)
- zuurgraden en zuurstofconcentraties
- resultaten van overleving, cocon- en eiproduktie en coconinhoud
- LC_{50}-waarde (indien van toepassing), resultaten van variantie- en regressie-analyse en Dunnett's procedure, EC_{50}-waarde voor cocon- en eiproduktie en coconinhoud (eventueel waarden voor geringer effect), concentraties waarbij stimulatie optrad
- overige waarnemingen (kleurverschillen bij verschillende concentraties, aantal wormen op het sedimentoppervlak)
- eventuele afwijkingen van het protocol.

5 AANBEVELINGEN

Zowel ten aanzien van de bioturbatie- als de reproduktietoets met anthropogeen verontreinigde sedimenten kunnen er een aantal overeenkomstige aanbevelingen gedaan worden.

De eerste aanbeveling is dat, voordat verdere toetsen met oligochaete wormen worden uitgevoerd, er een kweeksysteem voor één of meerdere soorten wordt opgezet. Hierdoor kunnen wormen verkregen worden met eenzelfde gevoeligheid, leeftijd en grootte, waardoor de variatie in de toetsresultaten waarschijnlijk verminderd kan worden.

De tweede aanbeveling heeft betrekking op de variatie van overleving, bioturbatie en reproduktie in verschillende referentiesedimenten. Om de invloed van een aantal factoren (o.a. sedimenteigenschappen (korrelgrootte en organisch koolstofgehalte), voedselaanbod, zuurgraad, zout- en ammoniakgehalte) na te gaan, zouden vergelijkende experimenten uitgevoerd kunnen worden. Hierdoor kan inzicht verkregen worden in het belang van deze factoren voor de vergelijkbaarheid van de bioturbatie en reproduktie in verontreinigde sedimenten en in een schoon "equivalent" referentiesediment. Het zout- en ammoniakgehalte zouden bovendien als waarnemingsparameters bij de toetsen kunnen worden toegevoegd, omdat deze verantwoordelijk kunnen zijn voor eventuele effecten.

Een volgende aanbeveling is het uitvoeren van de toetsen met een langere blootstellingsduur. Bij de bioturbatie-experimenten waren er tijdens dit onderzoek nauwelijks verschillen aanwezig tussen het referentiesediment en de verontreinigde sedimenten. Wellicht dat een verlenging van de blootstellingsduur wel effecten aan het licht kan brengen. Deze verlenging van de toets kan gerealiseerd worden door de contrastlaag pas na een langere blootstelling van de wormen op het sedimentoppervlak aan te brengen. Een alternatief is het gebruik van testsystemen met een groter sedimentoppervlak, zodat overlapping van de faecale pellets minder snel plaatsvindt en waardoor registratie van de activiteit vanaf het begin van de toets kan plaatsvinden.

Bij de reproduktietoets zou door verlenging van de blootstellingsduur i.p.v. de cocon- en eiproduktie het aantal uitgekomen juvenielen bestudeerd kunnen worden. Een alternatief is een toets waarbij gestart wordt met cocons i.p.v. adulten, zodat sneller effecten van veront-

reinigingen zichtbaar worden. Omdat cocons vaak soortspecifieke kenmerken hebben, kunnen op basis hiervan toetsen met één soort worden uitgevoerd.

Licht kan leiden tot stimulatie van de activiteit van oligochaete wormen (Keilty et al., 1988a). Onderzoek naar de gevolgen van de uitvoering van de bioturbatietoets in het donker kan inzicht geven in de omvang van de vermindering van de activiteit. Hierdoor wordt de afname van het verloop van de bedekking van de contrastlaag in de tijd minder snel bereikt, zodat de toetsduur hierop aangepast kan worden.

Tijdens dit onderzoek werden er bij de bioturbatietoetsen gedurende meerdere dagen activiteitswaarnemingen aan de testsystemen uitgevoerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van fotografie, zodat de testsystemen niet verstoord werden. Wanneer echter alleen aan het eind van de toets de hoeveelheid opgebrachte faecale pellets fotografisch geregistreerd wordt en het verstoren van de testsystemen dus geen probleem is, kan er een andere methode tot kwantificering van de activiteit gebruikt worden. Deze methode houdt het bepalen van de droogrest van de pellets op de contrastlaag in, zodat een directe maat voor de activiteit verkregen wordt. Nader onderzoek naar deze methode zal inzicht moeten geven in de praktische uitvoerbaarheid.

LITERATUUR

Appleby, A.D. & R.O. Brinkhurst (1970). Defecation rate of three tubificid oligochaetes found in the sediment of Toronto Harbour, Ontario. J. Fish. Res. Bd. Can. 27: 1971-1982.

Boddington, M.J., A.S.W. DeFreitas & D.R. Miller (1979). The effect of benthic invertebrates on the clearance of mercury from sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 3: 236-244.

Brinkhurst, R.O., K.E. Chua & N.K. Kaushik (1972). Interspecific interactions and selective feeding by tubificid oligochaetes in relation to sublethal stress. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 68: 683-699.

Brinkhurst, R.O. & M.J. Austin (1979). Assimilation of aquatic oligochaetes. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 63: 863-868.

Chapman, P.M., M.A. Farrell & R.O. Brinkhurst (1982). Effects of species interactions on the survival and respiration of Limnodrilus hoffmeisteri and Tubifex tubifex (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to various pollutants and envrionmental factors. Water Res. 16: 1405-1408.

Chua, K.E. & R.O. Brinkhurst (1973). Evidence of interspecific interactions in the respiration of tubificid oligochaetes. J. Fish. Res. Bd. Can. 30: 617-622.

Davis, R.B. (1974). Stratigraphic effects of tubificids in profundal lake sediments. Limnol. Oceanogr. 19: 466-488.

Guchte, C. van de & J.L. Maas-Diepeveen (1987). Screening sediments for toxicity: a water-concentration related problem. Proceedings of the 14th Annual Aquatic Toxicity Workshop, November 1-4, 1987, Toronto, Ontario, Canada.

Guchte, C. van de & R.N. Hooftman (in druk). Ecotoxicologische toetsen als basis voor normstelling waterbodems. Proceedings symposium "Studie van effecten van verontreinigde waterbodems op aquatische ecosystemen", 11 mei 1988, Ede.

Hargrave, B.T. (1976). The central role of invertebrate faeces in sediment decomposition. In: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes, J.M. Anderson & A. Macfadyen (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 301-321.

Higler, L.W.G. (1985). Onderwaterbodems en de betekenis ervan voor het aquatisch ecosysteem. In: Onderwaterbodems, rol en lot, V.W.J. van den Bergen et al. (red.), KNCV, Sectie Milieuchemie, pp. 14-25.

Howmiller, R.P. & M.A. Scott (1977). An environmental index based on relative abundance of oligochaete species. J.Water Pollut. Contr. Fed. 49: 809-815.

Karickhoff, S.W. & K.R. Morris (1985). Impact of tubificid oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. Environ. Sci. Technol. 19: 51-56.

Keilty, T.J., D.S. White & P.F. Landrum (1988a). Short-term lethality and sediment avoidance assays with endrin-contaminated sediment and two oligochaetes from Lake Michigan. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17: 95-101.

Keilty, T.J., D.S. White & P.F. Landrum (1988b). Sublethal responses to endrin in sediment by Stylodrilus heringianus (Lumbriculidae) as measured by a ^{137}cesium marker layer technique. Aquat. Toxicol. 13: 251-270.

Keilty, T.J., D.S. White & P.F. Landrum (1988c). Sublethal responses to endrin in sediment by Limnodrilus hoffmeisteri (Tubificidae), and in mixed-culture with Stylodrilus heringianus (Lumbriculidae). Aquat. Toxicol. 13: 227-250.

Krantzberg, G. (1985). The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. Environ. Pollut. (Ser. A) 39: 99-122.

Krezoski, J.R., S.C. Mozley & J.A. Robbins (1978). Influence of benthic macroinvertebrates on mixing of profundal sediments in southeastern Lake Huron. Limnol. Oceanogr. 23: 1011-1016.

Lee, H (II) & R.C. Swartz (1980). Biological processes affecting the distribution of pollutants in marine sediments. Part II: Biodeposition and Bioturbation. In: Contaminants and sediments, Vol. 2: Analysis, Chemistry, Biology, R.A. Baker (ed.), Ann Arbor Science Publishers Corp. Inc., Michigan, pp. 555-606.

Litchfield, J.T. & F. Wilcoxon (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmac. exp. Ther. 96: 99-113.

McCall, P.L. & J.B. Fisher (1980). Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In: Aquatic oligochaete biology, R.O. Brinkhurst & D.G. Cook, New York, Plenum, pp. 253-317.

Milbrink, G. (1983). An improved environmental index based on the relative abundance of oligochaete species. Hydrobiologia 102: 89-97.

Milbrink, G. (1987). Biological characterization of sediments by standardized tubificid bioassays. Hydrobiologia 155: 267-275.

Petr, T. (1977). Bioturbation and the exchange of chemicals in the mud-water interface. In: Interactions between sediments and freshwater, H.L. Golterman (ed.), Junk, The Hague, pp. 216-226.

Poorter, L.R.M. de (1988). Effecten van koper op de bioturbatie door Tubificidae. Doctoraalverslag Toxicologie, vakgroep Toxicologie, Landbouwuniversiteit Wageningen.

Robbins, J.A. (1982). Stratigraphic and dynamic effects of sediment reworking by Great Lakes zoobenthos. Hydrobiologia 92: 611-622.

Robbins, J.A., K. Husby-Coupland & D.S. White (1984). Precise radiotracer measurement of the rate of sediment reworking by Stylodrilus heringianus and the effects of variable dissolved oxygen concentrations. J. Great Lakes Res. 10: 335-347.

Stammer, H.A.S. (1953). Der Einfluss von Schwefelwasserstoff und Ammoniak auf tierischen Leitformen des Saprobeinsystems. Vom Wasser 20: 34-71.

Steel, R.G.D. & J.H. Torrie (1980). Principles and procedures of statistics - a biometrical approach. McGraw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo.

Södergren, A. (1985). Transport of organic micropollutants and metals between sediments and water. In: Onderwaterbodems, rol en lot, V.W.J. van den Bergen et al. (red.), KNCV, Sectie Milieuchemie, pp. 50-56.

Thomann, R.V. & D.M. Di Toro (1983). Physico-chemical model of toxic substances in the Great Lakes. J. Great Lakes Res. 9: 474-496.

Verdonschot, P.F.M. (1979). Aquatische Oligochaeta Introductie. Delta Instituut voor Hydrobiologisch Onderzoek, Rapporten en verslagen nr. 1979-11.

White, D.S., P.C. Klahr & J.A. Robbins (1987). Effects of temperature and density on sediment reworking by Stylodrilus heringianus (Oligochaeta: Lumbriculidae). J. Great Lakes Res. 13: 147-156.

Wiederholm, T., A.-M. Wiederholm & G. Milbrink (1987). Bulk sediment bioassays with five species of fresh-water oligochaetes. Water, Air & Soil Pollut. 36: 131-154.

BIJLAGE I

Samenstelling Dutch Standard Water (DSW).

Zout	Hoeveelheid (mg/l)
$NaHCO_3$	100
$KHCO_3$	20
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	200
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	180

Totale hardheid: 208 mg $CaCO_3$/l

BIJLAGE II

Droogresten van de gezeefde sedimenten en toegevoegde hoeveelheden nat sediment en DSW tijdens de bioturbatie-experimenten.

Droogresten

Sedimentmonster	Droogrestpercentage[a] (gemiddelde ± s.d.)
Oostvaardersplassen I	27,7 ± 0,1
Oostvaardersplassen II	30,3 ± 0,1
IJsselmeer	31,3 ± 0,0
Ketelmeer	43,2 ± 0,1
Haringvliet	39,7 ± 0,1

[a] Na 24 u drogen bij 105 °C.

Toegevoegde hoeveelheden sediment en DSW

IJsselmeersediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	IJ'meer	DSW (ml)
0[b]	296	-	400
33	198	72	422
67	98	145	445
100	-	216	468

Ketelmeersediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	K'meer	DSW (ml)
0[b]	296	-	400
33	198	113	394
67	98	225	389
100	-	338	382

Haringvlietsediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	H'vliet	DSW (ml)
0[b]	296	-	400
33	198	102	404
67	98	205	408
100	-	307	412

[a] Oostvaardersplassensediment: monster I.
[b] 100 % Oostvaardersplassensediment.

BIJLAGE III

Numerieke en procentuele samenstelling van de wormen in de laboratoriumkweek met hun trofiegraad-voorkeur.

Soort	Aantal	%	Trofiegraad
Limnodrilus claparedeanus[a]	10	20	eutroof
Potamothrix hammoniensis[a]	15	30	mesotroof tot eutroof
Tubifex spec.[a]	9	18	eutroof[b]
Peloscolex ferox[a]	3	6	oligotroof
Naididae spec.	13	26	

[a] Behorend tot de Tubificidae.
[b] Voorkeur van Tubifex tubifex: deze soort wordt echter ook vaak gevonden in oligotrofe wateren.

N.B. De wormen werden aan het begin van dit onderzoek verkregen via de handel en vervolgens in het laboratorium verder gekweekt in een sediment-water systeem met een mengsel van rivierklei en potgrond.

BIJLAGE IV

Analyse van foto's met de Quantimet 970.

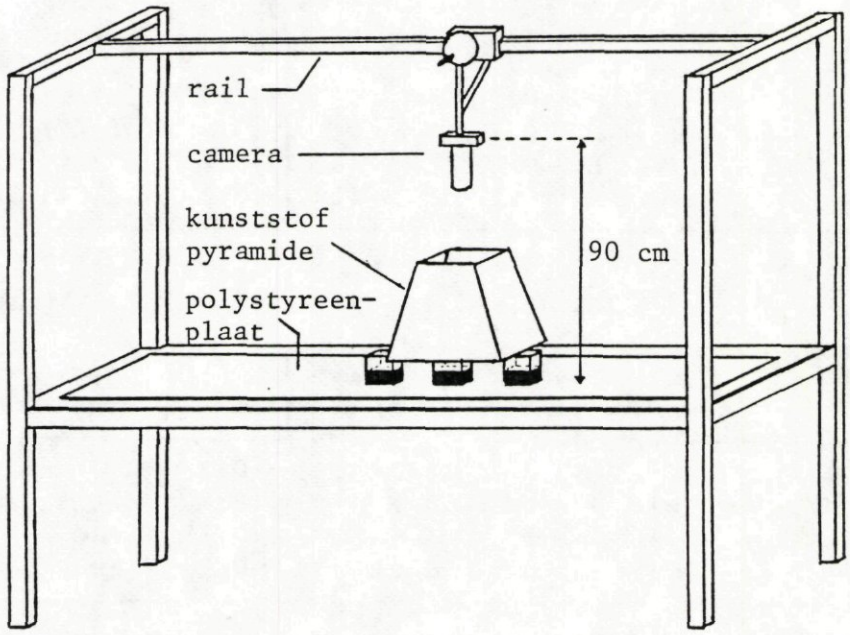
De Quantimet 970 bestaat uit een optische eenheid, een omzettings- en detectie-eenheid en een analyse-eenheid. Voor het verrichten van metingen aan zwart-wit foto's kan gebruik gemaakt worden van een TV-camera als optische eenheid, zodat een foto in zijn geheel geanalyseerd kan worden. De omzettingseenheid zet het geregistreerde beeld om in electrische impulsen, zodat het ingedeeld wordt in beeldpunten (pixels), waarna het op een beeldscherm wordt weergegeven. D.m.v. ijking van het beeld m.b.v. een bekende lengte op de foto heeft elk beeldpunt een bepaalde oppervlakte. Voor de analyse van bepaalde grijstinten beschikt de Quantimet over een reeks van grijsniveaus, die loopt van 0 (wit) tot 64 (zwart). Uit deze reeks kan een grijsniveau gekozen worden dat als detectieniveau D dient bij metingen aan de foto. Men kan kiezen tussen metingen aan de delen van het patroon die óf boven óf beneden dit detectieniveau zitten. Dit wordt erdoor bepaald of men de donkere delen (dus de grijsniveaus tussen 64 en D) of de lichtere (tussen 0 en D) van de foto op het beeldscherm wil laten oplichten bij de detectie. Men kan dus bij elke detectieniveau D op het beeldscherm zien welke delen van de foto gedetecteerd zullen worden. M.b.v. de ingeijkte pixelgrootte kan vervolgens de oppervlakte van het gedetecteerde gebied bepaald worden m.b.v. de analyse-eenheid.

Voor de analyses van de foto's van de bioturbatie-experimenten werden de foto's met witte correctielak bewerkt, zodat alleen het contrastlaagoppervlak resteerde. Hierdoor werd voorkomen dat de delen op de foto, die niet tot de contrastlaag behoorden, gedetecteerd zouden worden bij het ingestelde detectieniveau 45 bij een diafragmastand 11 van de camera (trap 6 van de Kodak grijstrap, dit is 1/3 stop onder 18 % reflectie; zie figuur 2.1c). Dit niveau werd vastgesteld op basis van een aantal testmetingen en werd bij de analyse van de foto's van alle experimenten op dezelfde waarde gehouden. Omdat er bij het IJsselmeer-experiment ook een aantal wormen in de referentiepunten terechtgekomen waren, werden bij deze foto's de referentiepunten ook bij de analyse betrokken. Bij de foto's van de overige experimenten werden de referentiepunten m.b.v. een beeldpen uit het gedetecteerde gebied verwijderd.

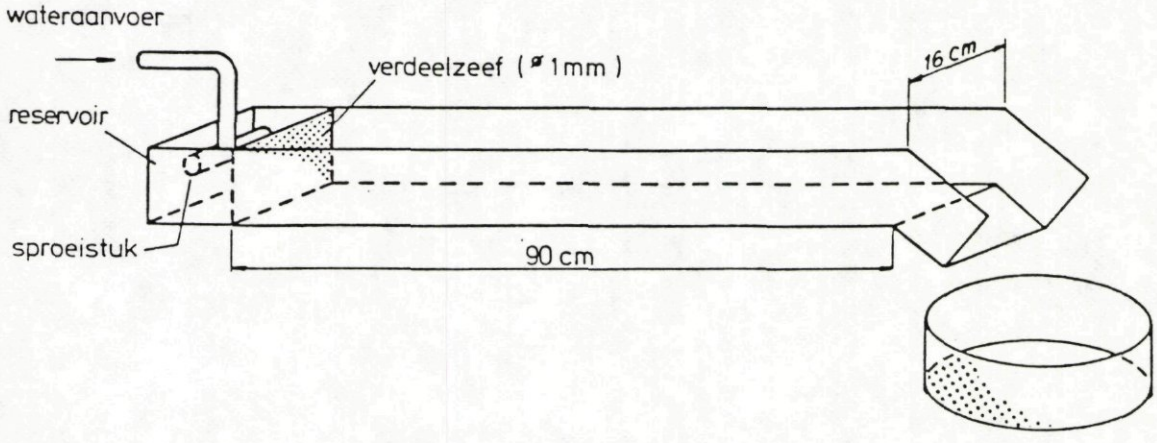
BIJLAGE V

Afbeeldingen van het werkplateau voor de bioturbatietoets en de daarbij gebruikte spoelgoot.

Werkplateau: opstelling voor de registratie van de sedimentoppervlakken (lampen aan weerszijden van de pyramide niet weergegeven; zie ook figuur 2.1a).



Spoelgoot voor het uit het sediment spoelen van wormen (Verdonschot, 1979).



BIJLAGE VI

Chemische parameters, aantal teruggevonden wormen en groepsmassa's bij de bioturbatie-experimenten.

Chemische parameters

Zuurgraad (pH-eenheden; n=3)

Volumeper-centage	IJsselmeer Begin	IJsselmeer Eind	Ketelmeer Begin	Ketelmeer Eind	Haringvliet Begin	Haringvliet Eind
0	8.4±0.1	8.6±0.1	8.6±0.1	8.6±0.0	8.4±0.1	8.6±0.2
33	8.5±0.1	8.4±0.1	8.5±0.1	8.3±0.1	8.4±0.1	8.6±0.1
67	8.5±0.0	8.2±0.1	8.5±0.0	8.3±0.2	8.2±0.2	8.5±0.1
100	8.3±0.1	8.1±0.1	8.5±0.0	8.1±0.2	8.1±0.1	8.3±0.1

Zuurstofconcentratie (mg l^{-1}; n=3)

Volumeper-centage	IJsselmeer Begin	IJsselmeer Eind	Ketelmeer Begin	Ketelmeer Eind	Haringvliet Begin	Haringvliet Eind
0	7.8±0.2	8.2±0.4	8.2±0.2	8.5±0.2	7.8±0.2	7.4±0.1
33	7.9±0.2	7.8±0.3	8.1±0.3	8.2±0.4	7.9±0.2	7.3±0.3
67	8.1±0.1	7.6±0.5	8.1±0.1	8.7±0.3	7.9±0.3	7.4±0.1
100	8.0±0.2	8.1±0.3	8.1±0.1	8.6±0.1	7.9±0.2	7.4±0.1

Teruggevonden aantal wormen

Volumepercentage en herhalingscode	Teruggevonden aantal wormen per herhaling[a] IJ'meer	K'meer	H'vliet	Gemiddelde aantal wormen per volumepercentage (± s.d.) IJ'meer	K'meer	H'vliet
0[b] A	59	42	35			
B	57	38	40	57,7±1,2	40,7±2,3	38,7±3,2
C	57	42	41			
33 A	59	38	42			
B	53	41	36	56,3±3,1	40,3±2,1	37,3±4,2
C	57	42	34			
67 A	53	41	37			
B	61	41	37	55,3±4,9	43,0±3,5	38,7±2,9
C	52	47	42			
100 A	59	43	39			
B	54	42	41	55,7±2,9	43,0±1,0	39,7±1,2
C	54	44	39			

[a] Ingezet aantal wormen bij IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet resp. 50, 40 en 40 stuks.
[b] 100 % Oostvaardersplassensediment (monster I).

BIJLAGE VI (vervolg)

Groepsmassa's (op basis van bepaling in duplo)

Volumepercentage en herhalingscode		Sediment IJsselmeer[a]	Ketelmeer	Haringvliet
0[b]	A	168±4	77±1	79±1
	B	177±2	88±3	95±2
	C	178±8	80±1	95±1
33	A	209±11	111±7	82±2
	B	149±2	134±6	87±0
	C	202±8	77±3	99±1
67	A	161±3	116±1	77±3
	B	234±0	82±3	78±1
	C	172±4	98±4	78±3
100	A	167±15	90±4	68±4
	B	176±9	75±0	109±1
	C	208±9	98±1	67±4

[a] Afwijkende weegprocedure t.o.v. de andere experimenten: andere materialen gebruikt (zie p. 10 Overige waarnemingsparameters).

[b] 100 % Oostvaardersplassensediment (monster I).

BIJLAGE VII

De door faecale pellets bedekte oppervlakten van de contrastlagen (mm^2) op de verschillende dagen van de bioturbatie-experimenten.

IJsselmeersediment

Volumepercentage en herhalingscode		Dag 1	2	3	4
0	A	2769	4543	5389	5873
	B	2283	4156	4572	5129
	C	2306	3770	4803	5312
33	A	2549	4703	5054	5542
	B	2093	3667	5032	5340
	C	3278	5011	5623	6100
67	A	2486	4102	5157	5807
	B	2913	4175	5310	6203
	C	1977	3480	4992	5956
100	A	3036	4334	5206	5970
	B	2237	4557	5437	6161
	C	2563	4360	5136	5526

Ketelmeersediment

Volumepercentage en herhalingscode		Dag 1	2	3	4	5
0	A	1415	2898	3940	4960	5384
	B	1055	2630	3686	4586	5321
	C	1712	3167	4197	5015	5391
33	A	1338	2534	3672	4433	5073
	B	1746	3190	4556	5291	5484
	C	1259	2358	3363	4414	4970
67	A	1190	2506	3590	4360	5582
	B	1539	2640	3880	4998	5448
	C	1652	3266	4519	5381	5804
100	A	1693	3313	4618	4646	5686
	B	1278	2694	4457	5373	5562
	C	1931	3688	4955	5447	5743

BIJLAGE VII (vervolg)

Haringvlietsediment

Volumepercentage en herhalingscode		Dag 1	2	3	4	5
0	A	1052	1703	2810	3545	4907
	B	1089	2217	3280	4394	5197
	C	914	1912	2285	3411	4285
33	A	1131	1898	3062	3811	4198
	B	905	1607	2568	3391	4811
	C	824	1715	2592	3600	4537
67	A	812	1250	2100	2934	3954
	B	754	1352	2500	3231	4254
	C	583	1327	2226	3107	4230
100	A	757	1497	2544	3500	4682
	B	1273	2365	-[a]	-[a]	-[a]
	C	554	1340	2046	3016	3776

[a] Pelletpatronen verstoord op dag 3.

BIJLAGE VIII

Toegevoegde hoeveelheden nat sediment en DSW tijdens het reproductie-experiment (droogresten: zie bijlage II).

IJsselmeersediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	IJ'meer	DSW (ml)
0[b]	66.3	-	94
50	33.2	26.3	102
100	-	52.5	110

Ketelmeersediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	K'meer	DSW (ml)
0[b]	66.3	-	94
50	33.2	37.5	92
100	-	75.0	91

Haringvlietsediment

Volume-percentage	Toegevoegde hoeveelheden Sediment (g) OVP[a]	H'vliet	DSW (ml)
0[b]	66.3	-	94
50	33.2	34.1	96
100	-	68.2	97

[a] Oostvaardersplassensediment: monster II.
[b] 100 % Oostvaardersplassensediment.

BIJLAGE IX

Resultaten van telling van het aantal overlevende adulten en het aantal geproduceerde cocons en eieren tijdens het reproductie-experiment.

Overleving van adulten en geproduceerd aantal cocons en eieren.

Code[a]		Aantal adulten Periode[b] I	II	III	Aantal cocons Periode[b] I	II	III	Totaal aantal cocons[c]	Totaal aantal eieren
O	A	7	7	6	5	2	7	14	41
	B	8	8	7	3	2	2	7	20
	C	10	10	10	1	3	13	17	68
IJ	A	10	10	10	1	0	1	2	5
	B	10	10	6	3	3	0	5	15
	C	10	10	10	5	6	2	13	39
K	A	10	10	10	3	2	4	9	29
	B	10	10	9	2	0	2	4	13
	C	10	10	10	4	1	0	5	11
H	A	10	9	9	4	2	4	9	27
	B	10	10	9	2	1	0	3	8
	C	10	9	9	2	0	1	3	5
OIJ	A	10	10	10	2	4	6	11	53
	B	10	10	10	5	3	6	13	39
	C	10	10	10	3	3	7	13	47
OK	A	10	9	8	1	1	1	3	13
	B	10	10	10	3	1	5	9	37
	C	10	9	9	0	0	2	1	4
OH	A	10	10	10	1	0	2	3	8
	B	10	10	10	3	3	4	10	25
	C	9	9	8	3	1	4	8	27

a O, IJ, K en H: resp. 100 % Oostvaardersplassen-, IJsselmeer-, Ketelmeer- en Haringvlietsediment;
OIJ, OK en OH: resp. 50 % mengsels van de twee genoemde sedimenten;
A, B en C: herhalingen van de getoetste sedimentsamenstellingen.

b Duur periode I t/m III resp. 7, 7 en 9 dagen.

c N.B.: het aantal cocons waarin eieren geteld werden (excl. het aantal beschadigde of vermiste cocons).

BIJLAGE X

Karakteristieken van de sedimentmonsters uit Oostvaardersplassen, IJsselmeer, Ketelmeer en Haringvliet.

De karakteristieken zijn t.z.t. verkrijgbaar bij de Dienst Binnenwateren/RIZA te Lelystad (onderafdeling Ecotoxicologie, drs. C. van de Guchte).