

RIVM rapport 607220009/2003

**Biobeschikbaarheid van essentiële metalen voor
bodemorganismen: zinktitratie als middel ter
bepaling van accumulatie en toxiciteit**

W.J.G.M. Peijnenburg, R. Baerselman,
A.C. de Groot, C.R.B. Strien

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Afvalstoffen en Straling van het Ministerie voor Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (VROM) in het kader van het project 607220 (Onderbouwing beleid metalen en organische stoffen).

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

Quality standards for heavy metals are based on the total amount of the metal present in the solid phase. In some cases risk limits are derived which are almost equal to the natural background concentration. Thereupon, it is insufficiently taken into account that some metals are essential for living organisms. These observations were ground for developing a conceptual framework for an improved risk assessment methodology that does take these aspects into account. As a first step towards implementation of the framework, toxicity tests were performed with natural substrates and biota that actually reside in these substrates. Thereupon, the bioavailability of the metals for the species tested is explicitly taken into account. It is concluded that integration of knowledge on soil chemistry (speciation and competition), the ecological characteristics of the test species, and the underlying mechanisms of toxicity do indeed enable future implementation of an improved methodology for risk assessment of heavy metals. It is shown that the dominant uptake routes for metals by specific classes of organisms as well as the presence of competing cations (especially H^+) need to be specifically taken into account. The strategies employed by biota to detoxify accumulated metals could be used for developing improved risk assessment methodologies based upon internal metal levels as being the ultimate expression of bioavailability.

Samenvatting

Normstelling van zware metalen geschiedt momenteel op basis van het totaalgehalte in de vaste fase. De methodiek leidt tot risicogrenzen die in de praktijk in sommige gevallen ongeveer gelijk zijn aan de achtergrondconcentratie. Bovendien houdt de methodiek onvoldoende rekening met het gegeven dat sommige metalen essentieel zijn voor het functioneren van organismen. Dit is reden geweest om een conceptueel kader op te stellen voor een verbeterde beoordelingmethodiek die wél met deze factoren rekening houdt. Het kader behoeft invulling. In dit rapport wordt nagegaan of het mogelijk is om toxiciteitstoetsen uit te voeren met natuurlijke substraten en met organismen die daadwerkelijk voorkomen in deze substraten, terwijl daarbovenop ook voldoende rekening gehouden wordt met de biobeschikbaarheid van de metalen. Geconcludeerd wordt dat integratie van kennis van de chemie van de bodem (speciatie en competitie), van de ecologische karakteristieken van de gebruikte toetsorganismen en van de achterliggende mechanismen van toxiciteit het inderdaad mogelijk maken om invulling te geven aan een verbeterde onderbouwing van de normstellingsmethodiek voor zware metalen. Concreet wordt aangetoond dat het belangrijk is om hierbij rekening te houden met de routes waarlangs organismen metalen accumuleren en de aanwezigheid van andere metaalionen (inclusief H^+) in het poriewater. De wijze waarop geaccumuleerde metalen door organismen onschadelijk worden gemaakt en waardoor slechts een fractie van het in het beest aanwezige metaal toxisch is, zou gebruikt kunnen worden voor een verbeterde normstelling waarbij interne gehalten als uitgangspunt genomen worden. Interne metaalgehalten die daadwerkelijk beschikbaar zijn voor interactie met receptoren van toxiciteit kunnen immers als de ultieme uitdrukking van biobeschikbaarheid worden beschouwd.

Inhoud

1. INLEIDING.....	6
1.1 ALGEMEEN.....	6
1.2 BIOBESCHIKBAARHEID.....	8
1.3 DOELSTELLING EN WERKWIJZE.....	11
2. MATERIALEN EN METHODES.....	14
2.1 KARAKTERISERING BODEM EN PORIEWATER.....	14
2.2 ACCUMULATIE- EN TOXICITEITSTOETSEN.....	15
3. RESULTATEN.....	18
3.1 FYSISCH-CHEMISCHE BESCHIKBAARHEID: ZINKPARTITIE.....	18
3.1.1 <i>Zinkpartitie na toevoegen van zinkchloride</i>	18
3.1.2 <i>Zinkpartitie na toevoegen van zinkacetaat</i>	23
3.1.3 <i>Conclusies zinkpartitie</i>	24
3.2 ACCUMULATIE.....	25
3.2.1 <i>Accumulatiepatronen in regenwormen</i>	25
3.2.2 <i>Accumulatiepatronen in miljoenpoten</i>	29
3.2.3 <i>Conclusies accumulatie</i>	30
3.3 TOXICITEIT.....	31
3.3.1 <i>Regenwormen</i>	31
3.3.2 <i>Miljoenpoten</i>	35
3.3.3 <i>Conclusies toxiciteit</i>	36
4. CONCLUSIES.....	36
LITERATUUR.....	40
BIJLAGE 1: VERZENDLIJST.....	42

1. Inleiding

1.1 Algemeen

Normstelling van zware metalen geschiedt momenteel op basis van het principe van toegevoegd risico (Crommentuijn et al., 1997). Bij dit principe wordt de norm opgebouwd uit een achtergrondgehalte met daarbij opgeteld een concentratie als gevolg van menselijk handelen. Het achtergrondgehalte kan per regio verschillen. Het is belangrijk om vast te stellen hoe groot de antropogene belasting mag zijn en welke risico's hiermee gepaard gaan. Zoals aangegeven door Slijkerman et al. (2000), dient de toegevoegd risico-benadering om Maximaal Toelaatbare Risico's (MTRs) en Verwaarloosbare Risico's (VRs) voor de verschillende milieucompartimenten af te leiden. Hierbij wordt er vanuit gegaan dat een Maximaal Toelaatbare Toevoeging (MTT) wordt berekend, die gebaseerd is op beschikbare laboratoriumtesten. Deze testen worden uitgevoerd met organismen die representatief worden geacht voor de Nederlandse situatie. De MTR wordt verkregen door de MTT op te tellen bij de natuurlijke achtergrondconcentratie (AC) van het metaal. De MTT dient ook als basis voor de Verwaarloosbare Toevoeging (VT), namelijk: $MTT/100 = VT$. Vervolgens wordt het Verwaarloosbaar Risico niveau gedefinieerd als de som van de VT en de AC. De berekende en voorgestelde MTT voor metalen zijn doorgaans bijna gelijk aan de achtergrondconcentratie. De VT is echter veel lager. Dit betekent dat de vast te stellen streefwaarde in de praktijk ongeveer gelijk wordt gesteld aan de achtergrondconcentratie. Deze constatering heeft geleid tot kritiek vanuit met name de non-ferro industrie (Van Tilborg en Van Assche, 1995; Van Tilborg, 1996). Bovendien is, onder andere door een commissie van de Gezondheidsraad (1998), geconstateerd dat de methodiek van toegevoegd risico onvoldoende rekening houdt met het gegeven dat sommige metalen essentieel zijn voor het functioneren van organismen. Volgens de commissie van de Gezondheidsraad wordt voorbijgegaan aan de ecologische betekenis van fysiologische optimumcurves en moet een benadering worden gekozen die recht doet aan de rol van essentiële metalen in ecosystemen. Bovendien gaf de Gezondheidsraad het advies het concept van toegevoegd risico in te vullen binnen een gebiedsgerichte differentiatie op basis van achtergrondgehalten.

Het advies van de Gezondheidsraad is voor het Ministerie van VROM aanleiding geweest om een onderzoekstraject op te starten om te komen tot een verbeterde onderbouwing van de normstelling voor essentiële metalen op basis van wetenschappelijke consensus. Het traject wordt begeleid door de werkgroep "Vervolgonderzoek normstelling Essentiële Metalen"

(VEM). Als eerste stap is door Slijkerman et al. (2000) in opdracht van de VEM een conceptueel kader voor de normstelling van essentiële metalen opgesteld. De kern van het conceptueel kader betreft de aanbeveling om in toxiciteitstoetsen en veldstudies toegevoegde metalen per getoetste soort samen te nemen met de achtergrondconcentratie en de afleiding van risicogrenzen zonder verdere modificatie toe te passen op de aldus verkregen gegevens. Ecotoxiciteitstoetsen die gebruikt worden voor het afleiden van risicogrenzen zouden in de visie van Slijkerman et al. (2000) moeten voldoen aan de volgende criteria:

- Toetsen worden uitgevoerd met natuurlijke substraten met een achtergrondgehalte dat karakteristiek is voor het ecosysteem waar de norm voor gaat gelden.
- Het toetsorganisme dient in het natuurlijke substraat gekweekt te zijn.
- Alvorens de toxiciteitstest uit te voeren dient een verouderingstijd aangehouden te worden die voldoende is om een evenwicht te krijgen tussen de verschillende speciatievormen van het metaal in het substraat (i.e. inclusief het poriewater).
- Het geen-effect-niveau wordt uitgedrukt in termen van het totaal teruggemeten gehalte (inclusief het achtergrondgehalte).

Het conceptueel kader gaat er vanuit dat het toegevoegd-risico-concept niet opgevat wordt als een rekenwijze die achteraf op toxiciteitsgegevens toegepast wordt, maar als een integraal onderdeel van de verzameling van gegevens en de uitvoering van de toxiciteitsexperimenten. Als in experimenten media gebruikt worden die een voldoende achtergrondniveau van essentiële metalen bevatten en de toxiciteitscriteria worden uitgedrukt in termen van het totale teruggemeten gehalte in het medium (dus niet het nominale toegevoegde gehalte) dan is het toegevoegd risico reeds in de testgegevens geïntegreerd op een manier die recht doet aan de behoeften van de soort en zijn bijbehorend achtergrondgehalte. Deze opvatting legt de kern van de problematiek bij de experimentele uitvoering van de experimenten. De achtergrondconcentratie en de concentratie behorende bij het toegevoegd risico worden zodoende geïntegreerd.

De boven beschreven opvatting houdt in dat strengere en deels andere eisen gesteld dienen te worden aan toxiciteitsgegevens die voor de afleiding van het MTR en het VR gebruikt worden. Een voorwaarde bij het uitvoeren van laboratoriumtoetsen is dat de testorganismen representatief zijn voor de situatie waarvoor de norm gaat gelden. Dit betekent dat het organisme afkomstig is van een bepaald type bodem/water waarvoor de norm gaat gelden en

dat het hierop is gekweekt. Zodoende groeit het organisme op met de achtergrondbelasting die typerend is voor de situatie waarvoor de norm dient te worden opgesteld.

Met name voor de bodem is het tevens belangrijk dat er in de laboratoriumexperimenten rekening wordt gehouden met de verminderde biologische beschikbaarheid van een essentieel metaal bij een langere incubatietijd in de grond (ageing). De reden dat juist bij essentiële metalen hier aandacht aan moet worden geschonken is dat het toegevoegd gehalte qua biologische beschikbaarheid niet al te veel moet verschillen van het reeds aanwezige achtergrondgehalte, anders is het idee van toegevoegd risico niet toepasbaar. In de te gebruiken data dient dan ook aandacht te zijn geschonken aan dit aspect. Verder is ook de extrapolatie van laboratorium naar veld erg belangrijk. Het uitvoeren van laboratoriumexperimenten onder verschillende milieuomstandigheden is daarom een belangrijk aspect.

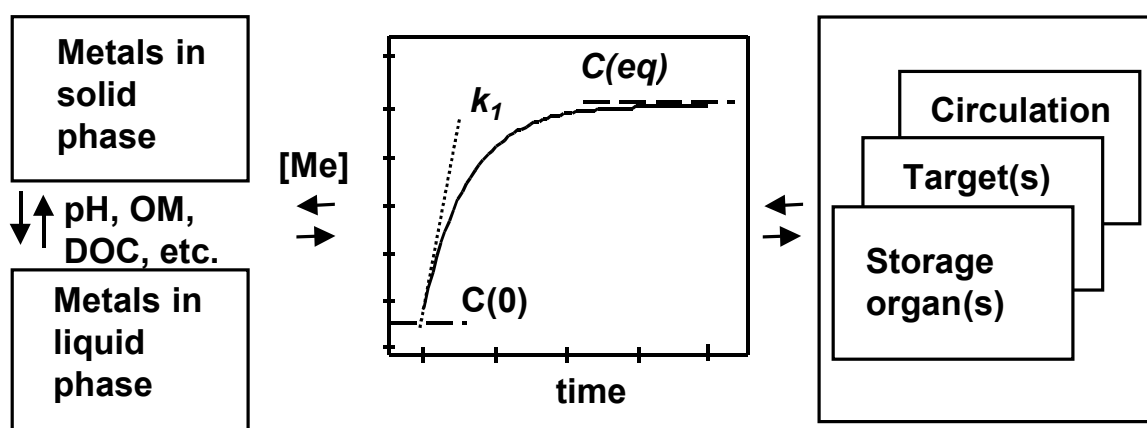
1.2 Biobeschikbaarheid

Zoals onder andere aangegeven door Peijnenburg et al. (2001), zijn toxische effecten van metalen op bodemorganismen moeilijk voorspelbaar. In zijn algemeenheid komt dit doordat toxiciteit vaak optreedt als uitvloeisel van een reeks van processen, die ieder op zich van een groot aantal uiteenlopende factoren afhankelijk kunnen zijn. Om dit te kunnen operationaliseren is door Hamelink et al. (1994) het drie-fasen concept voor biobeschikbaarheid ontwikkeld, dat door Posthuma et al. (1998) is uitgebreid met de nadruk op de dynamiek. In het drie-fasen concept wordt er van uitgegaan dat effecten pas zullen optreden nadat het interne metaalgehalte een organisme- en metaalspecifieke drempelwaarde (Critical Body Residue, CBR) heeft overschreden. Hoewel bekend is dat het drie-fasen concept van biobeschikbaarheid niet in alle gevallen opgaat, heeft het dynamische drie-fasen concept centraal gestaan in het biobeschikbaarheidsonderzoek dat in dit rapport wordt beschreven. De drie kernprocessen die tezamen het concept voor biobeschikbaarheid vormen, zijn weergegeven in Figuur 1:

1. De eerste fase van het concept wordt gevormd door de milieu-bepaalde beschikbaarheid van het metaal voor opname door bodemorganismen. In deze eerste fase spelen enkel fysisch-chemische factoren een rol. In Figuur 1 is fysisch-chemische beschikbaarheid schematisch weergegeven in de vorm van de partitie van een metaal over de vaste fase van de bodem en het poriewater (linkerzijde Figuur 1). Zoals schematisch aangegeven, is deze partitie in principe afhankelijk van een groot aantal bodemeigenschappen (pH blijkt vaak de meest sturende bodemeigenschap in dezen). Ten gevolge van de dynamische

partitieprocessen tussen de vaste fase en het poriewater zullen zich in de bodem evenwichten instellen.

2. In de tweede stap van het dynamische drie-fasen concept speelt de biobeschikbaarheid een belangrijke rol. Als uitvloeisel van de onder 1 genoemde evenwichten, zal zich een dynamisch evenwicht instellen tussen enerzijds de metalen in het bodem-poriewater systeem, en anderzijds de interne gehalten in het organisme. De ligging van dit dynamische evenwicht is afhankelijk van zowel externe als interne (organisme-specifieke) factoren. Een belangrijke organisme-specifiek aspect in dezen, betreft de wijze waarop organismen metalen opnemen (voedsel – poriewater – ingestie bodemdeeltjes). In het midden van Figuur 1 is de biobeschikbaarheid weergegeven in de vorm van toxicokinetische opnamekarakteristieken (opnamesnelheidsconstante, k_1 , en interne evenwichtgehalte, $C(eq)$). Daarnaast speelt eliminatie een rol.
3. Het derde aspect van het biobeschikbaarheidsconcept wordt gevormd door interne distributieprocessen, transport naar specifieke targets voor toxiciteit, eventuele inerte opslag in specifieke organen en andere detoxificatiemechanismen. Dit is aan de rechterkant van Figuur 1 weergegeven. Het toxicologische biobeschikbaarheidsconcept gaat er vanuit dat daadwerkelijke toxische effecten pas zullen optreden na overschrijding van een kritisch intern metaalgehalte in een orgaan/organel.



Figuur 1. Schematische weergave van de kernprocessen van het biobeschikbaarheidsconcept.

Biobeschikbaarheid dient bij voorkeur gekwantificeerd te worden in termen van opnamesnelheden c.q. opnamefluxen door organismen vanuit het substraat. Het spreekt echter voor zich dat het hierboven gepresenteerde biobeschikbaarheidsconcept in deze vorm niet toepasbaar is voor normstelling/risicobeoordeling. Zoals aangegeven door Peijnenburg et

al. (1997) is de kern van het concept de werkhypothese dat het mogelijk is om op basis van enkele cruciale bodemeigenschappen en (relatief eenvoudig te meten) totaalgehalten van metalen in de vaste fase of in het poriewater, de daadwerkelijk optredende effecten in bodemorganismen en planten te voorspellen. Voor de praktijk van normstelling/locatiespecifieke risicobeoordeling zou het nodig zijn om te beschikken over toxiciteitsdata op basis van de biobeschikbare metaalfraction, rekening houdend met de invloed van milieueigenschappen op de metaalopname en –toxiciteit. Extrapolatie van bijvoorbeeld laboratoriumdata naar velddata zou dan direct kunnen geschieden op basis van het kwantificeren van de desbetreffende metaalfractionen en zou kunnen leiden tot een gegeneraliseerde beschrijving van organisme- en bodemafhankelijke *beschikbaarheidsverschillen* (labtest/veld). Als voorbeeld van de vorderingen die recent op dit gebied zijn gemaakt, kan voor wat betreft het watercompartiment verwezen worden naar de zogenaamde Biotic Ligand Models (BLMs) die opgesteld zijn voor het kwantificeren van de invloed van de watersamenstelling in termen van pH, hardheid en alkaliniteit, op de toxiciteit van zware metalen voor waterorganismen. In de BLMs staat competitie van het metaal met andere in het water aanwezige kationen (inclusief H^+) centraal. Voor een overzicht van de huidige stand van zaken met betrekking tot BLMs kan verwezen worden naar een recent verschenen uitgave van het tijdschrift *Comparative Biochemistry & Physiology – Part C. Toxicology and Pharmacology* (Volume 133C, numbers 1-2, 2002). Momenteel wordt overwogen om BLMs toe te laten voor de risicoschattingen in het kader van het EU-Risk Assessment Report voor zink en het door de industrie op te stellen Risk Assessment Report voor koper.

Voor zover bekend zijn er tot op heden nog geen BLMs voor bodemorganismen ontwikkeld. Dit komt deels doordat de dynamiek van de fysisch-chemische processen die zich in bodems afspelen minder goed bekend is (en dus minder goed gemodelleerd kan worden) dan de dynamiek van deze processen in het aquatische milieu. Verder is minder bekend van de ecologie en de fysiologie van bodemorganismen dan van waterorganismen. Met name de interacties tussen organismen en de bodem c.q. het poriewater zijn grotendeels onbekend. In relatie tot biobeschikbaarheid is weinig bekend over de dominante opnameroutes voor stoffen: dermale opname via het poriewater versus opname van vast materiaal (voedsel en/of bodemdeeltjes via het maag-darm kanaal).

1.3 Doelstelling en werkwijze

In de literatuur zijn nauwelijks toetsresultaten te vinden die volledig voldoen aan de criteria van Slijkerman et al. (2000). Met het experimentele onderzoek waarvan de resultaten in dit rapport worden beschreven, is dan ook beoogd om na te gaan in hoeverre het mogelijk is om invulling te geven aan een gedeelte van de aanbevelingen van Slijkerman et al. Tevens is getracht om de hierboven genoemde aspecten van biobeschikbaarheid, zijnde een van de meest cruciale facetten van het concept van Slijkerman et al., te kwantificeren. Hierbij stonden naast het beschrijven van de chemie van de gebruikte bodems, de opnameroutes en de factoren die toxiciteit modifieren, centraal. Al eerder hebben Peijnenburg et al. (2001) mogelijkheden aangegeven om bij de normstelling rekening te houden met verschillen in opnameroutes. Hierbij is onder andere geopperd om in de database van toxiciteitsdata een scheiding te maken tussen data van organismen die via het poriewater worden blootgesteld en data van organismen die voornamelijk metalen via de vaste fase opnemen.

Het onderzoek is gericht op het beantwoorden van de volgende deelvragen:

1. In hoeverre zijn de biobeschikbaarheid en toxiciteit van metalen in natuurlijke substraten afhankelijk van het achtergrondgehaltes en de fysisch-chemische eigenschappen van het substraat?
2. In hoeverre verschillen de biobeschikbaarheid en toxiciteit van metalen in natuurlijke substraten van de metaalbiobeschikbaarheid en –toxiciteit in (kunstmatige) substraten die tot op heden regelmatig in terrestrische toxiciteitsexperimenten worden gebruikt?

Om deze vragen te kunnen beantwoorden zijn gecombineerde accumulatie- en toxiciteitsstudies met zink uitgevoerd met de regenwormen *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus* en *Eisenia andrei* en de miljoenpoot *Polydesmus angustus*. De regenwormen nemen metalen voornamelijk via het poriewater op, terwijl de miljoenpoot voornamelijk via de vaste fase (voedsel) wordt blootgesteld. De studies zijn uitgevoerd in zeven natuurlijke substraten die om de volgende redenen zijn gekozen:

- Twee lichte kleigronden van een locatie onder een electriciteitsmast (gecodeerd “Oost”) en een referentielocatie die hemelsbreed ongeveer 50 meter van deze mast verwijderd lag (gecodeerd “West”), dusdanig dat de bodemeigenschappen van beide gronden gelijk waren. De zinken electriciteitsmast is ongeveer 20 jaar geleden gecoat, waarna de zinkemissie naar de direct onder de mast liggende bodem is gestopt. Naar verwachting bevat de bodem Oost dan ook een hoger zinkgehalte dan bodem West en kan het zinkgehalte voor wat betreft de tijd die gegund is om het vrijgekomen zink te laten

equilibreren, beschouwd worden als een (niet-natuurlijk!) achtergrondgehalte. Deze bodems zouden dus de gelegenheid bieden om deelvraag 1 te beantwoorden.

- Een vijftal zandgronden afkomstig van een in 1994 aangelegd proefveld. De gronden zijn destijds op een pH van ongeveer 7 gebracht, waarna verschillende hoeveelheden zink zijn toegevoegd. Vervolgens heeft de grond de gelegenheid gehad om gedurende 7 jaar op natuurlijke wijze te equilibreren (ageing). Ook in dit geval kunnen de zinkgehaltenes in de vijf bodems als (niet-natuurlijk) achtergrondgehalte worden beschouwd. De gebruikte coderingen zijn: VU-0, VU-100, VU-560, VU-1800 en VU-3200. Hierbij geeft het cijfer het nominaal zinkgehalte aan zoals dat oorspronkelijk aan de bodems is toegevoegd. Deze gronden zijn uitgebreid beschreven door Smit (1997).
- Een niet-verontreinigde zandgrond afkomstig van een locatie in de gemeente Lepelstraat met relatief lage natuurlijke achtergrondgehaltenes aan zware metalen.
- Een kleigrond afkomstig uit de gemeente Epen met van nature verhoogde achtergrondgehaltenes. Met deze bodem zijn vooralsnog geen accumulatie- en toxiciteitsstudies uitgevoerd, wel is de partitie van zink in deze bodem bestudeerd.

De VU- en de Oost- en West-bodems bieden de gelegenheid om bij een gelijk totaalgehalte aan zink in de vaste fase, het zinkgehalte in het poriewater te veranderen. Hierdoor zouden de opname en de toxiciteit van zink bij een gelijk totaalgehalte aan zink in de vaste fase, verschillen voor organismen die via het poriewater worden blootgesteld. Daarentegen zouden de opname en toxiciteit van zink bij een gelijk zinkgehalte in de vaste fase van deze bodems gelijk zijn voor organismen die via de vaste fase worden blootgesteld.

E. andrei werd verkregen uit een kweek die bij het RIVM wordt onderhouden. Tenzij anders vermeld zijn de overige regenwormen van een locatie in de gemeente Lepelstraat afkomstig. Hiermee kan voldaan worden aan de aanbeveling van Slijkerman et al. om te werken met organismen die in het desbetreffende substraat zijn opgegroeid. Een deel van de regenwormen is afkomstig vanuit de gemeente Epen; een gebied langs de rivier de Geul met van nature verhoogde achtergrondgehaltenes. Wormen uit Lepelstraat bevatten relatief lage initiële metaalgehaltenes, terwijl metaalgehaltenes in wormen uit Epen in het algemeen hoger zijn. De miljoenpoten zijn, tenzij anders vermeld, afkomstig uit een relatief schone locatie uit de gemeente Vlijmen, daarnaast is ook gewerkt met dieren uit Epen. Initiële metaalgehaltenes in miljoenpoten zijn onafhankelijk van de locatie waar de dieren vandaan komen. Beide organismen komen verspreid over Nederland voor en zijn dus relevant voor meerdere Nederlandse metalloregio's.

Aan de bodems zijn zinkzouten toegevoegd. Zoals gangbaar bij reguliere toxiciteitstoetsen, is een gedeelte van de experimenten uitgevoerd met zinkchloride. Toevoegen van zinkchloride zorgt voor een verlaging van de pH van het poriewater en daarmee voor een extra verhoging van het biobeschikbare zinkgehalte voor organismen die via de vaste fase worden blootgesteld. Een ander gedeelte van de experimenten is uitgevoerd met zinkacetaat. Na toevoeging van dit zout vindt mineralisatie van het acetaat plaats. In plaats van een pH-verlagend effect zorgt dit proces er voor dat de pH stabiel blijft en in sommige bodems zelfs licht stijgt. Het vergelijken van de zinkopname en zinktoxiciteit in bodems waaraan enerzijds zinkchloride en anderzijds zinkacetaat is toegevoegd biedt dus de mogelijkheid om het effect van pH te kwantificeren.

In deze studie is niet nagegaan wat het effect van de equilibratietijd op de opname en toxiciteit van zink voor regenwormen en miljoenpoten is. De gronden waaraan zinkzouten zijn toegevoegd, zijn minimaal 4 weken bij kamertemperatuur bewaard. Nadrukkelijk dient vermeld te worden, dat het doel van het onderzoek niet was om te komen met concrete voorstellen voor aanpassing van risicobeoordeling op basis van het conceptueel kader van Slijkerman et al. (2000). Met het onderzoek wordt wel gedeeltelijke invulling gegeven aan stap 4 van het kader: vaststellen van geen-effect-concentraties voor de gekozen soorten.

In hoofdstuk 2 van dit rapport wordt ingegaan op de gebruikte methodieken. Hoofdstuk 3 bevat de belangrijkste resultaten, onderverdeeld overeenkomstig de drie stappen van het hierboven verwoorde biobeschikbaarheidsconcept. De belangrijkste conclusies en aanbevelingen zijn verwoord in hoofdstuk 4. De nul-hypothese bij het onderzoek was de stelling dat opname van metalen door bodemorganismen en planten gerelateerd is aan ofwel het metaalgehalte in het poriewater danwel het metaalgehalte in de vaste fase, terwijl er anderzijds vanuit werd gegaan dat effecten van metalen op organismen gerelateerd zijn aan de interne metaalgehalten (het zogenaamde critical-body-burden-concept). De concrete werkhypothese was dat het mogelijk is om op basis van enkele cruciale bodemeigenschappen en (relatief eenvoudig te meten) gehalten van metalen in hetzij de vaste fase, hetzij in het poriewater en, de daadwerkelijk optredende effecten in bodemorganismen te voorspellen. Voor de gebiedsgerichte normering is het nodig om duidelijke parameters te kunnen onderscheiden, die bepalend zijn voor de biologische beschikbaarheid van het essentiële metaal. Naar deze parameters wordt in deze studie onderzoek verricht.

2. Materialen en methodes

2.1 Karakterisering bodem en poriewater

Na bemonstering van de veldbodems zijn de bodems gedroogd, gezeefd (4 mm) en gehomogeniseerd. Vervolgens is aan de gronden een waterige oplossing van hetzij zinkchloride, hetzij zinkacetaat toegevoegd en zijn de mengsels met behulp van een mixer gehomogeniseerd. Hierna zijn de gronden gedurende minimaal 4 weken in open bakken bij kamertemperatuur bewaard. Regelmatig zijn de gronden bevochtigd teneinde het vochtgehalte van de mengsels constant te houden. Ten behoeve van de toxiciteitsexperimenten zijn de zinkconcentraties dusdanig gekozen dat er een geometrische reeks ontstaat op basis van totaalgehalten in de vaste fase. Deze keuze houdt automatisch in dat, vanwege de niet-lineaire partitie van zink tussen poriewater en de vaste fase, de zinkgehalten in de toetsen niet geometrisch verdeeld zijn wanneer de toxiciteit wordt uitgedrukt op basis van zinkgehalten in het poriewater, danwel op basis van extraheerbare zinkgehalten. Als relatief eenvoudig vast te stellen maat voor accumulatie en toxiciteit zijn 4 mogelijke uitdrukkingen voor de biobeschikbare fractie gebruikt: het totaalgehalte in de vaste fase, het zinkgehalte in het poriewater, het 0,01 M CaCl₂-extraheerbare zinkgehalte en het 0,43 M HNO₃-extraheerbare zinkgehalte.

De fysisch-chemische analyses van de gronden en het poriewater zijn uitgevoerd via standaard-methodieken die elders uitvoerig beschreven zijn.

- Vaste fase bepalingen. De volgende bodemeigenschappen van de vaste fase zijn gemeten: pH(CaCl₂), Loss-On-Ignition (LOI), klei (deeltjes $\leq 2 \mu\text{m}$), fractie deeltjesgrootte tussen 2 en 38 μm , totaal koolstof en organisch materiaal, en de concentraties van de metalen As, Ca, Cr, Ni, Cd, Cu, Pb en Zn. Voor verdere details met betrekking tot de metalenanalyse, zie De Groot et al. (1998). De LOI-bepaling was onderverdeeld in twee stappen, de eerste stap bestond uit verhitting van circa 5 g grond gedurende drie uur bij 550 °C (LOI1, dit betreft de bepaling van de organisch-stof fractie) waarna deze grond nogmaals werd verhit gedurende drie uur bij 900 °C (LOI2, dit betreft de fractie anorganisch koolstof, carbonaten). Het totaal-koolstofgehalte van de grond werd geanalyseerd met behulp van een Elemental Analyzer (Fisons Instruments Model EA 1108). Het percentage lutum en fractie 2 – 38 μm in de grond werden gravimetrisch bepaald.
- CaCl₂-extractie. Tien gram luchtdroge grond werd uitgeschud met 100 ml 0,01 M CaCl₂. Na 24 uur schudden bij kamertemperatuur werd het supernatant gefiltreerd over een 0,45

µm acetaatfilter waarna de pH(CaCl₂) en de concentraties zware metalen werden gemeten.

- HNO₃-extractie. Tien gram luchtdroge grond werd uitgeschud met 100 ml 0,43 M HNO₃. Na 24 uur schudden bij kamertemperatuur werd het supernatant gefiltreerd over een 0,45 µm acetaatfilter waarna de concentraties zware metalen werden gemeten.
- Poriewaterbepalingen. Voor het verzamelen van het poriewater zijn de monsters met kraanwater op een vochtgehalte van minimaal 50 % van de Water Holding Capacity (WHC) gebracht. Na minimaal vier dagen equilibreren met het toegevoegde vocht bij kamertemperatuur werd van een deel van het monster het poriewater verzameld door middel van centrifugeren (6000 g) in teflonvaatjes bij 15 °C. In deze poriewater-fracties, die na centrifugeren over een 0,45 µm filter werden gefiltreerd, zijn de metaalconcentraties bepaald. Daarnaast is de pH van het poriewater gemeten, alsmede de geleidbaarheid, het gehalte aan opgelost koolstof (DOC) en de concentraties van de belangrijkste anionen.

Tenzij anders vermeld, worden alle concentraties uitgedrukt op drooggewicht-basis.

Sorptie van zink in de bodems is beschreven met behulp van een Freundlich-isotherm:

$$C_s = K_f * C_w^{1/n} \quad (1)$$

In deze vergelijking is C_s het zinkgehalte in de vaste fase (mg/kg droge stof), K_f is de Freundlich-sorptie-coëfficiënt, C_w is het zinkgehalte in het poriewater (mg/L poriewater), n is de Freundlich-sorptie-exponent (n is gelijk aan 1 in geval van lineaire zinkpartitie). Behalve van zinkgehalten in de vaste fase en in het poriewater, is bij het beschrijven van het gedrag van zink gebruik gemaakt van de gemeten extraheerbare zinkgehalten.

2.2 Accumulatie- en toxiciteitstoetsen

De gecombineerde accumulatie- en toxiciteitstoetsen zijn uitgevoerd met de regenwormen *Aporrectodea caliginosa* en *Lumbricus rubellus* en de miljoenpoot *Polydesmus angustus*. De dieren zijn in het veld verzameld en gedurende minimaal 1 week in het lab bij 15 °C in de grond van oorsprong bewaard. De voor de toetsen gebruikte grond is met behulp van kraanwater op een vochtgehalte van 70 % van de maximale Water Holding Capacity (WHC) gebracht. Er werd zoveel mogelijk gewerkt met adulte dieren. Bij aanvang van de bioassays werden 4 regenwormen gevangen. Na 48 uur leging van de darmen op vochtig filterpapier werden deze ingevroren en in een later stadium geanalyseerd ter vastlegging van de achtergrondconcentraties in de dieren ($t=0$ dagen). Hetzelfde is gedaan met de miljoenpoten,

zij het dat in dit geval de leging van de darmen gedurende 24 uur heeft plaats gevonden. Voor de bioassays met regenwormen werden de dieren per 4 stuks gevangen, gewogen en toegevoegd aan een glazen pot met daarin minimaal 300 gram vochtige grond. Op gezette tijden (gangbaar bemonsteringsschema was: 3, 7, 14, 21, 28 dagen) werden 4 dieren uit 1 pot gevangen, gewogen, gedurende 48 uur op vochtig filtreerpapier geplaatst, opnieuw gewogen en ingevroren. *L. rubellus* is tijdens de toetsen gevoerd met populierenblad. Aangezien *Aporrectodea caliginosa* alleen bodemmateriaal eet was het niet nodig om deze dieren bij te voeren. Als eindpunt voor toxiciteit is het aantal levende wormen na een blootstelling van 28 uur bepaald.

De accumulatie-toetsen met de miljoenpoten werden uitgevoerd in plastic bakjes met daarin minimaal 100 gram grond. In elk bakje werden 12 dieren geplaatst. Tevens werd ongeveer 5 gram grof gemalen populierenblad als voedsel toegevoegd. Op gezette tijden werden 3 dieren uit het bakje gehaald, 24 uur op vochtig filtreerpapier geplaatst en ingevroren. Daarnaast is in alle gevallen een aparte toxiciteitstoets uitgevoerd waarbij op gelijke wijze 10 dieren gedurende 28 dagen in de gronden zijn blootgesteld. Regelmatig werden gestorven dieren verwijderd. Als eindpunt van toxiciteit is het aantal overlevenden na 28 dagen blootstelling bepaald.

De toetsen met miljoenpoten zijn uitgevoerd bij 25 °C, de regenwormen zijn continu belicht terwijl de miljoenpoten in het donker zijn blootgesteld. Na afloop van de accumulatie-toetsen zijn de ingevroren dieren gevriesdroogd, waarna de metalen in de regenwormen werden ontsloten door middel van een destructie met 6 ml salpeterzuur en 12 ml water gedurende één uur bij een temperatuur van 175 °C in een magnetron van CEM, type MDS-2000, en daarna doorverdund tot 50 ml. Het ontsluiten van metalen in *P. angustus* werd uitgevoerd door middel van een mini-destructie. De gevriesdroogde dieren werden in een pyrexbuisje met 500 µl destructieoplossing (een 1:7 mengsel van HNO₃ en HClO₄) in een destructieblok geplaatst waarbij de temperatuur langzaam oploopt van 80 °C naar 170 °C. Na het droogvallen van het pyrexbuisje werd deze verwijderd uit het destructieblok waarna het destruaat met 750 µl aangezuurd Milli-Q water (pH 2) werd opgelost.

Het metaalgehalte in de destruatens werd bepaald met atomaire-absorptie spectrometrie (AAS). Cr, Ni, As, Cd en Pb werden bepaald met de P-E 5100 ZL (grafietoven) en Cu en Zn met de P-E AAnalyst 100 (vlam). Metaalconcentraties worden uitgedrukt als mg.kg⁻¹ drooggewicht. Als referentiemateriaal werd Dogfish Liver (DOLT-2) gebruikt.

De lichaamsconcentraties van de metalen werden geanalyseerd met behulp van een één-compartimentsmodel, volgens Formule 2:

$$C_w(t) = C_0 * e^{-k*t} + C_{(ss)} * (1 - e^{-k*t}) \quad (2)$$

Met: $C_w(t)$ = de concentratie in het organisme als functie van de tijd (mmol/kg drooggewicht), C_0 is de concentratie in het organisme op dag 0 (mmol/kg drooggewicht), t = de tijd (in dagen), k = de eliminatie-snelheidsconstante (dag^{-1}), C_{ss} = het gehalte van de stof bij evenwicht (mmol/kg drooggewicht). Het model werd op de data gefit met behulp van het programma GraphPad Prism™ 2.0.

LC50-waarden voor mortaliteit werden berekend met behulp van de trimmed Spearman-Kärber methode (Hamilton et al., 1978). In een aantal gevallen was het niet mogelijk om de standaarddeviatie in de berekende LC50-waarde te bepalen doordat alle dieren binnen 28 dagen stierven bij de hoogste concentraties terwijl er geen toxiciteit bij lagere blootstelling werd waargenomen. De geen-effect-concentratie (NOEC) is in deze studie gedefinieerd als de hoogste concentratie waarbij geen sterfte werd waargenomen. Zowel de LC50 als de NOEC zijn uitgedrukt op basis van de zinkgehalten in de vaste fase en het poriewater, alsook op basis van CaCl_2 - en HNO_3 -extraheerbare zinkgehalten. Teneinde de invloed van bodem- en poriewater eigenschappen op de toxiciteit te kwantificeren is daarnaast lineaire regressie uitgevoerd tussen de op deze 4 manieren uitgedrukte toxiciteit en aantal van de belangrijkste bodem- en poriewater eigenschappen waarvan verwacht werd dat ze de toxiciteit zouden kunnen beïnvloeden. Alleen de pH bleek in dit verband van belang te zijn.

3. Resultaten

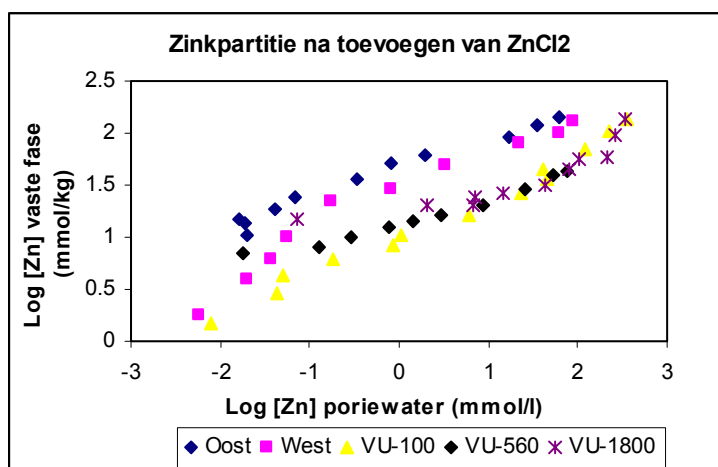
3.1 Fysisch-chemische beschikbaarheid: zinkpartitie

De primaire data betreffende gemeten gehalten in de vaste fase en in het poriewater zijn om pragmatische redenen niet in dit rapport opgenomen. Deze data zijn op verzoek in elektronische vorm beschikbaar.

3.1.1 Zinkpartitie na toevoegen van zinkchloride

Metaalpartitie in de gespikete bodems is bestudeerd aan de hand van de Freundlich-vergelijking (formule 1). Naast de partitie van zink is ook het effect van het toevoegen van zink op de partitie van andere zware metalen, in dit geval As, Ca, Cd, Cu, Ni en Pb, nagegaan. Competitie van het toegevoegde zink met de genoemde metalen aan het oppervlak van de bodemdeeltjes leidt tot mobilisatie van de metalen en dus tot verhoogde gehalten van deze metalen in het poriewater. Daarnaast zorgt het toevoegen van zinkchloride voor een significante, dosis-afhankelijke, daling van de pH van de bodem. Ook hierdoor zullen metaalgehalten in het poriewater verhoogd worden. Toevoeging van zinkacetaat leidde, na mineralisatie van het toegevoegde acetaat, tot een beperkte verhoging van de pH waardoor geen extra mobilisatie van de genoemde metalen in het poriewater werd waargenomen (pH-verhoging compenseert grofweg voor de verhoogde competitie van deze metalen met zink aan het bodemoppervlak).

Zinkpartitie was sterk bodem-afhankelijk. In figuur 2 zijn enkele karakteristieke sorptiecurves weergegeven. Zoals blijkt uit figuur 2 is er een maximale variatie in de vaste fase gehalten van ruwweg 2 ordes van grootte, terwijl de poriewatergehalten meer dan 4 ordes van grootte verschillen onder de gegeven omstandigheden (waarschijnlijk geen volledig thermodynamisch evenwicht). Bovendien valt uit figuur 2 af te leiden dat de gekozen bodems de mogelijkheid bieden om bij een gelijk gehalte aan zink in de vaste fase, accumulatie- en toxiciteitstoetsen uit te voeren waarbij het zinkgehalte in het poriewater ongeveer 2 ordes van grootte verschilt. Metaalpartitie in de VU-bodems is onderling vergelijkbaar. Hetzelfde geldt voor de partitie in de Oost en West gronden. Partitie in Oost en West wijkt echter af van de partitie in de VU-gronden. Het was niet mogelijk om op basis van deze data een model te ontwikkelen waarmee het verschil in partitie tussen verschillende bodemtypes kan worden voorspeld.



Figuur 2. Karakteristieke sorptie-curves voor het beschrijven van de partitie van zink in een 5-tal landbodems na toevoegen van een oplossing van zinkchloride.

De Freundlich-isothermen alsmede de bijbehorende statistische parameters voor het beschrijven van de partitie van zink na toevoegen van zinkchloride zijn in tabel 1 weergegeven. De Freundlich-isotherm is niet alleen berekend voor de partitie van zink tussen de vaste fase en het poriewater, maar ook voor de partitie tussen extraheerbare gehalten en het poriewater danwel de vaste fase. Zoals blijkt uit tabel 1 is de partitie van zink in alle gevallen goed te beschrijven met behulp van de Freundlich-isotherm. De pH bleek in een groot aantal gevallen dermate sturend te zijn voor de partitie dat het mogelijk bleek om de gehalten aan zink in de vaste fase en in het poriewater danwel de extraheerbare zinkgehalten direct te correleren aan de pH. Deze correlaties zijn in tabel 2 weergegeven.

Tabel 1. Log-getransformeerde Freundlich-isothermen (vergelijking 1) voor de partitie van zink in een aantal Nederlandse bodems na toevoegen van zinkchloride: $\log Y = a * \log X + b$. Y is het zinkgehalte in de sorberende fase, X is het zinkgehalte in de fase waarmee gesorbeerde zinkionen in evenwicht zijn, se = standard error, R^2_{adj} is de waarde van de regressiecoëfficiënt na correctie voor het aantal vrijheidsgraden, n is het aantal datapunten en F is een indicatie van het significantieniveau. Zn total is het totaalgehalte van zink in de vaste fase, Zn pw is het gehalte aan zink in het poriewater, Zn HNO₃ en Zn CaCl₂ zijn de extraheerbare zinkgehalten.

Bodem	Y	X	a	b	se - a	se - b	R^2_{adj}	n	F	Significance F
Oost	Zn total	Zn pw	0,29	1,66	0,02	0,02	0,972	11	350	1,63E-08
West	Zn total	Zn pw	0,45	1,33	0,06	0,08	0,859	10	56	7,06E-05
VU-0	Zn total	Zn pw	0,34	1,03	0,03	0,07	0,978	4	133	7,44E-03
VU-100	Zn total	Zn pw	0,39	1,02	0,02	0,03	0,980	13	593	6,42E-11
VU-560	Zn total	Zn pw	0,23	1,13	0,02	0,03	0,925	10	112	5,50E-06
VU-1800	Zn total	Zn pw	0,34	1,07	0,05	0,09	0,836	9	47	1,31E-04
VU-3200	Zn total	Zn pw	0,14	1,39	0,03	0,02	0,891	4	25	3,71E-02
Oost	Zn HNO ₃	Zn pw	0,32	1,59	0,02	0,02	0,969	11	315	2,60E-08
West	Zn HNO ₃	Zn pw	0,50	1,23	0,07	0,09	0,839	10	48	1,22E-04
VU-100	Zn HNO ₃	Zn pw	0,48	0,76	0,03	0,05	0,958	13	277	3,77E-09
VU-560	Zn HNO ₃	Zn pw	0,34	0,82	0,05	0,06	0,852	8	41	6,68E-04
VU-1800	Zn HNO ₃	Zn pw	0,32	1,04	0,05	0,08	0,756	13	38	6,98E-05
Oost	Zn CaCl ₂	Zn pw	0,91	0,05	0,08	0,11	0,925	11	125	1,40E-06
West	Zn CaCl ₂	Zn pw	0,95	-0,41	0,08	0,10	0,943	9	133	8,30E-06
VU-100	Zn CaCl ₂	Zn pw	0,74	0,01	0,04	0,05	0,976	12	442	1,32E-09
VU-560	Zn CaCl ₂	Zn pw	0,55	0,29	0,02	0,03	0,986	10	630	6,81E-09
VU-1800	Zn CaCl ₂	Zn pw	0,46	0,59	0,04	0,06	0,915	13	130	1,96E-07
Oost	Zn total	Zn CaCl ₂	0,31	1,64	0,01	0,01	0,986	11	721	6,67E-10
West	Zn total	Zn CaCl ₂	0,42	1,56	0,02	0,02	0,989	9	700	2,82E-08
VU-100	Zn total	Zn CaCl ₂	0,52	1,01	0,02	0,03	0,978	12	487	8,21E-10
VU-560	Zn total	Zn CaCl ₂	0,41	1,01	0,04	0,03	0,924	10	110	5,90E-06
VU-1800	Zn total	Zn CaCl ₂	0,55	0,91	0,05	0,06	0,935	11	145	7,59E-07
Oost	Zn HNO ₃	Zn CaCl ₂	0,34	1,57	0,02	0,02	0,979	11	468	4,52E-09
West	Zn HNO ₃	Zn CaCl ₂	0,48	1,49	0,03	0,03	0,974	10	304	5,05E-07
VU-100	Zn HNO ₃	Zn CaCl ₂	0,65	0,75	0,05	0,06	0,933	12	155	2,04E-07
VU-560	Zn HNO ₃	Zn CaCl ₂	0,71	0,51	0,09	0,08	0,891	8	58	2,63E-04
VU-1800	Zn HNO ₃	Zn CaCl ₂	0,72	0,60	0,07	0,09	0,898	13	107	5,25E-07
Oost	Zn total	Zn HNO ₃	0,89	0,24	0,02	0,04	0,993	11	1343	4,16E-11
West	Zn total	Zn HNO ₃	0,88	0,25	0,02	0,03	0,995	10	1733	1,22E-10
VU-100	Zn total	Zn HNO ₃	0,80	0,41	0,03	0,04	0,977	13	518	1,33E-10
U-560	Zn total	Zn HNO ₃	0,63	0,63	0,09	0,09	0,856	9	49	2,17E-04
VU-1800	Zn total	Zn HNO ₃	0,73	0,50	0,06	0,09	0,935	11	146	7,30E-07

Tabel 2. Correlaties tussen pH en zinkgehalten in een aantal Nederlandse bodems na toevoegen van zinkchloride: $\log Y = a * pH + b$. se = standard error, R^2_{adj} is de waarde van de regressiecoëfficiënt na correctie voor het aantal vrijheidsgraden, n is het aantal datapunten en F is een indicatie van het significantieniveau. Zn total is het totaalgehalte van zink in de vaste fase, Zn pw is het gehalte aan zink in het poriewater, Zn HNO₃ en Zn CaCl₂ zijn de extraheerbare zinkgehalten. Enkel de statistisch significante relaties (p<0.001) zijn weergegeven.

Bodem	Y	a	b	se-a	se-b	R^2_{adj}	n	F	Significance F
Oost	Zn pw	-2,47	16,65	0,19	1,32	0,947	10	163	1,33E-06
Oost	Zn CaCl ₂	-2,03	13,81	0,22	1,51	0,903	10	84	1,59E-05
Oost	Zn HNO ₃	-0,76	6,71	0,07	0,51	0,919	10	103	7,48E-06
Oost	Zn total	-0,67	6,20	0,06	0,43	0,926	10	114	5,19E-06
West	Zn pw	-2,22	15,31	0,14	0,94	0,967	10	266	2,00E-07
West	Zn CaCl ₂	-2,29	15,31	0,19	1,32	0,946	9	141	6,87E-06
West	Zn HNO ₃	-1,17	9,28	0,13	0,88	0,903	10	85	1,55E-05
West	Zn total	-1,04	8,50	0,10	0,68	0,925	10	112	5,64E-06
VU-0	Zn pw	-2,32	15,21	0,23	1,70	0,970	4	99	9,93E-03
VU-100	Zn pw	-2,79	18,09	0,46	2,89	0,762	10	36	1,28E-04
VU-560	Zn pw	-1,68	11,30	0,26	1,68	0,824	10	43	1,75E-04
VU-560	Zn CaCl ₂	-0,92	6,45	0,16	1,03	0,784	10	34	4,02E-04
VU-560	Zn HNO ₃	-0,70	5,42	0,26	1,66	0,435	9	7	3,16E-02
VU-560	Zn total	-0,53	4,63	0,15	0,95	0,597	9	13	8,96E-03
VU-1800	Zn pw	-1,97	13,38	0,12	0,73	0,962	12	281	1,19E-08
VU-1800	Zn CaCl ₂	-0,89	6,67	0,11	0,70	0,847	12	62	1,38E-05
VU-1800	Zn HNO ₃	-0,58	5,04	0,12	0,72	0,685	12	25	5,48E-04
VU-1800	Zn total	-0,72	5,93	0,10	0,61	0,846	10	50	1,03E-04
VU-3200	Zn pw	-1,86	12,70	0,11	0,73	0,990	4	288	3,45E-03

Ook de gehalten van Ca, Cd, Ni en Pb in het poriewater en de 0,01 M CaCl₂-extraheerbare gehalten van deze metalen waren gecorreleerd aan de pH. Dit gold niet voor As (sterke sorptie aan het in de bodem aanwezige ijzer(hydr)oxide) en Cu (sorptie met DOC belangrijke factor). In de tabellen 3 en 4 zijn de gevonden correlaties weergegeven.

Tabel 3. Correlaties tussen pH en metaalgehalten in het poriewater van een aantal Nederlandse bodems na toevoegen van zinkchloride: $\log Y = a * pH + b$. se = standard error, R^2_{adj} is de waarde van de regressiecoëfficiënt na correctie voor het aantal vrijheidsgraden, n is het aantal datapunten, F is een indicatie van het significantieniveau. -- =niet bepaald.

Bodem	Metaal	a	B	Se - a	Se - b	R^2_{adj}	n	F	Significance F
Oost	As	-0,47	1,88	0,16	1,13	0,445	10	8	2,09E-02
	Ca	-0,61	5,84	0,06	0,44	0,908	10	90	1,27E-05
	Cd	-1,77	11,24	0,15	1,00	0,942	10	148	1,93E-06
	Cu	-0,09	0,56	0,11	0,79	-0,040	10	1	4,43E-01
	Ni	-1,30	9,03	0,14	0,99	0,900	10	82	1,80E-05
	Pb	-0,78	2,65	0,14	0,96	0,771	10	31	5,10E-04
West	As	-0,57	2,67	0,18	1,25	0,469	11	10	1,20E-02
	Ca	-0,71	6,60	0,08	0,58	0,878	11	73	1,32E-05
	Cd	-1,88	11,97	0,17	1,19	0,923	11	122	1,58E-06
	Cu	-0,10	0,71	0,08	0,59	0,038	11	1	2,68E-01
	Ni	-1,39	9,62	0,12	0,85	0,927	11	129	1,24E-06
	Pb	-0,66	2,01	0,11	0,78	0,772	11	35	2,29E-04
VU-0	As	0,41	-4,65	0,15	1,11	0,677	4	7	1,14E-01
	Ca	-0,65	5,84	0,09	0,65	0,946	4	54	1,81E-02
	Cd	-1,67	10,32	0,10	0,74	0,989	4	268	3,72E-03
	Cu	-0,01	-0,40	0,18	1,32	-0,496	4	0.005	9,51E-01
	Ni	-0,73	4,43	0,21	1,53	0,785	4	12	7,43E-02
	Pb	-0,69	2,61	0,13	0,91	0,908	4	31	3,12E-02
VU-100	As	-0,94	4,96	0,24	1,50	0,617	10	15	4,32E-03
	Ca	-0,79	6,42	0,12	0,75	0,781	13	44	3,79E-05
	Cd	-1,65	9,94	0,29	1,81	0,729	13	33	1,24E-04
	Cu	-0,50	3,21	0,09	0,58	0,704	13	29	2,07E-04
	Ni	-1,46	9,07	0,24	1,48	0,770	13	38	1,08E-04
	Pb	-1,55	7,80	0,30	1,84	0,707	12	28	3,74E-04
VU-560	As	-0,31	0,51	0,30	1,96	0,009	9	1	3,35E-01
	Ca	-0,65	5,50	0,08	0,52	0,877	10	65	4,06E-05
	Cd	-1,32	7,92	0,19	1,26	0,836	10	47	1,32E-04
	Cu	-0,61	3,84	0,11	0,68	0,799	9	33	7,10E-04
	Ni	-1,55	10,10	0,25	1,62	0,819	9	37	4,95E-04
	Pb	-1,13	5,00	0,38	2,40	0,500	10	9	1,99E-02
VU-1800	As	-1,91	10,56	0,21	1,26	0,884	12	85	3,30E-06
	Ca	-0,87	6,66	0,10	0,62	0,861	12	76	2,94E-06
	Cd	-1,58	9,37	0,27	1,65	0,748	12	34	1,74E-04
	Cu	-0,66	4,21	0,16	0,97	0,595	12	17	2,00E-03
	Ni	-1,59	10,30	0,21	1,25	0,842	12	60	1,60E-05
	Pb	-2,05	10,68	0,21	1,28	0,895	12	94	2,07E-06
VU-3200	As	--	--	--	--	--	2	--	--
	Ca	-1,22	8,89	0,18	1,18	0,940	4	48	2,03E-02
	Cd	-1,99	12,05	0,10	0,65	0,993	4	417	2,39E-03
	Cu	-0,44	2,27	0,04	0,28	0,973	4	108	9,13E-03
	Ni	-1,42	9,15	0,13	0,86	0,975	4	120	8,20E-03
	Pb	-0,93	4,17	0,13	0,85	0,946	4	54	1,81E-02

Tabel 4. Correlaties tussen pH en CaCl₂-extraheerbare metaalgehalten in een aantal Nederlandse bodems na toevoegen van zinkchloride: $\log Y = a * \log pH + b$. se = standard error, R^2_{adj} is de waarde van de regressiecoëfficiënt na correctie voor het aantal vrijheidsgraden, n is het aantal datapunten, F is een indicatie van het significantieniveau.

-- =niet bepaald.

Bodem	Metaal	a	b	se - a	se - b	R^2_{adj}	n	F	Significance F
Oost	As	1,13	-8,67	0,15	1,07	0,868	9	54	1,58E-04
	Cd	-0,97	5,97	0,07	0,48	0,951	11	194	2,16E-07
	Cu	0,07	0,04	0,04	0,24	0,262	9	4	9,07E-02
	Ni	-0,59	4,61	0,05	0,36	0,927	11	127	1,31E-06
	Pb	--	--	--	--	--	--	--	--
West	As	1,44	-11,05	0,21	1,48	0,885	7	47	1,01E-03
	Cd	-1,14	6,71	0,05	0,31	0,986	10	626	6,95E-09
	Cu	-0,14	1,42	0,06	0,41	0,413	8	6	5,09E-02
	Ni	-0,57	4,12	0,05	0,32	0,942	10	146	2,01E-06
	Pb	--	--	--	--	--	--	--	--
VU-100	As	0,20	-2,25	0,20	1,32	-0,002	10	1	3,50E-01
	Cd	-0,89	5,12	0,09	0,57	0,889	13	97	8,74E-07
	Cu	-0,60	3,35	0,49	3,06	0,051	10	1	2,58E-01
	Ni	-1,16	7,05	0,14	0,87	0,862	12	69	8,22E-06
	Pb	-1,26	5,54	0,67	4,06	0,332	6	3	1,35E-01
VU-560	As	0,22	-2,27	0,04	0,26	0,782	9	30	9,6E-04
	Cd	-0,31	1,58	0,08	0,49	0,661	9	17	4,71E-03
	Cu	0,08	-0,42	0,13	0,81	-0,082	9	0	5,50E-01
	Ni	-0,14	1,39	0,06	0,40	0,339	10	6	4,54E-02
	Pb	-0,42	0,51	0,80	5,03	-0,114	8	0	6,14E-01
VU-1800	As	0,91	-6,57	0,29	1,76	0,473	11	10	1,16E-02
	Cd	-0,44	2,33	0,06	0,36	0,831	12	55	2,26E-05
	Cu	0,13	-0,76	0,10	0,63	0,057	12	2	2,25E-01
	Ni	-0,58	4,11	0,16	0,95	0,533	12	14	4,24E-03
	Pb	-1,08	4,73	0,38	2,28	0,440	10	8	2,17E-02

3.1.2 Zinkpartitie na toevoegen van zinkacetaat

Zinkacetaat is slechts toegevoegd aan de bodems uit Epen en Lepelstraat. Extraheerbare zinkgehalten zijn in deze bodems niet bepaald. De partitie van zink tussen het poriewater en de vaste fase kon ook in deze gevallen goed beschreven worden met behulp van een Freundlich-isotherm. In tabel 5 zijn de verdere details gegeven. Zoals blijkt uit de waarden van de coëfficiënten a en b uit tabel 5, is zink meer gebonden aan de vaste fase van de kleigrond uit Epen, dan aan de vaste fase van in de zandgrond uit Lepelstraat.

Tabel 5. Log-getransformeerde Freundlich-isothermen (vergelijking 1) voor de partitie van zink in Lepelstraat- en Epen-bodem na toevoegen van zinkacetaat: $\log Y = a * \log X + b$. Y is het zinkgehalte in de vaste fase, X is het zinkgehalte in het poriewater, se = standard error, R^2_{adj} is de waarde van de regressiecoëfficiënt na correctie voor het aantal vrijheidsgraden, n is het aantal datapunten en F is een indicatie van het significantieniveau.

Bodem	a	b	se - a	se - b	R^2_{adj}	n	F	Significance F
Lepelstraat	0,55	2,13	0,06	0,15	0,952	6	101	5,56E-04
Epen	0,87	2,63	0,05	0,09	0,952	16	297	8,10E-11

Hoewel de data hier niet verder besproken worden, bleek de partitie van cadmium in de gronden uit Epen en Lepelstraat na toevoegen van cadmiumacetaat met behulp van dezelfde Freundlich-isotherm beschreven te kunnen worden. Dit bevestigt dat het partitiegedrag van cadmium bij gelijkblijvende omstandigheden (met name pH) identiek is aan het gedrag van zink.

3.1.3 Conclusies zinkpartitie

- Met het oog op het gepresenteerde 3-fasen model voor biobeschikbaarheid is meting van actuele metaalgehalten in het poriewater en in de vaste fase nodig voor het begrijpen en modelleren van de metaalpartitie tussen de vaste fase en het poriewater. Deze kennis is nodig voor het op de juiste wijze kunnen interpreteren van resultaten van accumulatie- en toxiciteitstudies.
- De partitie van metalen in bodems die gespiked worden met zink is sterk pH-afhankelijk. Toevoegen van zinkchloride leidt tot dalende pH. Dit zorgt op zijn beurt voor extra mobilisatie van de in de vaste fase aanwezige kationen. Toevoegen van zinkacetaat heeft nauwelijks of geen effect op de pH en dus op de partitie van de metalen.
- Partitie van metalen is sterk afhankelijk van het bodemtype.
- Door gebruik te maken van bodems met sterk uiteenlopende bodemeigenschappen en met sterk verschillende achtergrondgehalten in combinatie met het spiken van zinkchloride danwel zinkacetaat, is het mogelijk om accumulatie- en toxiciteitstudies uit te voeren bij vergelijkbaar totaalgehalte maar bij aanzienlijk verschillende metaalgehalten in het poriewater. Dit zou op zijn beurt uitsluitsel kunnen geven over de dominante routes waarlangs accumulatie en, daaraan gekoppeld, toxiciteit plaats vindt.

3.2 Accumulatie

Zinkgehalten in de wormen namen over het algemeen toe als functie van de tijd na blootstelling in de met zinkzouten gespikete gronden, totdat een constant intern gehalte werd bereikt. Met behulp van het accumulatiemodel dat gegeven is in vergelijking 2 zijn de evenwichtgehalten en de eliminatiesnelheden van de metalen in de regenwormen en in de miljoenpoten berekend. In een groot aantal gevallen was er sprake van zeer snelle evenwichtsinstelling waardoor het niet mogelijk was om de eliminatiesnelheid accuraat te berekenen.

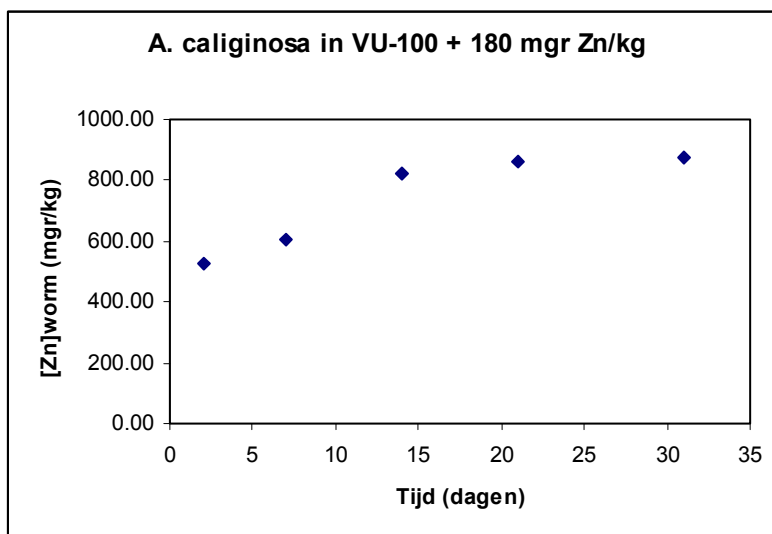
Voor zowel de regenwormen als de miljoenpoten werd gevonden, dat er geen relatie is tussen externe gehalten in het poriewater of in de vaste fase (zowel totaalgehalten als extraheerbare gehalten) én interne gehalten in de dieren na toevoegen van zinkzouten. In het algemeen bleven de gehalten van As, Cd, Cr, Cu, Ni en Pb in de dieren gelijk. Zoals gemeld in de vorige paragraaf leidde toevoeging van zinkchloride tot een daling van de pH en tot verhoogde metaalgehalten in het poriewater. De waarneming dat desondanks de interne gehalten van alle metalen (behalve zink) niet toenamen kan verklaard worden op basis van opname van metalen via de vaste fase als dominante opnameroute, of door extra competitie met H^+ aan het huidoppervlak van de organismen. Dit laatste zou in lijn zijn met de principes van het Biotic Ligand Model zoals uitgelegd in de Introductie van dit rapport.

3.2.1 Accumulatiepatronen in regenwormen

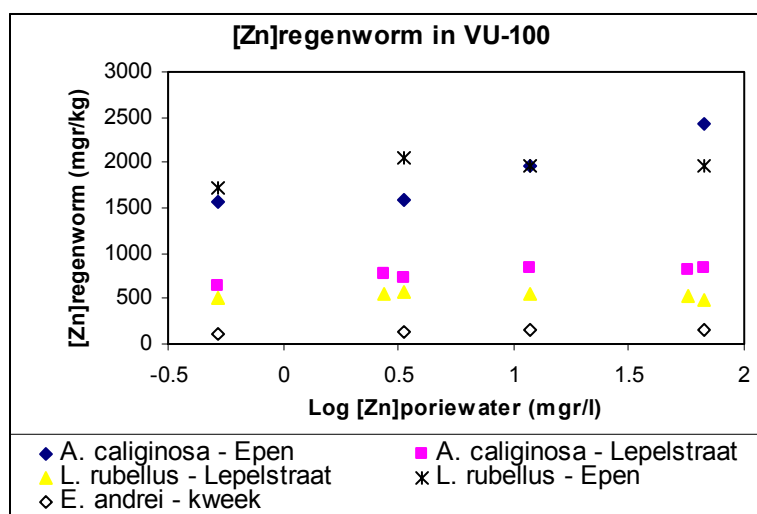
In Figuur 3 is een karakteristieke opnamecurve weergegeven. In tabel 6 is een overzicht gegeven van de gemeten interne steady-state gehalten als functie van de nominaal toegevoegde hoeveelheid zink. Uit deze tabel blijkt, dat steady-state gehalten voornamelijk afhankelijk zijn van de oorsprong van de dieren, de soort regenworm en, in mindere mate, van de nominaal toegevoegde hoeveelheid zink. In Figuur 4 zijn ter illustratie de interne zinkgehalten weergegeven zoals gemeten in twee soorten regenwormen die afkomstig zijn van de locaties Lepelstraat en Epen na blootstelling aan verschillende zinkgehalten in VU-100 grond. Daarnaast zijn de gemeten interne gehalten in de regenworm *E. andrei* weergegeven na blootstelling in dezelfde grond. Figuur 4 laat zien dat interne metaalgehalten in *E. andrei* (afkomstig uit een RIVM-kweek) significant lager zijn dan metaalgehalten in veldwormen. Uit figuur 4 kan verder geconcludeerd worden dat, ondanks de verschillen in leefwijze en voedingsstrategie tussen *L. rubellus* en *A. caliginosa*, de interne gehalten in deze soorten per

Tabel 6. Evenwichtsgehaltenes van zink in regenwormen (*Css*) na blootstelling aan zinkchloride in een aantal Nederlandse bodems. Oorsprong wormen = locatie waar de wormen zijn verzameld, bodem = de bodem waarin de accumulatie-experimenten zijn uitgevoerd. Alle eenheden zijn mgr/kg droog gewicht.

Wormen-soort	Oorsprong Wormen	Bodem	Nominale Zink-additie	Css
<i>A.caliginosa</i>	Epen	VU-100	0	1568,0
<i>A.caliginosa</i>	Epen	VU-100	180	1579,0
<i>A.caliginosa</i>	Epen	VU-100	320	1965,0
<i>A.caliginosa</i>	Epen	VU-100	560	2425,0
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	0	648,1
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	100	768,2
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	180	733,1
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	320	842,6
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	440	808,3
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-100	560	839,6
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-1800	0	1068,0
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	VU-1800	100	1134,0
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	0	801,7
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	180	812,2
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	320	858,1
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	560	1017,0
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	1000	676,3
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	Oost	1800	675,1
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	0	764,2
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	180	708,7
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	320	873,9
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	560	773,9
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	1000	614,8
<i>A.caliginosa</i>	Lepelstraat	West	1800	694,6
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	0	497,9
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	100	541,6
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	180	579,0
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	320	544,0
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	440	525,5
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	VU-100	560	475,8
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	West	0	424,9
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	West	180	393,6
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	West	320	286,7
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	West	560	241,0
<i>L. rubellus</i>	Lepelstraat	West	1000	292,0
<i>E.andrei</i>	Kweek	VU-100	0	114,7
<i>E.andrei</i>	Kweek	VU-100	180	121,8
<i>E.andrei</i>	Kweek	VU-100	320	153,4
<i>E.andrei</i>	Kweek	VU-100	560	153,0



Figuur 3. Karakteristieke accumulatie-curve voor de opname van zink door de regenworm *A. caliginosa* in VU-100 grond waaraan 180 mgr zink per kg grond (nominaal) is toegevoegd in de vorm van zinkchloride.

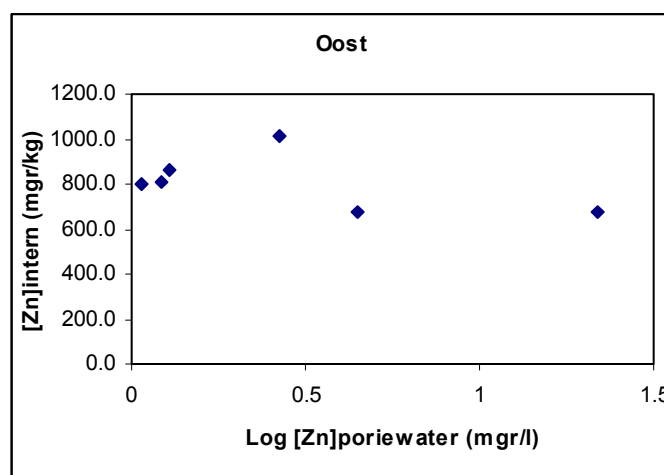


Figuur 4. Evenwichtshegtes van zink in drie soorten regenwormen na 28 dagen blootstelling in VU-100 grond die met zinkchloride is gespiket, als functie van het log-getransformeerde zinkgehalte in het poriewater.

locatie niet significant verschillen. Wel zijn er verschillen tussen locaties waarbij de hoogste interne gehalten gevonden worden voor de locatie Epen. Dit is de locatie die van nature de hoogste zinkgehalten in de vaste fase heeft. Hierbij is het zelfs zo dat interne gehalten in wormen uit Epen die geen effecten vertonen, hoger zijn dan interne zinkgehalten in wormen uit Lepelstraat na blootstelling aan sublethale zinkgehalten. Wormen uit Epen (hoog natuurlijk achtergrondgehalte) bevatten van nature interne zinkgehalten die hoger zijn dan de gehalten in wormen uit Lepelstraat (lager natuurlijk achtergrondgehalte) waarbij mortaliteit werd waargenomen. Bij de wormen uit Epen leidt dit niet tot effecten. Bovendien is de gevoeligheid van wormen van beide locaties in de toxiciteittoetsen na belasting met zink, ondanks de verschillen in interne zinkgehalten, gelijk. Uit deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat een gedeelte van het zink in de wormen uit Epen in een niet-toxische vorm aanwezig is als gevolg van interne herverdeling van de metalen in de organismen na accumulatie. Een van de beschermingsstrategieën van regenwormen tegen te hoge interne metaalgehalten, is het vastleggen van metalen in een dusdanige vorm dat deze metalen niet beschikbaar zijn voor interactie met de specifieke receptoren voor toxiciteit. Het meer of minder inert vastleggen van metalen gebeurt bijvoorbeeld na inductie van enzymen die metalen specifiek kunnen binden met een hoge bindingsaffiniteit. Deze strategie stelt de organismen in staat om relatief hoge metaalgehalten te overleven. Een consequentie van het vastleggen van opgenomen metalen op een niet-reactieve wijze is, dat het concept van het Critical Body Residue (CBR) niet opgaat voor regenwormen indien dit gebaseerd wordt op het interne totaalgehalte. In plaats van CBRs op basis van het totaalgehalte in het organisme, zouden CBRs uitgedrukt moeten worden op basis van één of meerdere metaalfracties die direct gerelateerd zijn aan toxiciteit of aan metaalfluxen. Momenteel is een begin gemaakt met het op een pragmatische wijze bepalen van de interne verdeling van metalen in regenwormen en het relateren van toxiciteit aan de verschillende interne metaalfracties (Lanno et al., 2002).

De waarneming dat interne gehalten in dieren afkomstig van dezelfde locatie onafhankelijk zijn van de externe gehalten kan, behalve op regulatie, duiden op het optreden van toxische effecten. In de hier gerapporteerde studie is mortaliteit als eindpunt voor toxiciteit genomen. Dit is een relatief ongevoelig eindpunt. Voorlopige studies, die uitgevoerd zijn naar de wijze waarop metalen door regenwormen worden vastgelegd, tonen aan dat bijvoorbeeld enzyminductie en andere sublethale eindpunten gevoeliger zijn dan mortaliteit. Het is zelfs waargenomen dat bij verhoogde zinkbelasting, afbraak van eerder geïnduceerde enzymen

optreedt, waardoor de interne gehalten zelfs kunnen dalen bij verhoogde blootstelling als gevolg van extra eliminatie van het eerder vastgelegd zink en/of verminderde opname via ingestie als functie van verminderde vitaliteit. Zoals geïllustreerd in figuur 5 werd een verlaging van interne gehalten bij verhoogde blootstelling bijvoorbeeld waargenomen bij regenwormen die blootgesteld werden in de grond Oost.

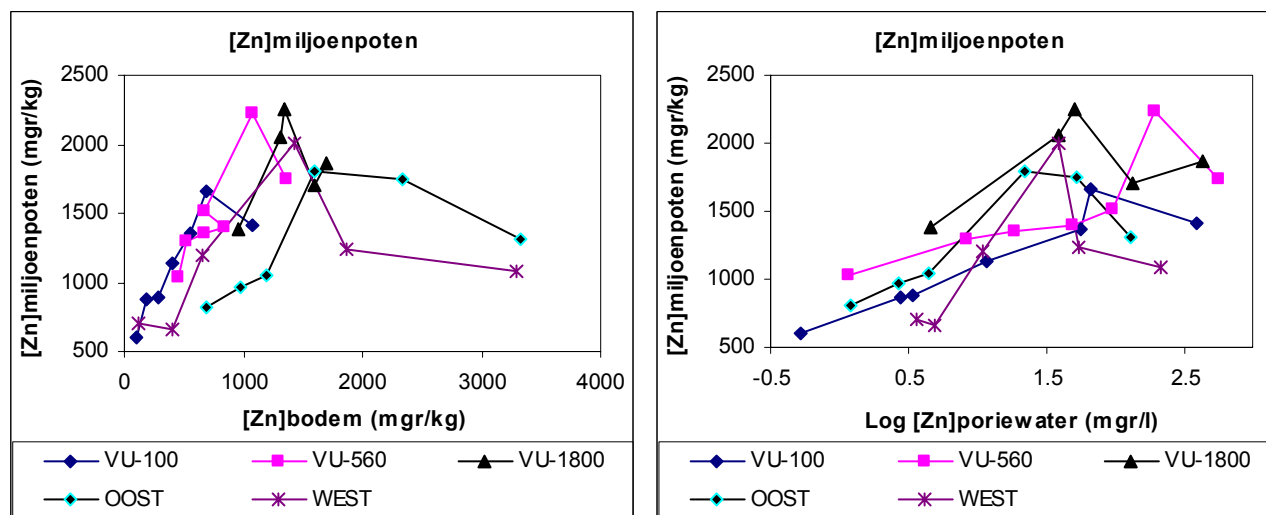


Figuur 5. Evenwichtgehalten van zink in *A. caliginosa* na blootstelling gedurende 28 dagen aan zinkchloride in grond Oost.

3.2.2 Accumulatiepatronen in miljoenpoten

De opnamepatronen van zink in *Polydesmus angus* waren in grote lijnen vergelijkbaar met de patronen die waargenomen werden bij de accumulatie-experimenten met regenwormen (paragraaf 3.2.1): interne zinkgehalten namen toe met toenemende externe zinkgehalten totdat een maximum werd bereikt, waarna mogelijk als gevolg van sublethale effecten de interne evenwichtgehalten weer afnamen. Interne gehalten van de metalen Cd, Cu, Pb en Ni waren niet significant verschillend van de interne gehalten na accumulatie in de bodems waaraan geen zinkchloride was toegevoegd. In figuur 6 zijn de interne evenwichtgehalten weergegeven na een blootstelling van 28 dagen in een vijftal gronden. Dit is gedaan als functie van hetzij het totaalgehalte aan zink in de vaste fase, danwel als functie van het zinkgehalte in het poriewater (na log-transformatie aangezien poriewatergehalten niet normaal verdeeld zijn). Uit figuur 6 blijkt dat interne gehalten bij eenzelfde extern zinkgehalte sterk afhangen van de bodem c.q. het bodemtype. In zijn algemeenheid nemen in eerste instantie de interne gehalten lineair toe met het gehalte aan zink in de vaste fase, danwel met het log-getransformeerde zinkgehalte in het poriewater. Na het bereiken van een maximum intern gehalte, dalen de interne gehalten weer. De maximaal gemeten interne

blootstelling verschilt per bodem. Bovendien wordt het maximum bij elke bodem bij een verschillend extern zinkgehalte bereikt.



Figuur 6. Evenwichtsgehaltenes van zink in *P. angustus* na blootstelling gedurende 28 dagen aan zinkchloride in een vijftal bodems, als functie van het totaalgehalte aan zink in de bodem (links) en het (log-getransformeerde poriewatergehalte; rechts). De dieren zijn afkomstig van de locatie Lepelstraat.

Interne gehaltenes in miljoenpoten die afkomstig waren van de locatie Epen (hoge natuurlijke achtergrondgehaltenes) bleken na blootstelling aan zinkchloride niet significant te verschillen van de interne gehaltenes die gevonden werden na blootstelling van dieren uit Lepelstraat aan dezelfde hoeveelheden zinkchloride.

3.2.3 Conclusies accumulatie

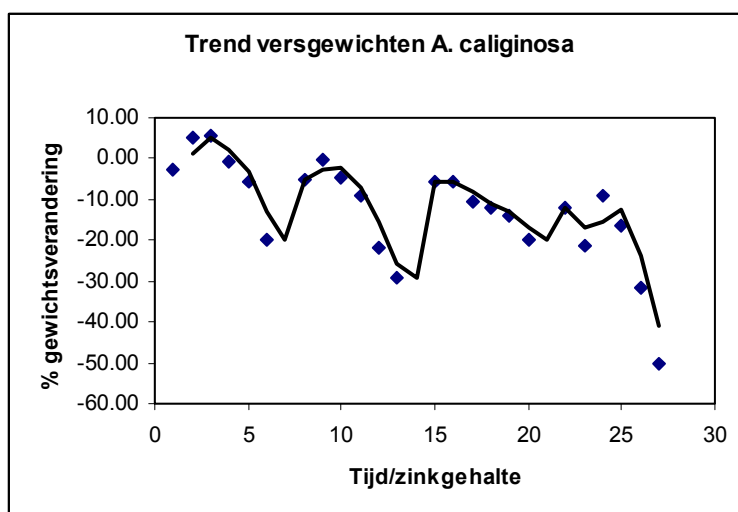
- Interne zinkgehaltenes in regenwormen en miljoenpoten nemen in eerste instantie lineair toe met toenemende externe zinkgehaltenes. Deze toename is bodemspecifiek.
- Bij hogere blootstelling wordt een (bodem-specifieke) maximale interne concentratie bereikt, waarna mogelijk als gevolg van sublethale effecten (onder andere afbraak van eerder geïnduceerde bindingsplaatsen) de evenwichtsgehaltenes dalen, totdat 100 % mortaliteit optreedt.
- Indien er sprake is van toxische effecten, dan zijn interne metaalgehaltenes op basis van totaalgehaltenes in het organisme geen goede kwantitatieve maat voor deze effecten.

- Regenwormen die van nature hogere interne metaalgehaltenes bevatten vertonen geen effecten bij interne gehaltenes die hoger zijn dan de lethale interne gehaltenes in wormen die afkomstig zijn van gebieden met van nature relatief lage achtergrondgehaltenes. Dit wordt veroorzaakt doordat een gedeelte van de in de organisme aanwezige metalen in een niet-toxische vorm door de dieren wordt vastgelegd.
- De Critical Body Residue-benadering (CBR, zie paragraaf 1.2) op basis van totaalgehaltenes in het organisme geeft geen goede beschrijving van de te verwachten toxiciteit. Een meer accurate voorspeller van toxiciteit zouden CBRs zijn op basis van de interne metaalfraction die een directe interactie heeft met de receptoren van toxiciteit in de organismen, of CBRs op basis van metaalfluxen.

3.3 Toxiciteit

3.3.1 Regenwormen

Twee eindpunten van toxiciteit zijn bestudeerd: gewichtsverandering en mortaliteit. De gewichten namen in het algemeen af als functie van de blootstellingsduur. Er was een trend zichtbaar waarbij de afname van de gewichten het sterkst gerelateerd was aan de blootstellingsduur. Daarnaast was er een trend zichtbaar van afname van het gewicht als functie van de zinkbelasting. Deze afname was in de meeste gevallen echter niet statistisch significant en wordt verder niet meer in beschouwing genomen. Ter illustratie is in figuur 7 de



Figuur 7. Trend in de versgewichten van *A. caliginosa* na blootstelling aan zinkchloride in de VU-100 bodem. De x-as geeft stijgende externe zinkgehaltenes weer waarbij 6 achtereenvolgende datapunten (oplopende blootstellingsduur) steeds betrekking hebben op één zinkgehalte. Bij hogere zinkgehaltenes werd mortaliteit waargenomen.

trend in de versgewichten van *A. caliginosa* weergegeven na blootstelling aan zinkchloride in de VU-100 bodem. Het is evident dat de afname van de gewichten als functie van de tijd van invloed kan zijn geweest op de interne zinkgehaltenes in de regenwormen.

Mortaliteit verschilde per bodem. Er waren geen verschillen in mortaliteit zichtbaar tussen de wormensoorten die in deze studie getoetst zijn (*E. andrei*, *A. caliginosa* en *L. rubellus*). Bovendien waren er geen significante verschillen in toxiciteit waarneembaar tussen wormen die afkomstig waren van verschillende locaties, ondanks dat de interne zinkgehaltenes op totaalbasis aanzienlijk verschilden. Zoals aangegeven onder “Materialen en methodes”, zijn vier uitdrukkingen van het zinkgehalte gebruikt als maat voor de toxiciteit. Daarnaast zijn de zinkactiviteiten in het poriewater berekend op basis van de samenstelling van het poriewater. Alleen poriewatergehaltenes zijn in alle bodems gemeten, waardoor strikt genomen de hieronder (Tabellen 7 – 10) gepresenteerde bevindingen voor de verschillende uitdrukkingen van het zinkgehalte niet helemaal vergelijkbaar zijn. Een herhaling van de analyse met alleen de toxiciteitsdata voor bodems waarvan alle externe zinkgehaltenes zijn bepaald, bevestigde de hieronder vermelde resultaten. In tabel 7 is een overzicht gegeven van de LC50-waarden voor *A. caliginosa* uit Lepelstraat en de daarbij behorende betrouwbaarheidsintervallen, in samenhang met de externe zinkgehaltenes. In een aantal gevallen kon er geen betrouwbaarheidsinterval worden berekend daar zinkconcentraties bleken te zijn getoetst waarbij enkel 0 of 100 % sterfte optrad.

In tabel 8 zijn per uitdrukking van het externe zinkgehalte de gemiddelde LC50, de standaarddeviatie en de procentuele standaarddeviatie weergegeven. Hieruit blijkt, dat de geringste standaarddeviatie in de gemeten LC50-waarden wordt verkregen, indien uitgegaan wordt van het totaalgehaltenes aan zink in de vaste fase danwel van het gehalte aan zink in het poriewater. Extraheerbare zinkgehaltenes danwel de activiteit van het zink in het poriewater zijn minder goede voorspellers van mortaliteit. Echter, ook in het geval van de totaalgehaltenes aan zink in de vaste fase of in het poriewater blijven er grote verschillen in toxiciteit waarneembaar. Door echter de LC50-waarden die gebaseerd zijn op het zinkgehalte in het poriewater als uitgangspunt te nemen en deze waarden vervolgens te correleren met de pH van het poriewater bij elke LC50-waarden (dit is veelal een geïnterpoleerde waarde op basis van de relaties vermeld in tabel 2), werd een model verkregen dat de mortaliteit goed kon voorspellen. In figuur 8 is de relatie tussen de LC50-waarden en de pH van het poriewater grafisch weergegeven.

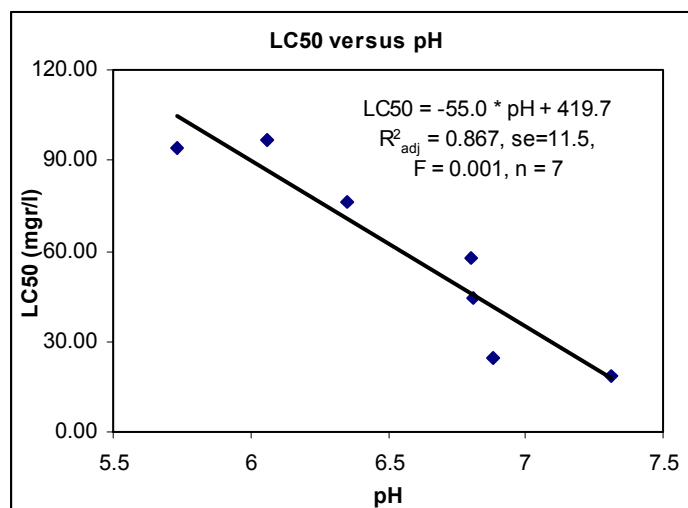
Tabel 7. Overzicht van de experimenteel bepaalde LC50-waarden met de daarbij behorende 95 % betrouwbaarheidsintervallen (conf.int.) voor *A. caliginosa* afkomstig uit Lepelstraat na blootstelling aan zinkchloride danwel zinkacetaat in 7 bodems. nr = geen betrouwbaarheidsinterval vastgesteld, nb = desbetreffend extern zinkgehalte is niet bepaald, pH(pw) is de pH van het poriewater bij de desbetreffende LC50-waarde. Dit is veelal een geïnterpoleerde waarde.

Bodem	pH (pw) at LC50 interpol.	Activiteit			Poriewater		
		LC50	95%	95%	LC50	95%	95%
			conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.
		mgr/l	min	max	mgr/l	min	max
VU-1800	6.81	41	nr	nr	44	nr	nr
VU-100	6.35	92	56	150	77	62	163
West	7.31	11	7	19	18	11	30
Oost	6.88	19	10	35	25	14	43
Lepelstraat	5.73	nb	nb	nb	94	83	107
VU-560	6.06	90	nb	nb	97	69	136
VU-3200	6.8	nb	nb	nb	58	37	89

Bodem	0.01 M CaCl ₂			0.43 M HNO ₃			Totaalgehalte		
	LC50	95%	95%	LC50	95%	95%	LC50	95%	95%
		conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.
	mgr/kg	min	max	mgr/kg	min	max	mgr/kg	min	max
VU-1800	211	nr	nr	757	nr	nr	1092	nr	nr
VU-100	92	76	112	466	325	670	728	617	858
West	16	11	25	1246	973	1597	1434	1146	1794
Oost	51	30	85	2166	1766	2656	2538	2167	2974
Lepelstraat	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
VU-560	136	109	170	726	698	756	947	890	1008
VU-3200	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Tabel 8. Overzicht van de gemiddelde LC50, de standaarddeviatie en de procentuele standaarddeviatie na blootstelling van *A. caliginosa* afkomstig uit Lepelstraat aan zinkchloride danwel zinkacetaat in 7 bodems.

	Activiteit	Poriewater	CaCl ₂ - extraheerbaar	HNO ₃ - extraheerbaar	Totaal
	mgr/l	mgr/l	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg
Gemiddelde LC50	50,5	58,9	101,2	1072,1	1347,8
Standaarddeviatie	38,4	31,6	75,8	673,2	713,4
Procentuele standaarddeviatie	76,1	53,7	74,9	62,8	52,9



Figuur 8. Grafische weergave van de relatie tussen LC50-waarden (mgr zink per liter poriewater) voor *A. caliginosa* na blootstelling aan zinkchloride danwel zinkacetaat in 7 bodems en de pH van het poriewater bij de desbetreffende LC50-waarde.

Zoals blijkt uit figuur 8 en de daarin opgenomen statistische parameters van de gevonden correlatie, wordt de voorspelling van de toxiciteit aanzienlijk verbeterd door naast het zinkgehalte in het poriewater rekening te houden met de pH van het poriewater. Het in figuur 8 gepresenteerde model voor toxiciteit laat zich ook volledig verklaren op basis van de in paragraaf 1.2 gepresenteerde Biotic Ligand Modellen. Deze modellen zijn gebaseerd op het optreden van competitie van metaalionen. Dit specifieke geval betreft competitie van zink met H^+ -ionen. Te verwachten valt dat bij dalende pH deze competitie zal toenemen waardoor er minder zink-ionen aan het oppervlak van de organismen zullen binden. Hierdoor zal bij dalende pH de zinktoxiciteit afnemen. Ofwel: de LC50-waarden zullen bij dalende pH stijgen. Dit komt overeen met de bevindingen weergegeven in figuur 8 en is eerder voor microorganismen door bijvoorbeeld Van Beelen en Kleuren-Kemila (1997) gerapporteerd.

De correlaties tussen LC50-waarden op basis van het poriewatergehalte en de andere bodem- en poriewatereigenschappen die in deze studie zijn bepaald waren niet significant. De relaties tussen LC50-waarden op basis van het totaalgehalte aan zink in de vaste fase danwel extraheerbare zinkgehaltenes, en de in deze studie bepaalde bodem- en poriewatereigenschappen waren ook niet significant. Daarom kan geconcludeerd worden dat zinktoxiciteit voor de regenworm *A. caliginosa* in het pH-gebied van 5.5 tot 7.0 gerelateerd is aan het zinkgehalte in het poriewater. Zinkgehaltenes in de vaste fase danwel extraheerbare zinkgehaltenes zijn minder geschikt om zinktoxiciteit te beschrijven.

De bevinding dat toxiciteit voor regenwormen gecorreleerd is aan het zinkgehalte in het poriewater is in lijn met eerdere studies, die gericht waren op het beschrijven van de

accumulatie van metalen in regenwormen na blootstelling in onvervuilde veldbodems (Peijnenburg et al., 1999). Hierin werd onder andere geconcludeerd, dat accumulatie van metalen in regenwormen voornamelijk via het poriewater plaats vindt.

3.3.2 Miljoenpoten

Sterfte is bestudeerd als functie van het externe zinkgehalte. De mortaliteit bleek per bodem te verschillen. Bovendien was de mortaliteit gerelateerd aan de zinkdosis. Verder waren er geen significante verschillen in toxiciteit waarneembaar tussen organismen die afkomstig waren van verschillende locaties. In tabel 9 is een overzicht gegeven van de LC50-waarden voor *P. angustus* uit Vlijmen en de daarbij behorende betrouwbaarheidsintervallen, in samenhang met de externe zinkgehalten. In één geval (VU-3200-grond) kon geen betrouwbaarheidsinterval worden berekend daar slechts zinkconcentraties bleken te zijn getoetst waarbij enkel 0 of 100 % sterfte optrad.

Tabel 9. Overzicht van de experimenteel bepaalde LC50-waarden met de daarbij behorende 95 % betrouwbaarheidsintervallen (conf.int.) voor *P. angustus* afkomstig uit Vlijmen na blootstelling aan zinkchloride in 6 bodems. nr = geen betrouwbaarheidsinterval vastgesteld, nb = desbetreffend extern zinkgehalte is niet bepaald.

Bodem	Activiteit			Poriewater		
	LC50	95%	95%	LC50	95%	95%
		conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.
		min	max		min	max
	mgr/l	mgr/l	mgr/l	mgr/l	mgr/l	mgr/l
VU-100	12	5	32	31	12	77
VU-560	89	674	118	223	164	303
VU-1800	183	176	191	243	69	856
VU-3200	nb	nb	nb	20	nr	nr
Oost	5	3	10	20	11	35
West	3	1	5	12	8	17

Bodem	0.01 M CaCl2			0.43 M HNO3			Totaalgehalte		
	LC50	95%	95%	LC50	95%	95%	LC50	95%	95%
		conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.		conf.int.	conf.int.
		min	max		min	max		min	max
	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg
VU-100	44	22	90	233	143	381	498	368	675
VU-560	246	199	304	608	532	694	866	808	929
VU-1800	325	259	407	804	435	1485	1334	1294	1376
VU-3200	nb	nb	nb	nb	nb	nb	1489	nr	nr
Oost	42	24	74	1477	1112	1962	2384	2009	2829
West	11	7	59	1113	855	1449	1294	1020	1642

Tabel 10. Overzicht van de gemiddelde LC50, de standaarddeviatie en de procentuele standaarddeviatie na blootstelling van *P. angustus* afkomstig uit Vlijmen aan zinkchloride in 6 bodems.

	Activiteit	Poriewater	CaCl ₂ - extraheerbaar	HNO ₃ - extraheerbaar	Totaal
	mgr/l	mgr/l	mgr/kg	mgr/kg	mgr/kg
Gemiddelde LC50	59	91	134	847	1311
Standaarddeviatie	78	110	142	475	639
Procentuele standaarddeviatie	134	121	106	56	49

Zoals blijkt uit tabel 10 kan de toxiciteit van zink voor de miljoenpoot *P. angustus* het beste beschreven worden op basis van het totaalgehalte aan zink in de vaste fase danwel het hier sterk aan gerelateerde HNO₃-extraheerbare zinkgehalte. Dit is lijn met nog niet-gerapporteerde bevindingen betreffende de opname van metalen door deze miljoenpoot na blootstelling in niet-gecontamineerde Nederlandse veldbodems. Ook daar werd gevonden dat metaalaccumulatie door *P. angustus* het beste beschreven kan worden op basis van het totaalgehalte in de vaste fase.

3.3.3 Conclusies toxiciteit

- De toxiciteit van zink voor de regenworm *A. caliginosa* is gerelateerd aan het zinkgehalte in het poriewater. Deze toxiciteit wordt gemoduleerd door competitie met kationen (met name H⁺), overeenkomstig de principes van het Biotic Ligand Model.
- In het geval van de miljoenpoot *P. angustus* is zinktoxiciteit gerelateerd aan het zinkgehalte in de vaste fase.
- Deze bevindingen zijn in lijn met resultaten van eerdere accumulatiestudies die aan toonden dat accumulatie van zink door regenwormen voornamelijk plaats vindt via de huid (en dus gerelateerd is aan het zinkgehalte in het poriewater) terwijl in het geval van regenwormen interne metaalgehaltenes gerelateerd zijn aan het metaalgehalte in de vaste fase (opname van metalen via het voedsel).

4. Conclusies

In dit rapport worden de resultaten van een studie beschreven waarbij de chemie van het bodemsysteem, de ecologie van de getoetste organismen en de toxische respons van deze organismen zijn geïntegreerd. Kennis van de chemie van het bodemsysteem is als basis gebruikt voor het kwantificeren van de waargenomen effecten en op basis hiervan is een

eerste doorkijk gegeven naar de achterliggende mechanismen van toxiciteit. Aangetoond wordt dat organismen op verschillende manieren reageren op de externe zinkbelasting. Te verwachten valt dat de waargenomen karakteristieke verschillen in respons kenmerkend zijn voor meerdere bodemorganismen. In een risicobeoordeling die gebaseerd is op daadwerkelijk optredende effecten zou met deze karakteristieke verschillen rekening moeten worden gehouden. Peijnenburg et al. (2001) hebben hiervoor reeds een kader geschetst, waarbij opgemerkt dient te worden dat het op dit moment nog veelal zal ontbreken aan goed gedocumenteerde data om nu reeds invulling aan dit kader te geven.

De hier gerapporteerde studie geeft een eerste invulling aan het conceptuele stappenplan van Slijkerman et al. (2000). De hier uitgevoerde toetsen voldoen aan de eisen die door Slijkerman et al. aan toxiciteitsdata gesteld worden die geschikt zijn voor het afleiden van risicogrenzen:

- De toetsen zijn uitgevoerd met natuurlijke substraten met een achtergrondgehalte dat karakteristiek is voor het ecosysteem waar de norm voor gaat gelden.
- De toetsorganismen zijn niet alleen in het natuurlijke substraat gekweekt, maar ze zijn zelfs afkomstig uit het veld.
- Alvorens de toxiciteitstest uit te voeren is een verouderingstijd aangehouden die voldoende wordt geacht om een evenwicht te krijgen tussen de verschillende speciatievormen van het metaal in het substraat (i.e. inclusief het poriewater). Hierbij dient opgemerkt te worden dat het verkrijgen van evenwicht niet strikt noodzakelijk is. Belangrijker is dat de belangrijkste speciatievormen experimenteel zijn bepaald danwel gemodelleerd op basis van speciatieberekeningen. Deze metingen en berekeningen zijn in deze studie uitgevoerd, bovendien werd op basis van Freundlich-isothermen aangetoond dat metaalpartitie in gespikete bodems niet wezenlijk verschilde van partitie in de natuurlijke substraten. Dit betekent dat het toegevoegd gehalte qua biologische beschikbaarheid niet al te veel verschilt van het reeds aanwezige achtergrondgehalte.
- Het geen-effect-niveau is in deze studie op verschillende manieren uitgedrukt in termen van het totaal teruggemeten gehalten (inclusief het achtergrondgehalte).

Deze studie toont aan dat het mogelijk is om het toegevoegd risico op een organisme-specifieke wijze te integreren in de testgegevens, waarbij het achtergrondgehalte direct in de data is geïntegreerd.

Concreet wordt geconcludeerd dat:

- Meting van actuele metaalgehaltenes in het poriewater en in de vaste fase nodig is voor het kunnen begrijpen en modelleren van de metaalpartitie tussen de vaste fase en het poriewater.
- De partitie van metalen in bodems die gespiked worden met zink sterk pH-afhankelijk is. Toevoegen van zinkchloride leidt tot dalende pH. Dit zorgt op zijn beurt voor extra mobilisatie van de in de vaste fase aanwezige kationen. Toevoegen van zinkacetaat heeft nauwelijks of geen effect op de pH en dus op de partitie van de metalen.
- Partitie van metalen sterk afhankelijk is van het bodemtype.
- Door gebruik te maken van bodems met sterk uiteenlopende bodemeigenschappen en met sterk verschillende achtergrondgehaltenes in combinatie met het spiken van zinkchloride danwel zinkacetaat, het mogelijk is om accumulatie- en toxiciteitsstudies uit te voeren bij vergelijkbaar totaalgehalte maar bij aanzienlijk verschillende metaalgehaltenes in het poriewater. Dit zou op zijn beurt uitsluitsel kunnen geven over de dominante routes waarlangs accumulatie en, daaraan gekoppeld, toxiciteit plaats vindt.
- Interne zinkgehaltenes in regenwormen en miljoenpoten in eerste instantie lineair toenemen met toenemende externe zinkgehaltenes. Deze toename is bodemspecifiek. Bij hogere blootstelling wordt een (bodem-specifieke) maximale interne concentratie bereikt, waarna mogelijk als gevolg van sublethale effecten (onder andere afbraak van eerder geïnduceerde bindingsplaatsen) de evenwichtsgehaltenes dalen, totdat 100 % mortaliteit optreedt.
- Interne metaalgehaltenes op basis van totaalgehaltenes in het organisme geen goede kwantitatieve maat zijn voor het optreden van toxische effecten.
- Regenwormen die van nature hogere interne metaalgehaltenes bevatten geen effecten vertonen bij interne gehaltenes die hoger zijn dan de lethale interne gehaltenes in wormen die afkomstig zijn van gebieden met van nature relatief lage achtergrondgehaltenes. Dit wordt veroorzaakt doordat een gedeelte van de in de organismen aanwezige metalen in een niet-toxische vorm door de dieren wordt vastgelegd.
- De Critical Body Residue-benadering (CBR, zie paragraaf 1.2) op basis van totaalgehaltenes in het organisme dan ook geen goede beschrijving geeft van de te verwachten toxiciteit. Een meer accurate voorspeller van toxiciteit zouden CBRs zijn op

basis van de interne metaalfraction die een directe interactie heeft met de receptoren van toxiciteit in de organismen, of op basis van metaalfluxen.

- De toxiciteit van zink voor de regenworm *A. caliginosa* gerelateerd is aan het zinkgehalte in het poriewater. Deze toxiciteit wordt gemoduleerd door competitie met kationen (met name H^+), overeenkomstig de principes van het Biotic Ligand Model. In het geval van de miljoenpoot *P. angustus* is de zinktoxiciteit gerelateerd aan het zinkgehalte in de vaste fase. Deze bevindingen zijn in lijn met resultaten van eerdere accumulatiestudies die aantoonde dat accumulatie van zink door regenwormen voornamelijk plaats vindt via de huid (en dus gerelateerd is aan het zinkgehalte in het poriewater) terwijl in het geval van regenwormen interne metaalgehaltenes gerelateerd zijn aan het metaalgehalte in de vaste fase (opname van metalen via het voedsel).

Literatuur

1. Van Beelen, P. and A.K. Fleuren-Kemila. Influence of pH on the toxic effects of zinc, cadmium, and pentachlorophenol on pure cultures of soil microorganisms. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 16, pp. 146-153, 1997.
2. Crommentuijn, T., M.D. Polder and E.J. van de Plassche. Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for metals, taking background concentrations into account. RIVM rapport 601501001, 1997.
3. Gezondheidsraad: Commissie Risico-evaluatie van Stoffen. Zink. Gezondheidsraad, nr. 1997/34, Rijswijk, 1998.
4. Groot, A.C. de, W.J.G.M. Peijnenburg, M.A.G.T van den Hoop, R. Ritsema and R.P.M. van Veen. Heavy metals in Dutch field soils: an experimental and theoretical study on equilibrium partitioning. 1998. RIVM rapport 607220 001.
5. Hamelink, J.L., P.F. Landrum, H.L. Bergman, W.H. Benson. Bioavailability. Physical, chemical and biological interactions. CRC Press, Boca Raton, USA, 1994.
6. Hamilton, M.A., R.C. Russo, R.V. Thurston. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Science Technol.*, Vol 11, pp 714-719, 1978.
7. Peijnenburg, W., L. Posthuma, H. Eijsackers, H. Allen. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, Vol. 37, pp. 163-172, 1997.
8. Peijnenburg, W., R. Baerselman, A. de Groot, T. Jager, L. Posthuma en R. Van Veen. Relating environmental availability to bioavailability: soil-type dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 44, pp. 294-310, 1999.
9. Peijnenburg, W.J.G.M., D.T. Jager, L. Posthuma, D.T.H.M. Sijm. Huidige mogelijkheden en inzichten voor implementatie van metaalbiobeschikbaarheid in de risicobeoordeling van landbodems. RIVM rapport 607220004, 2001.
10. Posthuma, L., J. Notenboom, A. de Groot en W. Peijnenburg. Soil acidity as a major determinant of zinc partitioning and zinc uptake in two oligochaete worms (*Eisenia andrei* and *Enchytraeus crypticus*) exposed in contaminated fields soils. In: Sheppard S, Bembridge J, Holmstrup M, Posthuma L (eds) *Advances in earthworm ecotoxicology*. SETAC Press, Pensacola, FL USA, pp 111-127, 1998.

11. Slijkerman, D.M.E., C.A.M. van Gestel, N.M. van Straalen. Conceptueel kader voor de normstelling van essentiële metalen in het milieu. Instituut voor Ecologische Wetenschappen, Afdeling Dierecologie, Vrije Universiteit, Amsterdam, 2000.
12. Smit, E. Field relevance of the *Folsomia candida* soil toxicity test. Proefschrift, Vrije Universiteit Amsterdam, 1997.
13. Tilborg, W.J.M. Van. A further look at zinc refuted. Van Tilborg consultancy BV, Rozendaal, 1996.
14. Tilborg, W.J.M. Van, F. Van Assche. Integrated criteria document zinc – Industry addendum. Van Tilborg consultancy BV, Rozendaal. In cooperation with the European Zinc Institute, Brussel, 1995.
15. Lanno, R.P., B. Gunadi, N. Basta, K. Bradham, M. Vijver, W. Peijnenburg. A fractionation procedure for the development of critical body residues for metals in earthworms. *Pedobiologica*, submitted, 2002.

Bijlage 1: Verzendlijst

1. Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Afvalstoffen en Straling
2. Drs. E. Maas – Ministerie van VROM, DGM/SAS, Den Haag
3. Dr. T. Crommentuijn - Ministerie van VROM, DGM/BWL, Den Haag
4. Dr. D. Jonkers – Ministerie van VROM, DGM/BWL, Den Haag
5. Dr. F. van Assche – IZRO, Brussel
6. Dr. K. Delbeke – European Copper Institute, Brussel
7. Dr.Ir. C. van Gestel – Vrije Universiteit, Amsterdam
8. Dr. A.M.C.M. Pijnenburg – RIKZ, Den Haag
9. Dr. Ir. P. Römkens – Alterra, Wageningen
10. Dr. I. Schoeters – European Copper Institute, Brussel
11. Dr. E. Smolders – Katholiek Universiteit Leuven, Heverlee
12. Dr. E. Sneller – RIZA/WSC, Lelystad
13. Prof. Dr. N. van Straalen – Vrije Universiteit, Amsterdam
14. Dr. E. Temminghof – LUW, Vakgroep Bodemkunde en Plantevoeding, Wageningen
15. Dr. W.J.M. van Tilborg – VTBV, Rozendaal
16. Dr.Ir. J.P.M. Vink – RIZA/WSC, Lelystad
17. Dr. Ir. W. de Vries – Alterra, Wageningen
18. Dr. J. van Wensem – TCB, Den Haag
19. Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
20. Directie RIVM
21. Directeur sector VEM, Dr.Ir. G. de Mik
22. Hoofd Laboratorium LER, Drs. J.H. Canton
23. Dr. P. van Beelen – RIVM/LER
24. Dr. J. Bodar – RIVM/SEC
25. Dr. M. Janssen – RIVM/CEC
26. Ir. J. Lijzen – RIVM/LER
27. Dr. D. van de Meent – RIVM/LER
28. Dr. R. Ritsema – RIVM/LAC
29. Dr. D. Sijm – RIVM/SEC
30. Drs. T. Traas – RIVM/SEC
31. Dr. E. Verbruggen – RIVM/SEC
32. SBC/Communicatie
33. Bureau Rapportenregistratie
34. Bibliotheek RIVM
35. – 38. Auteurs
39. – 44. Bureau Rapportenbeheer
45. – 55. Reserve exemplaren