

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 719102 013

Ontwikkeling van sedimenttoxiciteits-toetsen;
III: Een voorlopige kweekmethode voor en toxiciteits-
toets met de oligochaete worm *Branchiura
sowerbyi*

C.J. Roghair en M.A.H. Wolters

september 1993

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Directoraat-Generaal voor Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling en Directie Bodem, ten behoeve van het Speerpuntprogramma Bodemonderzoek onder project nr. 719102, Eco-effecten.

VERZENDLIJST

| | |
|-------|---|
| 1- 4 | Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling |
| 5- 8 | Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Bodem |
| 9 | Directeur-Generaal Milieubeheer, ir. M.E.E. Enthoven |
| 10 | Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, dr.ir. B.C.J. Zoeteman |
| 11 | Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, mr. G.J.R. Wolters |
| 12-13 | Directeur PCBB |
| 14 | Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie |
| 15-16 | Drs. C. van de Guchte, RIZA, Lelystad |
| 17-18 | Mw. drs. R.N. Hooftman, IMW-TNO, Delft |
| 19-20 | Dr. P.F.M. Verdonshot, DLO-IBN, Leersum |
| 21 | Dr. P. Leeuwangh, Staringcentrum, Wageningen |
| 22 | Prof.dr. W.C. Turkenburg, Vakgroep NWS, RUU, Utrecht |
| 23 | Directie RIVM |
| 24 | Sectordirecteur Stoffen en Risico's, dr.ir. G. de Mik |
| 25 | Adviescentrum Toxicologie, t.a.v. mw. drs. A.G.A.C. Knaap |
| 26-30 | Laboratorium voor Ecotoxicologie, t.a.v. prof.dr. H.A.M. de Kruijf |
| 31 | Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations |
| 32-33 | Auteurs |
| 34 | Bureau Projecten- en Rapportenregistratie |
| 35-36 | Bibliotheek RIVM |
| 37 | Bibliotheek RIVM, depot ECO/LWD |
| 38 | Depot ECO |
| 39-40 | Archief ECO/AET |
| 41-50 | Reserve-exemplaren |

INHOUDSOPGAVE

| | |
|--|----|
| Verzendlijst | i |
| Inhoudsopgave | ii |
| Abstract | vi |
| Samenvatting | 1 |
| 1. Inleiding | 2 |
| 2. <i>Branchiura sowerbyi</i> (Tubificidae) | 4 |
| 2.1 Keuze voor <i>Branchiura sowerbyi</i> | 4 |
| 2.2 Biologische kenmerken | 5 |
| 2.3 Voorkomen | 7 |
| 3. Ontwikkeling van een toetsmethode met behulp van ethyl-chloorpyrifos | 9 |
| 3.1 Inleiding | 9 |
| 3.2 Materiaal en methoden | 10 |
| 3.2.1 Toetsorganisme | 10 |
| 3.2.2 Toetsstof, verdunningen en analyses | 11 |
| 3.2.3 Bereiding toetssystemen | 12 |
| 3.2.4 Toetsmethoden | 14 |
| 3.2.5 Berekeningen en statistische analyse | 15 |
| 3.3 Resultaten | 16 |
| 3.3.1 Experimenten met DSW | 17 |
| 3.3.2 Experiment met sediment | 22 |
| 3.4 Discussie | 24 |
| 3.4.1 Methodiek | 24 |
| 3.4.2 Gevoeligheid van de wormen | 28 |
| 3.5 Conclusies | 29 |
| 4. Methodebeschrijving: Bepaling van de toxiciteit met behulp van <i>Branchiura sowerbyi</i> | 31 |
| 4.1. Inleiding | 31 |
| 4.1.1 Doel | 31 |
| 4.1.2 Principe | 31 |
| 4.1.3 Doelgroep | 31 |
| 4.1.4 Veiligheid | 31 |
| 4.1.5 Methodiek | 31 |
| 4.2 Media en hulpmaterialen | 32 |
| 4.3 Biologisch materiaal | 32 |
| 4.4 Apparatuur en glaswerk | 32 |
| 4.5 Experimentele uitvoering | 33 |
| 4.5.1 Blootstelling in standaardwater | 33 |
| 4.5.2 Blootstelling in sediment | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.5.3 | Toxicologische observaties | 38 |
| 4.6 | Berekeningen en statistische analyse | 39 |
| 4.6.1 | Berekening van de LC50 en EC50 | 39 |
| 4.6.2 | Bepaling van de NOLC en NOEC | 40 |
| 4.7 | Herhaling experiment | 40 |
| 5. | Onderzoek ter verbetering van de kweekmethode | 41 |
| 5.1 | Inleiding | 41 |
| 5.2 | Materiaal en methoden | 41 |
| 5.2.1 | Organismen | 41 |
| 5.2.2 | Media | 42 |
| 5.2.3 | Experimentele methoden | 42 |
| 5.2.4 | Statistische analyse | 42 |
| 5.3 | Resultaten | 42 |
| 5.3.1 | Experiment 91/P061: kweekmedium, verversing en voedsel | 42 |
| 5.3.2 | Experiment 91/P076: benodigd aantal wormen of cocons | 43 |
| 5.3.3 | Experiment 91/P085: kweekmedium | 44 |
| 5.3.4 | Experiment 92/P001: optimale dichtheid van de wormen | 44 |
| 5.3.5 | Experiment 92/P023: kweekmedium | 45 |
| 5.3.6 | Experiment 92/P024: kweekmedium en voedsel | 46 |
| 5.4 | Discussie | 46 |
| 5.5 | Conclusies | 47 |
| 6. | Methodebeschrijving: Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van <i>Branchiura sowerbyi</i> | 48 |
| 6.1 | Inleiding | 48 |
| 6.1.1 | Doel | 48 |
| 6.1.2 | Principe | 48 |
| 6.1.3 | Doelgroep | 48 |
| 6.1.4 | Methodiek | 48 |
| 6.2 | Media en hulpmaterialen | 48 |
| 6.3 | Biologisch materiaal | 49 |
| 6.4 | Apparatuur en glaswerk | 49 |
| 6.5 | Procedure | 50 |
| 6.5.1 | Algemeen | 50 |
| 6.5.2 | Kweekmedium | 50 |
| 6.5.3 | Onderhoud van de kweek | 51 |
| 6.6 | Kwaliteitscontrole | 52 |
| 7. | Referenties | 54 |

| Tabellen | | |
|----------|---|----|
| 1. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een acute toxiciteits-experiment met <i>B. sowerbyi</i> in DSW; 1e experiment, code 91/P023. | 57 |
| 2. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een toxiciteits-experiment met <i>B. sowerbyi</i> in DSW; 2e experiment, code 91/P064. | 58 |
| 3. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een toxiciteits-experiment met <i>B. sowerbyi</i> in sediment; code 91/P026. | 59 |
| 4. | Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leeftijd > 5 maanden. | 60 |
| 5. | Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leeftijd 5 maanden. | 62 |
| 6. | Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leeftijd 2,5 maand. | 66 |
| 7. | Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P064: wormen niet gevoerd. | 68 |
| 8. | Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P064: wormen gevoerd. | 72 |
| 9. | Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met <i>B. sowerbyi</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in een sediment/water-systeem; code 91/P026. | 76 |
| 10. | Gemeten CPF-concentraties in bovenstaand water (C_w) en sediment (C_s) direct na verversen (dag 0) en voor de volgende verversing (dag 7) in het experiment met sediment; code 91/P026. | 79 |
| 11. | Gemeten minimum- en maximum-waarden van nitriet (in mg N-NO ₂ /l), nitraat (in mg N-NO ₃ /l), ammonium (in mg N-NH ₄ /l) en chloride (in mg Cl/l) in bovenstaand water van de sediment/water-systemen (code 91/P026). Tevens is de berekende ammoniak-concentratie vermeld (in mg NH ₃ /l). | 80 |
| 12. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: medium, verversing en voeding; code 91/P061. | 81 |
| 13. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: benodigd aantal wormen of cocons; code 91/P076. | 82 |
| 14. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: samenstelling van het kweekmedium; code 91/P085. | 83 |
| 15. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: | 84 |

| | | |
|----------|---|-----|
| | optimale dichtheid van de wormen; code 92/P001. | |
| 16. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: samenstelling van het kweekmedium; code 92/P023. | 85 |
| 17. | Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met <i>B. sowerbyi</i> ter verbetering van de kweekmethode: kweekmedium en voeding; code 92/P024. | 86 |
| 18. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met twee verschillende kweekmedia; code 91/P061. | 88 |
| 19. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende tijdstippen van verversen van het kweekmedium; code 91/P061. | 90 |
| 20. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende soorten voedsel; code 91/P061. | 94 |
| 21. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende dichtheden van de cocons; code 91/P076. | 96 |
| 22. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende dichtheden van de wormen; code 91/P076. | 98 |
| 23. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende kweekmedia; code 91/P085. | 100 |
| 24. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende dichtheden van de wormen; code 92/P001. | 104 |
| 25. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende kweekmedia; code 92/P023. | 106 |
| 26. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met twee verschillende kweekmedia; code 92/P024. | 108 |
| 27. | Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met <i>B. sowerbyi</i> met verschillende soorten voedsel; code 92/P024. | 109 |
| | | |
| Figuren | | |
| 1. | Schematische weergave van de bereiding van de sediment/water-systemen. | 112 |
| | | |
| Bijlagen | | |
| 1. | Samenstelling van Dutch Standard Water (DSW). | 115 |
| 2. | Voorbehandeling en karakteristieken van het Schoonrewoerdse Wiel-sediment (SW). | 116 |

ABSTRACT

Research on the benthic oligochaete worm *Branchiura sowerbyi* is carried out as part of a project to develop a set of sediment toxicity tests. In the report the choice of *B. sowerbyi* as a potential test species is illustrated. An interim toxicity test method is presented which is based on experiments with the model compound ethyl-chloropyriphos. *B. sowerbyi* can be cultured in the laboratory. An interim culture method is reported as well as the experiments carried out to improve the culture method. Further research with other model compounds in order to improve the toxicity method will be reported in a coming report.

SAMENVATTING

In het kader van het Speerpuntprogramma Bodemonderzoek worden ecotoxicologische toetsen ontwikkeld ter beoordeling van de kwaliteit van (water)bodems. Op het RIVM wordt een toxiciteitstoets ontwikkeld met de benthische oligochaet *Branchiura sowerbyi*. Onderliggend rapport beschrijft een ontwikkelde kweekmethode voor en toxiciteitstoetsen in standaardwater en sediment met *B. sowerbyi*.

De ontwikkelde kweek- en toetsmethoden voldeden aan een aantal eisen welke gesteld worden aan een breed toepasbare methodiek. *B. sowerbyi* komt in Nederland voor en is makkelijk te kweken in het laboratorium. De tot nu toe uitgevoerde experimenten met ethyl-chloorpyrifos volgens de beschreven toetsmethoden waren eenvoudig uit te voeren binnen een korte periode, de controle mortaliteit was laag. Verwacht wordt dat zowel de kweek- als de toetsmethoden grootendeels standaardiseerbaar zijn.

De in dit rapport beschreven kweekmethode geeft voldoende wormen voor de instandhouding van de kweek als ook voor uitvoering van toxiciteitsexperimenten. De beschreven toetsmethoden zijn uitgevoerd met één teststof, nl. met de modelstof ethyl-chloorpyrifos (CPF). *B. sowerbyi* is gevoelig voor CPF, de nominale NOEC in DSW is vastgesteld op 1,0 µg/l en de nominale NOEC voor het kunstmatig belaste sediment/water-systeem is vastgesteld op 10 mg/kg ds.

Aan de optimalisering van de kweek- en toetsmethoden wordt momenteel nog aandacht besteed, onder andere door het gebruik van andere modelstoffen dan CPF. Op basis van dit aanvullend onderzoek zullen de hier beschreven methoden verbeterd worden.

1. INLEIDING

In het kader van het Speerpuntprogramma Bodemonderzoek werd in samenwerking met RIZA en IMW-TNO een onderzoeksproject gestart onder de titel "Ontwikkeling en evaluatie van biologische toetsystemen ter beoordeling van (verontreinigde) waterbodems". Doel van dit project is de beschikking te hebben over een pakket toetsmethoden voor de beoordeling van risico's voor waterbodembewonende organismen. De methoden bestaan uit kortdurende en langdurende toetsen met verschillende organismen waarbij de matrix gevormd wordt door zowel sediment/water als poriewater.

Als een van de mogelijk bruikbare toetsorganismen werd gekozen voor een aquatische oligochaete worm. Een groot aantal soorten is sediment-bewonend en "eet" zich een weg door het sediment. Door dit gedrag kunnen deze wormen in relatief grote mate blootgesteld worden aan in het sediment aanwezige contaminanten. Oligochaeten hebben een functie in de decompositie van organisch materiaal maar dienen ook als voedsel voor bijvoorbeeld vissen. Onder andere door hun voorkomen in grote aantallen vormen de oligochaeten een essentieel onderdeel van aquatische voedselkringlopen. Naast deze overwegingen spelen twee andere aspecten een rol in de keuze voor potentieel toetsorganisme. Oligochaeten hebben een relatief groot gewicht per worm waardoor het mogelijk is om concentraties van chemische stoffen in de worm te bepalen. Het tweede aspect is het typische bouwplan van oligochaeten gezien naast dat van de meer bekende toetsorganismen als muggelarven, watervlooien en vissen. Beide aspecten kunnen van belang zijn bij het uitvoeren van risico-analyses.

De doelstelling van het hier gerapporteerde onderzoek was drieledig:

- Selecteren van een species welke bruikbaar kan zijn als toetsorganisme ten behoeve van risicobeoordelingen.
- Beoordelen of de gekozen species bruikbaar is als toetsorganisme.
- Ontwikkelen van een toxiciteitsmethode en zo mogelijk een kweekmethode met de gekozen species.

Als soort is de keuze gevallen op *Branchiura sowerbyi*. In hoofdstuk 2 wordt deze keuze toegelicht. Op basis van enkele pilot-experimenten werd besloten om met deze soort zowel een toets- als een kweekmethode te ontwikkelen. Onderliggend rapport beschrijft de voorlopige toxiciteitsmethode met (hoofdstuk 4) en de voorlopige kweekmethode voor (hoofdstuk 6) *Branchiura sowerbyi*. De experimentele onderbouwing van de toxiciteitsmethode is beschreven in hoofdstuk 3, die van de kweekmethode in hoofdstuk 5. De methodieken zijn geschreven in de vorm van Standard Operating Procedures (SOPs).

De toxiciteitsmethode zoals in dit rapport beschreven, is voornamelijk gebaseerd op onderzoek met de modelstof ethyl-chloorpyrifos. Met deze methode zijn inmiddels nog drie andere modelstoffen getoetst. Na evaluatie van de resultaten met de vier modelstoffen zal een voorstel voor een standaard toxiciteitsmethode met *B. sowerbyi* worden gedaan. Ten aanzien van de kweekmethode wordt geprobeerd of deze nog verder geoptimaliseerd kan worden, dat wil zeggen meer opbrengst met minder tijdsinspanning.

2. *BRANCHIURA SOWERBYI* (Tubificidae)

2.1 Keuze voor *Branchiura sowerbyi*

Ten behoeve van de keuze van een oligochaeten-soort werden de volgende criteria opgesteld:

- sediment-bewoner,
- zoetwater-soort,
- relatief veel biomassa zodat ook interne concentraties van contaminanten kunnen worden bepaald,
- reproductie door middel van cocons zodat eventueel reproductie als toxiciteits-criterium kan worden gebruikt,
- relatief gevoelig voor contaminanten, en
- kweekbaar in het laboratorium.

B. sowerbyi voldoet aan deze criteria zoals ook enige andere soorten aan alle criteria leken te voldoen. Twee praktische overwegingen om *B. sowerbyi* te kiezen waren de volgende:

- Levende exemplaren van *B. sowerbyi* zijn met behulp van een binoculair te herkennen aan de kieuwen aan het einde van het lichaam, in tegenstelling tot veel andere aquatische oligochaeten die alleen op geslachtskenmerken gedetermineerd kunnen worden (Brinkhurst, 1971). Dit maakt het opzetten van een kweek in het laboratorium gemakkelijker.
- Uit onderzoek van Verdonschot (niet gepubliceerd) waren vindplaatsen van *B. sowerbyi* bekend. In Overijssel werd *B. sowerbyi* alleen in relatief schone beken aangetroffen. Hiermee wordt overigens niet gesuggereerd dat *B. sowerbyi* onder invloed van chemische verontreinigingen verdwijnt. In het algemeen geldt dat de kwantiteit en kwaliteit van het aanwezige organisch materiaal van groter belang is voor het voorkomen van tubificiden dan bepaalde fysische en chemische parameters (Brinkhurst and Cook, 1974).

De soort komt in het algemeen voor in stilstaande tot zwak stromende grotere wateren (Verdonschot, pers. comm.).

B. sowerbyi reproduceert door het afzetten van cocons waaruit later jonge wormen komen. Hierdoor is het mogelijk om reproductie als een afzonderlijk toxicologisch criterium te bestuderen.

Een andere overweging voor de keuze van *B. sowerbyi* is dat met deze soort al enige ervaring opgedaan is in toxicologisch onderzoek (Naqvi, 1973; Chapman and Brinkhurst, 1984; Casellato and Negrisola, 1989; Chapman et al., 1982).

Op basis van pilot-experimenten bleek dat het mogelijk is om deze soort in het laboratorium te houden en zich te laten reproduceren.

Met de keuze van *B. sowerbyi* is aan twee belangrijke criteria voldaan die gesteld werden aan de te ontwikkelen toetsen (Roghair et al., 1991):

- De keuze van toetsorganismen dient primair gebaseerd te zijn op hun ecologische relevantie voor Nederlandse aquatische ecosystemen.
- De toetsorganismen moeten in principe in het laboratorium te kweken zijn. Indien dit niet mogelijk is, moeten de organismen eenvoudig uit het veld kunnen worden betrokken en goed houdbaar zijn in het laboratorium.

2.2 Biologische kenmerken

B. sowerbyi is ontdekt en benoemd door Frank E. Beddard (Beddard, 1892). De soort viel op door een ongewoon sterke contractiliteit van het lichaam. In zijn artikel heeft Beddard (1892) de ontdekkingen beschreven die hij aan enkele exemplaren deed. Zijn onderzoek bevatte een studie van de levende wormen als ook een histopathologisch onderzoek.

B. sowerbyi kenmerkt zich door tientallen paren kieuwen die segmentsgewijs zijn gerangschikt en zichtbaar zijn als dorsale en ventrale uitsteeksels aan het posteriore einde van de worm. De lengte van de kieuwen is variabel. De langste kieuwen bevinden zich in het midden van de kieuw-segmenten en deze kunnen een lengte hebben die vele malen de doorsnede van de worm is (Beddard, 1892). Kawaguti (1936) heeft aangetoond dat het kieuw-gedeelte van *B. sowerbyi* als ademhalingsorgaan mag worden

beschouwd. Het bloedpigment van *B. sowerbyi* is een hemoglobine (Van Hoven, 1975; Kawaguti, 1936). Onder andere Van Hoven (1975) heeft de zuurstofpreferentie van *B. sowerbyi* bepaald. Uit dit onderzoek bleek dat *B. sowerbyi* niet alleen hemoglobine gebruikt voor de binding en transport van zuurstof maar dat diffusie van zuurstof in plasma ook een belangrijke rol speelt. Ten behoeve van het basale metabolisme heeft *B. sowerbyi* zuurstofdruk van tenminste 20 mm Hg nodig. In een gradient-kamer geeft de worm voorkeur aan zuurstofdrukken van 100 mm Hg en hoger. Volgens Aston (1966) stopt *B. sowerbyi* met het opnemen van voedsel als zuurstofconcentraties lager worden dan 22% van de verzadigingswaarde bij 20 °C (2,0 mg/l). *B. sowerbyi* kan een anoxische omgeving gedurende 6 dagen overleven (Chapman et al., 1982). Brinkhurst en Jamieson (1971) concludeerden op basis van het werk van diverse auteurs dat *B. sowerbyi* in staat is een grotere range aan milieucondities te doorstaan dan vele andere zoetwater-tubificiden.

De kieuwen van *B. sowerbyi* zijn met het blote oog duidelijk zichtbaar. Dergelijke uitsteeksels aan het lichaam met een respiratoire functie komen eveneens voor bij de Opistocystidae, veel Naididae en *Phreodrilus branchiatus* (Phreodrilidae) (Brinkhurst en Jamieson, 1971).

Een ander opvallend kenmerk van *B. sowerbyi* is het bezit van een uitgebreid netwerk van integumentale bloedcapillairen (Beddard, 1892). Als regel komt een integumentale bloed-plexus niet voor bij aquatische oligochaeten. *B. sowerbyi* heeft dorsale en ventrale bloedvaten die van het ene einde naar het andere einde van de worm lopen. Alleen het dorsale vat en de circumoesophageale ringen die het dorsale vat met het ventrale vat verbinden, zijn contractiel (Beddard, 1892).

Het prostomium van *B. sowerbyi*, de kop, is konisch, kort en afgerond van vorm (Beddard, 1892).

Als andere oligochaeten is *B. sowerbyi* hermafrodit. Sexueel rijpe wormen zijn te herkennen aan de melkwitte kleur van enkele segmenten aan de anteriore zijde van het lichaam. *B. sowerbyi* produceert cocons met daarin een of meerdere eieren. Ook wat betreft de voortplantingsorganen onderscheidt *B. sowerbyi* zich van andere Tubificidae.

Beddard (1892) heeft zijn bevindingen uitgebreid beschreven. In Brinkhurst en Jamieson (1971) zijn de voortplantingsorganen eveneens beschreven. Waarnemingen aan de reproductieve periode van *B. sowerbyi* onder veldomstandigheden zijn onder andere beschreven door Casellato (1984) en Sobhana and Balakrishnan Nair (1984).

Vergeleken met andere soorten is *B. sowerbyi* een relatief grote worm die in het adulte stadium een lengte van 7,5 tot 10 cm kan hebben.

2.3 Voorkomen

B. sowerbyi is een cosmopolite soort (Brinkhurst and Jamieson, 1971). Brinkhurst en Cook (1974) noemen *B. sowerbyi* een exotische soort die geïntroduceerd is in Europa en Noord Amerika vermoedelijk via tropische kassen en botanische tuinen. De soort werd door Beddard (1892) ontdekt in de "Victoria regia vijver" van de Royal Botanical Society's Gardens, Regent's Park, Londen.

In het kader van dit project is geen onderzoek verricht naar het voorkomen van *B. sowerbyi* in Nederland. Bekend is echter wel dat *B. sowerbyi* in Overijssel voorkomt in relatief schone beken (Verdonschot, pers. comm.). Eveneens is *B. sowerbyi* in grote aantallen gesignaleerd in het Haringvliet.

In de literatuur zijn enige gegevens bekend over de voorkeur van *B. sowerbyi* betreffende enkele omgevingsfactoren.

Chapman et al. (1982) bestudeerden onder meer pH-, temperatuur- en saliniteit-toleranties van diverse aquatische oligochaeten. Voor *B. sowerbyi* vonden zij de volgende 96-uurs LC50 waarden voor situaties zonder en respectievelijk met sediment: lage pH: 3,7 en 2,5; hoge pH: 10,5 en 11,3; temperatuur: 35 en 35 °C; saliniteit: 7,5 en 12 ‰.

Uit een studie van Aston and Milner (1981/1982) blijkt dat overleving, reproductie en groei van *B. sowerbyi* beter is in een medium dat bestaat uit organisch materiaal en (fijn) zand of modder dan in een medium dat vrijwel volledig bestaat uit organisch materiaal of uit zand.

In het algemeen komen tubificiden voor in sedimenten (in tegenstelling tot vrijzwem-

mend in de waterlaag) waar ze zich grotendeels voeden met bacteriën. Sedimenten met een grote hoeveelheid organisch materiaal genieten de voorkeur van tubificiden. De zuurstof-arme omgeving wordt daarbij goed verdragen (Brinkhurst and Cook, 1974).

3. ONTWIKKELING VAN EEN TOETSMETHODE MET BEHULP VAN ETHYL-CHLOORPYRIFOS

3.1 Inleiding

Om ervaringen te verkrijgen met *Branchiura sowerbyi* als toetsorganisme in toxiciteits-experimenten werden twee experimenten ontworpen. Beiden dienden om de acute toxiciteit, uitgedrukt als LC50, vast te stellen. Het eerste experiment werd in Dutch Standard Water (DSW) uitgevoerd, het tweede in een sediment/water-systeem. De experimenten hadden als belangrijkste doelstellingen:

- vaststellen van het type effecten dat *B. sowerbyi* onder invloed van een toxische stress kan vertonen,
- inzicht verkrijgen in de aard en het voorkomen van niet-concentratie-gerelateerde effecten, en
- beoordelen van de praktische uitvoerbaarheid van toxiciteitsexperimenten met *B. sowerbyi*.

Daarnaast werd beoogd enig inzicht te verkrijgen in de gevoeligheid van jonge, kleine dieren versus die van oudere, grotere dieren.

Na uitvoering van de twee experimenten werd besloten om een derde experiment, in Dutch Standard Water, uit te voeren. Met dit experiment werd tevens beoogd inzicht te verkrijgen in het effect van al of niet voeren van de wormen tijdens de blootstelling.

De experimenten werden uitgevoerd om een voorlopige toetsmethode te ontwikkelen met *B. sowerbyi* als toetsorganisme. Er is rekening gehouden met twee criteria welke van belang werden geacht voor het met succes ontwikkelen van een toxiciteitstoets (Roghair et al., 1991):

- De toetsduur dient beperkt te zijn tot maximaal enkele weken.
- De toetsen dienen bij voorkeur relatief eenvoudig van uitvoering en standaardiseerbaar te zijn.

3.2 Materiaal en methoden

De volgende typen experimenten werden uitgevoerd (in chronologische volgorde):

- Bepaling van de acute toxiciteit voor *B. sowerbyi* in Dutch Standard Water; code 91/P023.
- Bepaling van de toxiciteit voor *B. sowerbyi* in een sediment/water-systeem; code 91/P026.
- Bepaling van de toxiciteit voor *B. sowerbyi* in Dutch Standard Water; code 91/P064.

3.2.1 Toetsorganisme

De experimenten werden uitgevoerd met de oligochaet *Branchiura sowerbyi*. De dieren werden in ons laboratorium gekweekt. In experiment 91/P023 werden ook dieren uit het veld gebruikt (Soestwetering, ten zuiden van Zwolle, Overijssel).

De in de experimenten gebruikte oligochaeten zijn onder gecontroleerde omstandigheden gehouden en gekweekt. De methode was echter experimenteel van aard: de samenstelling van het medium, het verversen van het medium, de voeding en het aantal wormen per kweekvat is aan verandering onderhevig geweest.

De dieren werden gehouden in 3 liter-bekerglazen gevuld met een sedimentlaag waarboven een laag Dutch Standard Water (DSW, zie Bijlage 1). Het water werd belucht met behulp van bruissteentjes. Het sediment was een mengsel van zilverzand M32 en bewerkt sediment uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW; voor karakteristieken en bewerking, zie Bijlage 2). De verhouding op volumebasis was 35% zilverzand, 15% SW-sediment en 50% DSW (91/P023 en 91/P026) of 37,5% zilverzand, 12,5% SW-sediment en 50% DSW (91/P064). De dieren werden 1 x per 14 dagen gevoerd met gedroogde koemest en ontbonden, onbespoten sla (bij latere experimenten werd dit 2-6 x per 14 dagen). Het aantal wormen per kweekvat varieerde van ca. 100 tot ca. 800. De temperatuur van de kweekkamer bedroeg 23 +/- 2 °C.

De in de experimenten gebruikte oligochaeten verschilden in leeftijd en grootte van elkaar (zie de Tabellen 1, 2 en 3). De dieren waren nog niet in een reproductieve fase.

3.2.2 Toetsstof, verdunningen en analyses

De experimenten werden uitgevoerd met ethyl-chloorpyrifos (CPF) van Riedel de Haën, batch nr. 91840 (91/P023 en 91/P026) of batch nr. 00750 (91/P064), zuiverheid 99%. CPF werd opgelost in DSW nadat eerst een geconcentreerde oplossing gemaakt was in het oplosmiddel tertiair-butylalcohol (TBA) van Merck, nr. 9629, zuiverheid $\geq 99,5\%$. Aan dit TBA was 1% demiwater toegevoegd om stolling bij 20 °C te voorkomen.

DSW werd gebruikt als verdunningswater voor het bereiden van de concentratiereeksen in de DSW-experimenten en om sediment/water-suspensies te maken in het experiment met sediment.

Bij alle experimenten werd een stock gemaakt van CPF in TBA. Bij de experimenten in DSW werd een tweede stock gemaakt in DSW. Deze tweede stock werd, evenals de toetsconcentraties boven 1,0 mg/l, voor gebruik 3 uur geroerd op een magneetroeder.

In de DSW-experimenten was een gelijke concentratie van 100 μl TBA/l (91/P023) of 50 μl TBA/l (91/P064) in de toetsoplossingen aanwezig. Ten behoeve van het sediment-experiment werden zodanig stocks van CPF in TBA bereid dat in de toetssystemen uiteindelijk gelijke hoeveelheden TBA aanwezig waren van 100 μl TBA/l sediment/water-systeem.

Van de experimenten zijn matrix-monsters geanalyseerd door het Staringcentrum ter bepaling van het CPF-gehalte. De monsters zijn in duplo genomen van een beperkt aantal concentraties, zowel na verversen als voor de volgende verversing.

Monsters van de DSW-oplossing (200 ml) en van bovenstaand water (100 ml; sediment-experiment) werden geëxtraheerd met hexaan (40 resp. 20 ml) door 2 minuten krachtig met de hand te schudden. Afhankelijk van de concentratie aan CPF werd een verdunning van de hexaanfractie gemaakt.

Nat sediment (25 gram) werd verdund met demiwater (25 ml) en vervolgens geëxtraheerd met hexaan (50 ml) waaraan 1 vol% aceton was toegevoegd, door 2 uur te schudden op een schudmachine. Het geheel werd vervolgens gecentrifugeerd bij 2500 r.p.m. waarna, afhankelijk van de concentratie CPF, een verdunning van de hexaanfractie werd gemaakt. Aan een bekende hoeveelheid hexaan werd 50 μl keeper (1 mg/ml butylstearaat in hexaan) toegevoegd. Dit werd vervolgens gedroogd met behulp

van een stikstofstroom in een waterbad bij 40 °C. Het residu werd opgelost in 1 ml hexaan.

Detectie van het CPF vond plaats met een gaschromatograaf met NP-detector. De kolom was een Widebore CP Sil 5 kolom van 25 m lengte. Het injectievolume bedroeg 3 µl.

Kwantificering vond plaats door het integratorsignaal van de piek in het monster te vergelijken met die van standaard-injecties van vergelijkbare concentraties. De gemiddelde recovery in hexaan was 100 +/- 2,8 % (n = 13).

In het experiment met sediment zijn de gehalten van nitriet, nitraat, ammonium en chloride bepaald op verschillende tijdstippen in verschillende concentratie-groepen. Deze analyses werden uitgevoerd door de afdeling Fysische en Chemische Technieken van het Laboratorium voor Ecotoxicologie van het RIVM. Nitriet-, nitraat- en ammonium-gehalten zijn fotometrisch bepaald met behulp van een auto-analyzer. Nitriet en nitraat zijn bepaald volgens methoden onder andere beschreven in Standard Methods (1980a). Ammonium is bepaald volgens een methode beschreven door Verdouw et al. (1978). Chloride werd bepaald volgens een potentiometrische titratie-methode onder andere beschreven in Standard Methods (1980b).

Al het glaswerk dat gebruikt werd bij de experimenten als ook voor de analyses werd gespoeld met aceton van Chemproha Chemicals.

3.2.3 Bereiding toetssystemen

Experimenten met DSW

Het DSW in de experimenten met DSW is bereid zoals in Bijlage 1 is aangegeven.

Experiment met sediment

Voor het experiment met sediment werd voor elke toetsconcentratie een sediment/water-systeem in tweevoud gemaakt. Figuur 1 geeft schematisch weer hoe deze systemen zijn bereid.

Voorbehandeling van het sediment

Sediment uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW) werd bemonsterd onder leiding van het RIZA zoals beschreven in Maas-Diepeveen en Van de Guchte (1990). Dit sediment werd gezeefd over een 500 µm roestvrij-stalen zeef en bestraald met 10 kGy door Gammaster te Ede. Het sediment werd in 3-liter PVC-emmers bewaard bij 4 +/- 2 °C tot gebruik. Bijlage 2 vermeldt enkele analysesresultaten van het SW-sediment.

Belasting met CPF

Van het te gebruiken sediment werd het droge stof-gehalte bepaald. Dit gebeurde door een, gedurende 30 minuten bij 100 °C gedroogd en vervolgens afgekoeld bekersglas te vullen met ca. 50 gram nauwkeurig gewogen nat sediment en dit geheel 24 uur te drogen bij 100 °C. Na een afkoelingsperiode van 10 minuten in een exsicator werd het droge stof-gehalte bepaald door het wegen van het gedroogde sediment. Het sediment dat voor deze experimenten werd gebruikt had een droge stof-gehalte van 14,8 - 16,1%, afhankelijk van de emmer waaruit het sediment kwam.

Een suspensie van 40 gram droge stof per liter (zie Roghair et al., 1991) werd gemaakt door een hoeveelheid homogeen sediment overeenkomend met 40 gram droge stof aan te vullen tot 1,0 liter met DSW en vervolgens te roeren op een magnetische roerder met een glazen roervlo. Voor elke gewenste concentratie werd een dergelijke suspensie gemaakt. Aan elke suspensie werd 100 µl van een stockoplossing van CPF in TBA toegevoegd. De belaste sediment-suspensie werd vervolgens 20 uur geroerd met de glazen roervlo op de magneetroerder.

Bereiding van de sediment/water-systemen

De sediment/water-systemen werden bereid door 250 ml suspensie in een 400 ml-bekersglas te schenken. Per concentratie-groep werden 4 bekersglazen gevuld. Hiervan werden 2 bekersglazen met de suspensies voor 24 uur weggezet bij 23 +/- 2 °C om de sediment-deeltjes uit te laten zakken. De resterende 2 bekersglazen per concentratie-groep werden weggezet bij 4 +/- 2 °C in het donker voor gebruik bij verversen van het medium na 48 uur. Deze koel weggezette bekersglazen werden 24 uur voor gebruik op kamertemperatuur geplaatst. De sediment/water-systemen werden gedurende het experiment nog twee maal bereid. Voor het kunnen bemonsteren van bovenstaand water

en sediment ten behoeve van chemische analyses werden nog enige bekersglazen extra gevuld met suspensie.

3.2.4. Toetsmethoden

Experimenten met DSW

De Tabellen 1 en 2 geven de experimentele omstandigheden en de toxicologische parameters van de experimenten in DSW. De gevolgde methodiek is waar mogelijk gebaseerd op internationale richtlijnen voor toxiciteitstoetsen met *D. magna* en vissen (EG, 1984a en 1984b; OECD, 1984a en 1984b). Hoofdstuk 4 geeft een methodebeschrijving voor het uitvoeren van een toxiciteitstoets die grotendeels gebaseerd is op de in dit hoofdstuk beschreven experimenten.

Met de bedoeling om de acute toxiciteit van ethyl-chloorpyrifos voor *B. sowerbyi* te bepalen werd het eerste DSW-experiment ontworpen met een blootstellingsduur van 1 week. Op basis van de resultaten werd besloten het experiment te herhalen met een duur van 3 weken. Beide concentratiereeksen hadden een rede 3,2 welke gebaseerd is op resultaten van een range-finding experiment. De wormen werden 2 weken (91/P023) of 72 uur (91/P064) voor aanvang van de blootstellingsperiode uit de kweeksituatie, dat wil zeggen uit sediment/water-systemen, gehaald en overgebracht in bekersglazen met DSW om te acclimatiseren aan de proefomstandigheden. Tijdens deze periode werden de wormen in het donker gehouden en niet gevoerd zodat het darmkanaal bij aanvang van de blootstelling vrijwel leeg was. Voor het introduceren van de wormen in de toetsvaten werden de dieren met behulp van een binoculair gecontroleerd op het intact zijn van de kieuwen en het bezitten van een normaal gevormde kop (zie ook hoofdstuk 2). Introduceren en overzetten van de wormen van oud medium naar vers medium gebeurde met behulp van een glazen overzetbuisje met syphon speentje, doorsnede 7 mm en lengte 18 cm.

Experiment met sediment

Tabel 3 geeft de experimentele omstandigheden en de toxicologische parameters van het experiment met sediment/water-systemen. De gevolgde methodiek is waar mogelijk gebaseerd op internationale richtlijnen voor toxiciteitstoetsen met *D. magna* en vissen (EG, 1984a en 1984b; OECD, 1984a en 1984b) evenals op sediment-experimenten met *D. magna* en *C. riparius* (Roghair et al., 1991, 1993). Hoofdstuk 4 geeft een methodebeschrijving voor het uitvoeren van een toxiciteitstoets die grotendeels gebaseerd is op het in dit hoofdstuk beschreven experiment.

Op grond van de resultaten van experiment 91/P023 in DSW werd de duur van dit experiment verlengd tot 3 weken. De concentratiereeks had een rede 3,2. Acclimatisatie van de wormen aan de proefomstandigheden was niet nodig omdat de dieren in een vergelijkbaar medium werden gebracht. Voor introductie in de toetsvaten werden de wormen met behulp van een binoculair gecontroleerd op het intact zijn van de kieuwen en het bezitten van een normaal gevormde kop. Om de wormen te kunnen observeren op de daarvoor bepaalde tijdstippen, werden de dieren met behulp van een fontax-pincet uit de sedimenten gehaald en overgebracht in bovenstaand water van het desbetreffende toetsvat. Nadat observatie had plaatsgevonden werden de dieren met behulp van een overzetbuisje (glas, doorsnede 7 mm, lengte 18 cm) in de verse sediment/water-systemen gebracht.

3.2.5 Berekningen en statistische analyse

Berekening van de EC50 en LC50

De EC50- en LC50-waarden werden berekend met behulp van een gecomputeriseerde versie (Hoekstra, 1989) van de getrimde Spearman-Kärber methode (Hamilton et al., 1977).

Bepaling van de NOEC en NOLC

De NOEC-waarden voor 1) sterfte (NOLC-waarden) en 2) afwijkend uiterlijk en gedrag, werden vastgesteld uit de waargenomen concentratie-effect relaties. Hierbij geldt dat een NOEC een concentratie lager ligt dan de LOEC-waarde. Een concentratie met $\leq 10\%$

effect telt in dit geval als een concentratie zonder effect.

Berekening van de ammoniak-gehalten

Ammoniak-gehalten werden berekend uit gemeten ammonium-concentraties, temperatuur en pH volgens Emerson et al. (1975). Als temperatuur werd de gemiddelde kamertemperatuur genomen. Voor pH en ammonium-gehalte zijn minimale en maximale meetwaarden per concentratie genomen zodat de laagst en hoogst mogelijke ammoniak-concentraties werden berekend.

3.3 Resultaten

In deze paragraaf worden resultaten vermeld vergezeld van een beperkte discussie voor zover het de waarnemingen betreft. Een meer algemene discussie is gegeven in de volgende paragraaf.

De hier gerapporteerde experimenten verkeerden in een pril stadium van methodiek-ontwikkeling. Dit had tot gevolg dat er vele soorten effecten werden waargenomen die in een later stadium, na opdoen van enige ervaring, herkend en gegroepeerd konden worden. De resultaten van de experimenten met CPF (hier gerapporteerd) zijn zodanig getabelleerd dat:

- concentratie - respons relaties en tijd - respons relaties voor verschillende soorten effecten onderscheiden kunnen worden,
- achtergrond-effecten (effecten die geen gevolg van de blootstelling lijken te zijn maar vermoedelijk door andere factoren veroorzaakt worden) of "ruis" zichtbaar wordt gemaakt,
- een vergelijking gemaakt kan worden tussen effecten als gevolg van blootstelling aan CPF en effecten van enkele andere modelstoffen, waarvan de rapportage momenteel plaatsvindt,
- maar waarbij de grote lijnen in de voortgang van het methodiekontwikkelings-onderzoek niet verloren gaan in de veelheid aan waarnemingen (de consequentie hiervan is dat niet alle "raw data" in dit rapport vermeld zijn).

3.3.1 Experimenten met DSW

De Tabellen 4, 5 en 6 geven de resultaten van het eerste experiment met DSW, code 91/P023, voor respectievelijk wormen van ouder dan 5 maanden (serie A), 5 maanden (serie B) en 2,5 maand (serie C). De wormen van 5 maanden en 2,5 maand oud waren van gelijke lengte. Wormen van ouder dan 5 maanden waren groter. Tabel 5 bevat zowel overzichten als detail-informatie met betrekking tot de verschillende soorten waargenomen effecten. Tabel 4 en 6 (oude en jonge wormen) bevatten alleen overzichten.

De volgende effecten werden waargenomen in het experiment. Hierbij is tevens vermeld hoe deze effecten zijn geclusterd en benoemd in de Tabellen 4, 5 en 6. De sterretjes achter de waarnemingen betekenen dat deze effecten ook in het tweede DSW-experiment zijn waargenomen.

Getabelleerd

sterfte

afwijkend gedrag

- verlamd
- in elkaar gerold
- traag
- ongecontroleerde bewegingen

afwijkend uiterlijk

- aan de kop
- aan de kieuwen
- afwijkende lengte

Waargenomen

dood (geen beweging, ontbreken rode kleur, lichaam in ontbonden staat) *

verlamd (geen beweging, soms stuipen)

worm opgerold *

wormen in kluwen gerold *

trage bewegingen *

* contractie van het lichaam (niet in het eerste DSW-experiment waargenomen)

haakvormig uitsteeksel aan kop *

insnoeringen aan anteriore zijde

geen kieuwen aan staart *

kieuwen zeer kort *

slechts enkele kieuwen (afstoten kieuwen) *

lichaam ontbonden aan posterioere zijde *

| | |
|----------------|---|
| | lichaam op kop na ontbonden * |
| - zwellingen | zwellingen in lichaam * |
| | zwellingen in of achter de kop * |
| - insnoeringen | * insnoering in het lichaam (niet in het eerste DSW-experiment waargenomen) |

Het criterium dood is niet makkelijk vast te stellen bij de wormen. Dode wormen ontbinden snel maar het ontbinden van het lichaam vindt al plaats als de wormen nog leven. Dit feit kan een rol hebben gespeeld bij de 96-uurs waarneming van serie B (Tabel 5) waardoor de LC50 bepaald moest worden uit een niet monotoon toenemende concentratie-effect-curve. De volgende waarnemingen (serie B) zijn in Tabel 5 navolgbaar maar gelden ook voor serie A en serie C tenzij anders vermeld. Verlamming als effect lijkt niet op te treden zonder aanwezigheid van andere effecten. In elkaar rollen van de worm lijkt een gevoelig criterium te zijn voor de series B en C maar is in serie A in tegenovergestelde vorm waargenomen: hoge doseringen waren niet in elkaar gerold, lage doseringen wel. Het effect traag lijkt niet toe te nemen in de tijd. Afwijkingen aan de kop kunnen zich blijkbaar herstellen en worden mogelijk niet eenduidig door CPF veroorzaakt. Afwijkingen aan de kieuwen nemen toe met toenemende concentratie en langer durende blootstelling. Echter, na 96 uur werden ook enige afwijkingen in de controle-groepen van serie B waargenomen (Tabel 5). In de A- en C-serie was het effect "afwijkingen aan de kieuwen" eveneens sterk gecorreleerd met toenemende concentratie en blootstellingsduur. Na 96 uur trad deze afwijking ook op in de controle-groepen van de C-serie. Afwijkende lengte heeft een relatie met effecten aan de kieuwen en is wellicht niet als enkel criterium te gebruiken.

Van de waargenomen afwijkingen lijkt de waarneming "afwijkingen aan de kieuwen" een bruikbare parameter. De afwijking werd in alle drie de series waargenomen, was duidelijk gecorreleerd met concentratie en duur van blootstelling en eenduidig te constateren. Het effect sterfte lijkt ook een goede parameter al hoewel deze niet zo eenvoudig is vast te stellen als bijvoorbeeld bij vissen.

Na 96 uur traden effecten op in de controle-groepen van de B- en C-serie. Na 168 uur waren afwijkingen in alle groepen ruim aanwezig. Bij de A-serie zijn de effecten

gerelateerd aan de CPF-concentratie. Met name het niet in elkaar gerold zijn van de wormen is hier als effect waargenomen. De effecten die na 168 uur gescoord werden in de series B en C doen vermoeden dat het op dit tijdstip niet alleen om door CPF veroorzaakte effecten gaat maar dat er ook sprake is van achtergrondeffecten. Deze effecten zijn mogelijk veroorzaakt doordat de dieren al geruime tijd zonder voedsel in een puur waterig medium gehouden werden.

In vergelijking met serie B traden in de oude en grote wormen minder effecten op. De jonge wormen vertoonden iets meer effect dan de B-serie. Dit komt ook tot uitdrukking in de LC₅₀- en NOEC-waarden (op basis van nominale concentraties):

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--|
| 48-uurs LC ₅₀ serie A: | > 2,0 mg/l | (geen 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk) |
| 48-uurs LC ₅₀ serie B: | 1,1 mg/l | (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,89-1,3 mg/l) |
| 48-uurs LC ₅₀ serie C: | 1,1 mg/l | (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,94-1,3 mg/l) |
| 96-uurs LC ₅₀ serie A: | 1,8 mg/l | (geen 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk) |
| 96-uurs LC ₅₀ serie B: | 0,40 mg/l | (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,30-0,53 mg/l) |
| 96-uurs LC ₅₀ serie C: | 0,29 mg/l | (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,20-0,42 mg/l) |
| 72-uurs NOEC serie A: | 0,10 mg/l | |
| 72-uurs NOEC serie B: | 0,010 mg/l | |
| 72-uurs NOEC serie C: | < 0,010 mg/l | |

De zuurstofgehalten waren in vrijwel alle gevallen boven 60% van de verzadigingswaarde van 5,4 mg/l. In de hoge concentraties van serie A kwamen voor verversing van het medium lage zuurstofgehalten voor. De oorzaak hiervan is waarschijnlijk het ontbinden van delen van de wormenlichamen.

De pH-waarden van de series B en C bevonden zich tussen 8,3 en 8,5. De pH-waarden van serie A lagen tussen de 7,5 en 8,5 met een uitzondering van 7,3 in een groep waar de wormen deels ontbonden waren.

De actuele concentraties CPF van de vers bereide media bedroegen 95 +/- 10% (n=4) van de nominale concentraties. De oude media hadden actuele concentraties van 52 +/- 6% (n=4). De gemiddelde actuele CPF-concentratie bedraagt daarmee 73% van de nominale waarden.

De Tabellen 7 en 8 geven de resultaten van het tweede experiment met DSW, code 91/P064, voor wormen die niet, respectievelijk wel gevoerd werden tijdens de blootstelling aan CPF. Beide tabellen geven zowel overzichten als detail-informatie met betrekking tot de verschillende soorten waargenomen effecten.

De effecten in dit experiment zijn vergelijkbaar met die waargenomen in 91/P023. Naast mortaliteit blijken effecten aan de kieuwen duidelijk gecorreleerd te zijn met toenemende blootstellingsduur en concentratie. Trager en ongecontroleerd bewegen is eveneens een gevoelig criterium. Het ongecontroleerd bewegen is hierbij een gevoeliger parameter dan traag. Afwijkingen aan de kop treden met name in de eerste week op. Daarna herstellen de wormen zich grotendeels van dit effect. Aan het einde van de proef komt dit effect ook voor in lagere concentraties maar kan dan niet als concentratie-gerelateerd worden beschouwd. Het effect afwijkende lengte betekent in de praktijk dat de wormen kleiner zijn geworden, vaak door afstoting van delen van het lichaam of sterke contractie van het lichaam. Zwellingen zijn in één dier waargenomen en kunnen dus niet als een bruikbare parameter worden beschouwd. Insnoeringen komen incidenteel in de hogere concentraties voor. Deze beperken zich niet tot alleen achter de kop maar komen over het hele lichaam voor. In dit experiment viel bij hogere concentraties de vorm van het darmkanaal van de wormen op. Dit leek uit smalle schijfjes te bestaan die via nauwe openingen een kanaal vormden. Dit effect trad tegelijkertijd op met ongecontroleerde bewegingen en is daarom niet apart getabelleerd.

Het in de groep zonder voer waargenomen effect 'in elkaar gerold' varieerde per concentratiegroep zodanig in de tijd en ook tussen concentratiegroepen dat niet duidelijk is wat deze observatie betekent. De tendens bestaat dat met toenemende concentratie en met toenemende blootstellingsduur de wormen minder in elkaar rollen. Dit is vergelijkbaar met serie A in experiment 91/P023. Dezelfde tendens werd waargenomen in de groep waar gevoerd werd. De controle-dieren werden gedurende vrijwel het gehele experiment om de sla gerold aangetroffen. De dieren in de lage concentraties werden aanvankelijk eveneens rond de sla gerold aangetroffen terwijl bij langere blootstellingsduur de wormen zich los van de sla gingen bewegen.

Achtergrondeffecten traden met name op in de vorm van afwijkingen aan de kieuwen en alleen in de groep die niet gevoerd werd. In mindere mate kwamen afwijkingen aan

de kop en insnoeringen voor. In de gevoerde groep vertoonde een enkel dier een niet-concentratie-gerelateerd effect. Dit grote verschil met het eerste DSW-experiment werd blijkbaar veroorzaakt door het inkorten van de acclimatisatie-periode van 2 weken tot 3 dagen. Waarschijnlijk draagt het voeren van de dieren ook bij tot vermindering van het percentage achtergrondeffecten. Tot slot kan de leeftijd of lengte (en daarmee gewicht) van de wormen ook een rol spelen. In experiment 91/P064 waren de wormen ca. 6 maanden oud en van vergelijkbare lengte als serie B in experiment 91/P023.

De verschillen tussen de niet-gevoerde groep en de gevoerde groep uitten zich in de aanwezigheid van achtergrondeffecten zoals hierboven is beschreven. De verschillen in gevoeligheid voor CPF waren marginaal. De gevoerde wormen lijken iets gevoeliger te zijn. Dit komt eigenlijk alleen in de NOEC tot uiting (waarden gebaseerd op nominale concentraties):

| | |
|-----------------------------------|--|
| 48-uurs LC ₅₀ - voer: | > 1,0 mg/l (geen 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk) |
| 48-uurs LC ₅₀ + voer: | > 1,0 mg/l (geen 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk) |
| 21-daags LC ₅₀ - voer: | 0,53 mg/l (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,46-0,61 mg/l) |
| 21-daags LC ₅₀ + voer: | 0,61 mg/l (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,54-0,70 mg/l) |
| 21-daags NOLC - voer: | 0,32 mg/l |
| 21-daags NOLC + voer: | 0,32 mg/l |
| 21-daags NOEC - voer: | 0,0032 mg/l |
| 21-daags NOEC + voer: | 0,0010 mg/l |

De zuurstofgehalten waren in alle gevallen boven 60% van de verzadigingswaarde van 5,4 mg/l. De pH-waarden van de niet-gevoerde groep lagen tussen 7,9 en 8,4 met een uitzondering voor de DSW-controle van 7,4. De pH-waarden van de gevoerde groep lagen tussen 8,0 en 8,4.

De actuele concentraties CPF van de vers bereide media bedroegen 86 +/- 34% (n=12) van de nominale concentraties. De oude media hadden actuele concentraties van 55 +/- 15% (n=16; 48 uur na verversen) en 32 +/- 13% (n=8; 72 uur na verversen). De gemiddelde actuele CPF-concentratie bedraagt daarmee 67% van de nominale waarden. Er is geen significant verschil in actuele concentratie van CPF in water tussen de

groepen met en zonder voer.

3.3.2 Experiment met sediment

Tabel 9 geeft de resultaten van het experiment met sediment, code 91/P026. Deze tabel bevat zowel overzichten als detail-informatie met betrekking tot de verschillende soorten waargenomen effecten.

De volgende effecten werden waargenomen in het experiment met sediment. Vermeld is hoe deze effecten zijn geclusterd en benoemd in Tabel 9.

| <u>Getabelleerd</u> | <u>Waargenomen</u> |
|----------------------------|--|
| <i>sterfte</i> | worm niet teruggevonden in sediment |
| <i>afwijkend gedrag</i> | |
| - in elkaar gerold | worm opgerold (als groep in kluwen) |
| - traag | trage bewegingen |
| <i>afwijkend uiterlijk</i> | |
| - aan de kop | haakvormig uitsteeksel aan kop |
| - aan de kieuwen | geen kieuwen aan staart kieuwen zeer kort |
| - afwijkende lengte | lichaam ontbonden aan posterioere zijde |
| - insnoeringen | insnoering in het lichaam |
| - bloedingen | bloedingen in lichaam |

In dit experiment werden alle wormen die niet teruggevonden werden bij een scoring als dood beschouwd. In sediment vindt snelle ontbinding plaats van dode dieren. De correlatie van sterfte met concentratie CPF en blootstellingstijd werd in dit experiment vertroebeld door de achtergrondsterfte in de lagere concentraties en het niet monotoon stijgend percentage sterfte. In dit experiment kwam het in elkaar gerold zijn van de wormen bij scoring als een duidelijk concentratie-gerelateerd effect naar voren. Traagheid leek niet toe te nemen bij langer durende blootstelling. Enkele wormen in de 320 mg/kg ds-groep leken zich te herstellen van effecten aan de kop zoals ook in de

DSW-experimenten werd waargenomen. Effecten op de kieuwen kwamen ook in dit experiment voor. De relatie met concentratie en blootstellingstijd was echter niet zo sprekend als in de DSW-experimenten. Bij sommige wormen zonder kieuwen werd het lichaam aan posterioere zijde afgestoten. Incidenteel en niet-concentratie-gerelateerd werd een insnoering of een bloeding waargenomen.

De gevoeligste parameter in dit experiment was het in elkaar gerold zijn van de wormen. Traagheid en effecten op de kieuwen lijken eveneens geschikt als sublethale parameters.

Opmerkelijk was dat bij de scoring na twee en na drie weken bleek dat wormen die nog kieuwen bezaten (dus met name de controle- en lage concentratie-groepen) een dichtere kieuw-structuur bezaten dan bij aanvang van de blootstelling. Dit is niet als toxisch effect beschouwd omdat inmiddels de ervaring is opgedaan dat bij lage zuurstofconcentraties de kieuw-structuur van de wormen dichter wordt en de kieuwen langer.

Zoals hierboven al is vermeld trad in dit experiment niet-concentratie-gerelateerde sterfte op met een maximum van 20% na 3 weken blootstelling. Na 48 uur blootstelling werden enige niet-concentratie-gerelateerde effecten op de kieuwen waargenomen met een maximum van 40%.

In dit experiment werden de volgende toxiciteitscriteria vastgesteld (waarden gebaseerd op nominale concentraties):

| | | |
|-----------------------------|-----------------|---|
| 48-uurs LC ₅₀ : | > 1000 mg/kg ds | (geen 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk) |
| 21-daags LC ₅₀ : | 74 mg/kg ds | (95% betrouwbaarheidsinterval: 49-110 mg/kg ds) |
| 21-daags NOLC: | 32 mg/kg ds | |
| 21-daags NOEC: | 10 mg/kg ds | |

De zuurstofgehalten waren in dit experiment zeer laag. In alle concentraties is de waarde 0,0 mg/l gemeten. Dit is een bekend verschijnsel in experimenten met sediment/water-systemen die op deze wijze zijn bereid. De pH-waarden lagen tussen 7,5 en 8,3.

Tabel 10 toont de gemeten CPF-concentraties in sediment en bovenstaand water als ook

de partitie-coëfficiënten C_s/C_w . De actuele concentraties in het sediment blijken niet te veranderen met toenemende blootstellingstijd terwijl de concentraties in het bovenstaande water tot circa 1/3 van de waarde na verversen afnemen. De berekende partitie-coëfficiënten nemen hierdoor toe. Verdamping van CPF uit de waterfase zonder noemenswaardige aanvulling vanuit het sediment zou hier een verklaring voor kunnen zijn.

Als aangenomen wordt dat de concentraties CPF in het poriewater te schatten zijn uit de partitie-coëfficiënten berekend voor dag 0 dan worden de LC_{50} en NOEC-waarden als volgt (uitgedrukt als geschatte actuele concentraties in het poriewater):

- 48-uurs LC_{50} : > 2,6 mg/l
- 21-daags LC_{50} : 0,15 mg/l
- 21-daags NOLC: 0,060 mg/l
- 21-daags NOEC: 0,017 mg/l

Tabel 11 geeft gemeten minimum- en maximum-waarden voor nitriet, nitraat, ammonium en chloride. Tevens zijn de berekende NH_3 -concentraties vermeld. De maximaal mogelijke NH_3 -concentratie is berekend op 0,99 mg/l. Deze NH_3 -waarde ligt lager dan NOEC-waarden voor *Daphnia magna* van 1,2 en 2,4 mg/l die in langdurende experimenten werden vastgesteld (Roghair et al., rapport in voorbereiding). Voor *B. sowerbyi* zijn nog geen tolerantie-grenzen voor ammoniak bekend.

3.4 Discussie

Deze paragraaf geeft een algemene discussie. Een discussie van de specifieke waarnemingen in de experimenten is gegeven in de vorige paragraaf.

3.4.1 Methodiek

Toxicologische parameters

De effecten die werden waargenomen bij de wormen waren:

- * sterfte

- * afwijkend gedrag
 - verlamd
 - al of niet opgerold of in een kluwen gerold
 - trager bewegen
 - ongecontroleerde bewegingen

- * afwijkend uiterlijk
 - afwijkingen aan de kop
 - afwijkingen aan de kieuwen
 - afwijkende lengte/korter
 - zwellingen
 - insnoeringen
 - bloedingen

Deze effecten kwamen in vrijwel alle experimenten voor. Doordat er nog geen ervaring was met deze oligochaet zijn enkele verschillend benoemde effecten vermoedelijk van vergelijkbare aard.

De effecten die duidelijk gecorreleerd zijn met concentratie en/of blootstellingsduur zijn sterfte, afwijkingen aan de kieuwen, trager bewegen en ongecontroleerde bewegingen. Deze parameters zijn daarom van belang bij het verder ontwikkelen van de toetsmethode. Het effect opgerold lijkt duidelijk verband te houden met de CPF-concentratie maar is zowel als 'meer opgerold' als 'minder opgerold' waargenomen. De effecten zwellingen, insnoeringen, bloedingen en afwijkingen aan de kop lijken minder geschikt omdat ze niet concentratie-gerelateerd zijn of hersteld kunnen worden. De eerste drie van deze afwijkingen lijken eerder op 'ruis' dan op toxische effecten. Ze komen in principe sporadisch voor.

Sterfte blijkt, tenminste voor CPF, een weinig gevoelig criterium te zijn.

Duur van de blootstelling

De duur van de blootstelling was op twee wijzen van belang in deze experimenten. Bij het eerste DSW-experiment bleken na een aantal dagen veel achtergrondeffecten op te treden. Vermoedelijk door verkorten van de acclimatisatieperiode werden dit soort

effecten in het tweede DSW-experiment niet waargenomen. Aan te nemen is dat huisvesting in een waterig medium zonder voer zoveel extra stress heeft veroorzaakt dat dit waarneembaar werd in achtergrondeffecten.

Daarnaast bleek verlenging van de blootstellingsduur tot (aanvullende) effecten in lagere concentratie-groepen te leiden. Mogelijk is een langzame opname van CPF in de wormen een verklaring voor dit feit. Voorlopig lijkt een blootstellingsduur van tenminste 3 weken nodig om inzicht te krijgen in dit aspect.

Leeftijd en grootte van de wormen

Oudere en grotere wormen lijken minder gevoelig dan jongere en kleinere wormen. De verschillen in gevoeligheid komen met name in de NOEC tot uiting: de NOEC voor de oudere wormen ligt twee concentratiestappen hoger dan die voor de andere wormen. Jonge wormen zijn gevoeliger voor achtergrondeffecten. Uit het betreffende experiment komen wormen van middelmatige grootte en een leeftijd van ca. 5 maanden als meest bruikbaar naar voren omdat zij de gevoeligheid combineren met weinig achtergrondeffecten.

Voeding

Het voeren van de wormen tijdens het experiment draagt vermoedelijk bij tot het verminderen van het percentage achtergrondeffecten. Daarbij leken gevoerde wormen iets gevoeliger te zijn voor CPF dan niet gevoerde wormen: de NOEC voor gevoerde wormen ligt één concentratiestap lager dan die van niet gevoerde wormen.

Blootstellingsroute

Door de toxiciteit van CPF voor wormen blootgesteld in sediment/water-systemen te vergelijken met die voor wormen blootgesteld in DSW kan een aanwijzing worden verkregen over de relevantie van opname uit sediment. Het gaat hierbij om de volgende waarden (gebaseerd op actuele concentraties):

| | DSW (91/P064) | sediment (91/P026) |
|------------------------------------|---------------|--------------------|
| 21-daags LC ₅₀ (+ voer) | 0,41 mg/l | 0,15 mg/l |
| 21-daags NOLC (+ voer) | 0,21 mg/l | 0,060 mg/l |

| | | |
|------------------------|-------------|------------|
| 21-daags NOEC (+ voer) | 0,0007 mg/l | 0,017 mg/l |
|------------------------|-------------|------------|

Voor de parameter sterfte lijkt blootstelling via sediment iets bij te dragen aan de toxiciteit. De verschil-factor bedraagt ca. 3 wat betekent dat verschillen marginaal zijn. Voor wat betreft de NOEC blijken de wormen blootgesteld in DSW gevoeliger te zijn (factor 24). Dit verschil wordt onder andere veroorzaakt door het effect afwijkingen aan de kieuwen. In de sediment/water-systemen bleek dit effect minder aanwezig te zijn dan in het DSW-experiment. Een relativerende opmerking dient gemaakt te worden: de spreiding in de analyse-resultaten van CPF was in de water-monsters groot waardoor bovengenoemde conclusies met voorzichtigheid behandeld moeten worden.

Bereiding sediment/water-systemen

Ten aanzien van het bereiden van de sediment/water-systemen zijn geen andere opmerkingen te maken dan die in Roghair et al., 1991 en Roghair et al., 1993 zijn beschreven.

Experimenteel ontwerp

Op basis van de resultaten van deze experimenten dient aan een aantal aspecten vastgehouden te worden bij het toetsen van de andere modelstoffen. De duur van de blootstelling dient 3 weken te bedragen. De wormen moeten circa 5 maanden oud en van middelbare lengte zijn. De dieren dienen gevoerd te worden. De acclimatisatie-duur moet worden beperkt tot in principe maximaal 3 dagen in experimenten in DSW of 1 dag in experimenten in sediment/water-systemen.

De lage zuurstof-gehalten die optraden in de experimenten met sediment behoeven nog nadere studie naar mogelijke schadelijkheid voor de wormen.

Praktische uitvoering

De praktische uitvoering van de methoden zoals hier gebruikt kan alleen op subjectieve wijze worden geevalueerd. De experimenten zijn voor wat betreft de tijdsinspanning uit te voeren door één persoon bekend met ecotoxicologische experimenten. Er zijn geen specifieke materialen benodigd anders dan een binoculair voor het beoordelen van het uiterlijk van de wormen en een (groot) aantal magneetroeders voor het maken van

belaste sediment/water-suspensies. Het beoordelen van de wormen met behulp van een binoculair kost niet meer tijd dan gebruikelijk is bij reproductie-experimenten met watervlooien en early life stage toetsen met kleine vissen zoals de zebravis en stekelbaars.

3.4.2 Gevoeligheid van de wormen

Om enig inzicht te krijgen in de gevoeligheid van *B. sowerbyi* voor ethyl-chloorpyrifos ten opzichte van die van andere aquatische organismen zijn in het onderstaande enige toxiciteitswaarden (allen gebaseerd op nominale concentraties) uit het eigen laboratorium vermeld.

Toxiciteit in DSW

| | | |
|-------------------------------|-----------|------------|
| <i>Daphnia magna</i> | 48-h EC50 | 0,15 µg/l |
| <i>Daphnia magna</i> | 48-h NOEC | 0,057 µg/l |
| <i>Daphnia magna</i> | 21-d NOEC | 0,032 µg/l |
| <i>Gasterosteus aculeatus</i> | 96-h LC50 | 3,5 µg/l |
| <i>Gasterosteus aculeatus</i> | 96-h LC50 | 1 µg/l |
| <i>B. sowerbyi</i> | 48-h LC50 | 1100 µg/l |
| <i>B. sowerbyi</i> | 96-h LC50 | 400 µg/l |
| <i>B. sowerbyi</i> | 72-h NOEC | 10 µg/l |
| <i>B. sowerbyi</i> | 21-d NOEC | 1 µg/l |

Toxiciteit in sediment-systemen

| | | |
|----------------------------|-----------|--|
| <i>Daphnia magna</i> | 96-h EC50 | 0,42 mg/kg ds (sediment/water-systeem) |
| <i>Daphnia magna</i> | 96-h NOEC | 0,32 mg/kg ds (sediment/water-systeem) |
| <i>Chironomus riparius</i> | 96-h LC50 | 0,09 mg/kg ds (sediment/water-systeem) |
| <i>Chironomus riparius</i> | 96-h NOEC | 0,056 mg/kg ds (sediment/water-systeem) |
| <i>Daphnia magna</i> | 21-d NOEC | 0,32 mg/kg ds (elutriaat) |
| <i>B. sowerbyi</i> | 48-h LC50 | > 1000 mg/kg ds (sediment/water-systeem) |
| <i>B. sowerbyi</i> | 21-d NOEC | 10 mg/kg ds |

Uit deze zeer beperkte vergelijking blijkt dat *B. sowerbyi* het minst gevoelig is voor

CPF maar dat bij langdurende blootstelling de stof in zeer lage concentraties toxisch is. Zoals al eerder is opgemerkt is het criterium sterfte geen goede parameter om de toxiciteit van CPF voor *B. sowerbyi* vast te stellen. Sublethale effecten geven een beter beeld van de gevoeligheid van de worm voor CPF.

3.5 Conclusies

Ten aanzien van de in 3.1 geformuleerde doelstellingen kan het volgende worden geconcludeerd.

Gebaseerd op de hier beschreven experimenten lijken sterfte, afwijkingen aan de kieuwen, trager bewegen en ongecontroleerde bewegingen bruikbare parameters voor het vaststellen van toxische stress te zijn.

Niet-concentratie-gerelateerde effecten zijn zwellingen, insnoeringen en bloedingen. Deze komen met name voor bij jonge wormen of wormen die niet gevoerd worden. Afwijkingen aan de kop zijn slecht gerelateerd aan de concentratie CPF maar worden hier wel door beïnvloed.

De experimenten zijn voor wat betreft tijd-inspanning en materialen goed uitvoerbaar. Naast een binoculair is een aantal magneetroeders nodig om belaste sediment/water-systemen te verkrijgen.

Oudere en grotere dieren lijken iets minder gevoelig te zijn dan jongere en kleinere dieren. Voeren van de wormen lijkt de toxiciteit van CPF te vergroten.

Sediment als blootstellingsroute lijkt niet of nauwelijks tot een verhoogde toxiciteit te leiden wanneer de resultaten uit sediment-experimenten vergeleken worden met die uit DSW-experimenten.

Op basis van de uitgevoerde experimenten met CPF lijkt het mogelijk te voldoen aan de

twee criteria die in paragraaf 3.1 gesteld zijn aan de te ontwikkelen toetsmethode:

- De toetsduur dient beperkt te zijn tot maximaal enkele weken.
- De toetsen dienen bij voorkeur relatief eenvoudig van uitvoering en standaardiseerbaar te zijn.

4. METHODEBESCHRIJVING: BEPALING VAN DE TOXICITEIT MET BEHULP VAN *BRANCHIURA SOWERBYI*

4.1 Inleiding

4.1.1 Doel

Dit voorschrift is een handleiding voor het uitvoeren van toxiciteitsexperimenten met *Branchiura sowerbyi* ter bepaling van de acute toxiciteit van chemische stoffen in standaardwater en sediment.

4.1.2 Principe

De toetsstof wordt aan het toetsmedium toegevoegd in een aantal, met constante factor toenemende, concentraties waarna de toxiciteit bepaald wordt door het scoren van (sub)letale-effecten. De toetsduur is 21 dagen.

4.1.3 Doelgroep

Dit voorschrift is bedoeld voor diegenen die toxiciteitsexperimenten met *B. sowerbyi* willen uitvoeren.

4.1.4 Veiligheid

Alvorens de toets te beginnen is het wenselijk om te beschikken over de zuiverheid, eventuele verontreinigingen, oplosbaarheid in water, dampdruk, log P_{oct}, pK_a, analysemethoden en stabiliteit in water en licht van de stof evenals de resultaten van een biologische afbreekbaarheids-toets. Neem kennis van en handel volgens de classificatie-zinnen (R- en S-zinnen) van de toetsstof, opgegeven door de fabrikant.

4.1.5 Methodiek

De toetsmethode met *B. sowerbyi* is in ons laboratorium nog in ontwikkeling. De hier beschreven werkwijze kan daarom nog niet als een gestandaardiseerde toxiciteits-toets worden opgevat.

4.2 Media en hulpmaterialen

- viltschrijver
- ontwikkelschalen
- minimum/maximum-thermometer
- filtreerpapier
- formaline 3,5%
- Dutch Standard Water, zie Bijlage 1
- prepareernaald
- precisiepincet
- anatomische pincetten, Fontax
- sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel (SW), gefiltreerd over een 500 μm roest-vrij stalen zeef en bestraald met 10 kGy door Gammaster te Ede (zie Bijlage 2).
- kartonnen dozen met deksel
- onbespoten sla
- soeplepels
- houten lepels
- polyamide zeefje

4.3 Biologisch materiaal

- Kweek *B. sowerbyi*, zie hoofdstuk 6.

4.4 Apparatuur en glaswerk

- zuurstof-meter
- pH-meter
- toetsvaten, 400 ml
- glazen overzetbuisjes met syphon speentje, \varnothing 7 mm, lengte 18 cm

- binoculair
- petrischalen, Ø 15 cm
- bekeerglazen, maatcilinders
- vriezer, temperatuur minimaal - 20 °C
- koelcel, temperatuur 4 +/- 2 °C
- objectglaasjes
- balans

4.5 Experimentele uitvoering

4.5.1 Blootstelling in standaardwater

Vorbereiding

- * Maak een experimenteel ontwerp (proefopzet).
- * Voer de proef in principe in duplo uit (A- en B-serie).
- * Zoek het benodigde aantal wormen uit de kweek (leeftijd ca. 2-3 maanden, lengte ca. 2-4 cm, gewicht ca. 15 mg). Controleer de wormen met behulp van een binoculair op eventuele misvormingen aan staart of kop. De voor het experiment te gebruiken wormen moeten in goede conditie en van gelijke leeftijd zijn en op het oog een gelijke lengte hebben.
- * Laat de wormen gedurende 72 uur acclimatiseren in DSW bij een temperatuur van 21 +/- 2 °C in het donker, bv. in een kartonnen doos met deksel. Voer de wormen gedurende deze periode niet.
- * Controleer tijdens de acclimatisatie-fase en de blootstelling dagelijks de temperatuur van de ruimte.
- * Zet in de proefruimte (dit kan afhankelijk van de stof een afzuigkast of een labruimte zijn), met een temperatuur van 21 +/- 2 °C (met een range van maximaal 2 °C per proef), het benodigde glaswerk klaar en codeer dit met behulp van een viltstrijver duidelijk met de concentratie.
- * Zet al het benodigde glaswerk en eventuele andere materialen klaar op filtreerpapier. Codeer dit filtreerpapier met stofnaam, proefopzetnummer en type organisme.

- * Bepaal het natgewicht van 20 individuele wormen met behulp van een balans. Leg hiertoe de wormen op een zeefje van polyamide gevuld met tissues. Laat de wormen even aan de lucht drogen. Leg de wormen individueel op een objectglaasje en bepaal het gewicht. Gebruik deze wormen niet meer voor het experiment.

Bereiding toetssystemen

- * Gebruik DSW als verdunningswater voor het bereiden van de concentratiereksen.
- * Meet voor gebruik van verdunningswater de pH en het zuurstofgehalte van dit medium.
- * Gebruik bij moeilijk oplosbare stoffen een oplosmiddel. De concentratie van het oplosmiddel mag niet hoger zijn dan 100 µl/l. Stel alle wormen bloot aan dezelfde concentratie van het oplosmiddel. Neem een extra controle zonder oplosmiddel mee.
- * Doe bij niet vluchtige stoffen 250 ml toetsoplossing in 400 ml-toetsvaten. Doe bij vluchtige stoffen de toetsoplossing in toetsvaten die afgesloten kunnen worden (met slijpstuk en glazen stop). Vul deze toetsvaten zoveel mogelijk af.

Blootstelling

- * Neem indien gewenst op $t = 0$ uur monsters van de toetsoplossingen voor het bepalen van de actuele concentratie van de toxicant.
- * Meet op $t = 0$ uur de pH en het zuurstofgehalte van de controle(s) en alle toetsoplossingen van de A-serie. Meet bij vluchtige stoffen in een extra toetsvat.
- * Zet op $t = 0$ uur in elk toetsvat at random 10 wormen in met behulp van een overzetbuisje. Probeer zo weinig mogelijk DSW over te brengen.
- * Vermijd contaminatie. Begin hiertoe bij de controle(s) en werk daarna van de lage naar de hoge concentratie.
- * Sluit bij vluchtige stoffen de toetsvaten af met een glazen stop.
- * Zet de toetsvaten in afgesloten kartonnen dozen.
- * Voer de wormen op $t = 0$ uur en op maandag en vrijdag, naar behoefte, met een klein stukje ontbonden sla. Zet bij verversen van de toetsoplossingen op woensdag de aanwezige sla mee over in de verse toetsoplossing. Voer eventueel wat extra sla. Zet, ten behoeve van het ontbinden van de sla, een aantal dagen voor het voeren enkele bevroren slabladeren op DSW.

- * Belucht de proef in principe niet. Indien nodig kan belucht worden, maar dan mag de concentratie van de toetsstof niet minder dan 80% of significant afwijkend worden van de onbeluchte waarde. Neem hiertoe vlak voor en vlak na beluchten monsters van de toetsoplossingen voor het bepalen van de actuele concentraties.
- * Bekijk 1x per dag of er dode wormen in de toetsoplossingen zitten. Verwijder dode wormen direct zorgvuldig uit de toetsoplossingen.
- * Scoor de proef op maandag, woensdag en vrijdag volgens 4.5.3.
- * Ververs de toetsoplossingen minimaal 3 x per week; ververs afhankelijk van de stabiliteit van de stof de toetsoplossingen vaker, bijvoorbeeld 1x per dag.
- * Meet elke week op de tijdstippen $t = 48$ uur na verversen de pH en het zuurstofgehalte van de controle(s) en de hoogste concentratie met levende wormen (A- en B-serie). Meet tevens elke week op $t = 72$ uur na verversen de pH en het zuurstofgehalte van de controle(s) en alle concentraties (A- en B-serie). Meet bij vluchtige stoffen in een extra toetsvat.
- * Breng de wormen voorzichtig over in de verse toetsoplossingen.
- * Vermijd verstoringen welke het gedrag van de wormen kunnen beïnvloeden, zoals het onnodig openen van de kartonnen dozen.
- * Scoor de proef op dag 21 volgens 4.5.3.
- * Bepaal op dag 21 het natgewicht van alle wormen individueel met behulp van een balans.
- * Sluit de proef na 21 dagen af.
- * Maak de wormen dood in de formaline (3,5%).

4.5.2 Blootstelling in sediment

Vorbereiding

- * Maak een experimenteel ontwerp (proefopzet).
- * Voer de proef in principe in duplo uit (A- en B-serie).
- * Zoek het benodigde aantal wormen uit de kweek (leeftijd ca. 2-3 maanden, lengte ca. 2-4 cm, gewicht ca. 15 mg). Controleer de wormen met behulp van een binoculair op eventuele misvormingen aan staart of kop. De voor het experiment te gebruiken wormen moeten in goede conditie en van gelijke leeftijd zijn en op het

oog een gelijke lengte hebben. Dit uitzoeken kan 24 uur voor inzetten plaatsvinden. Bewaar de geselecteerde wormen zolang op DSW.

- * Controleer tijdens de blootstelling dagelijks de temperatuur van de ruimte.
- * Zet in de proefruimte (dit kan afhankelijk van de stof een afzuigkast of een labruimte zijn), met een temperatuur van 21 +/- 2 °C (met een range van maximaal 2 °C per proef), het benodigde glaswerk klaar en codeer dit met behulp van een viltstrijper duidelijk met de concentratie.
- * Zet al het benodigde glaswerk en eventuele andere materialen klaar op filtreerpapier. Codeer dit filtreerpapier met stofnaam, proefopzetnummer en type organisme.
- * Bepaal het natgewicht van 20 individuele wormen met behulp van een balans. Leg hiertoe de wormen op een zeefje van polyamide gevuld met tissues. Laat de wormen even aan de lucht drogen. Leg de wormen individueel op een objectglaasje en bepaal het gewicht. Gebruik deze wormen niet meer voor het experiment.

Bereiding toetssystemen

- * Gebruik als verdunningswater DSW en als sediment Schoonrewoerdse Wield sediment voor het bereiden van de sedimentsuspensie.
- * Meet voor gebruik van verdunningswater de pH en het zuurstofgehalte van dit medium.
- * Gebruik bij moeilijk oplosbare stoffen een oplosmiddel. De concentratie oplosmiddel mag niet hoger zijn dan 100 µl/l suspensie. Stel alle wormen bloot aan dezelfde concentratie van het oplosmiddel. Neem een extra controle zonder oplosmiddel mee.
- * Bepaal het droge stof-gehalte van het sediment. Vul hiertoe een gedurende 30 minuten bij 100 °C gedroogd en 10 minuten in een exsicator afgekoeld bekersglas met ca. 50 gram nauwkeurig afgewogen sediment. Laat dit geheel 24 uur drogen bij 100 °C. Laat het bekersglas gedurende 10 minuten afkoelen in een exsicator. Bepaal het droge stof-gehalte door het wegen van het gedroogde sediment.
- * Maak een homogeen sediment/water-systeem met een verhouding van 1 volumedeel sediment en 4 volumedelen standaardwater. Deze verdunning dient voor het Schoonrewoerdse Wiel te leiden tot een droge stof-gehalte van 40 gr ds/l.
- * Belast de sedimentsuspensie met de betreffende toetsstof opgelost in een oplosmiddel of in het verdunningswater (DSW).

- * Roer de belaste sedimentsuspensie gedurende 20 uur met een glazen roervlo op een magneetroerder.
- * Maak aan het begin van het experiment een extra serie sediment/water-systemen om de wormen na 48 uur over te kunnen zetten.
- * Vul de 400 ml-toetsvaten met 250 ml sedimentsuspensie.
- * Zet de bekeerglazen gevuld met sedimentsuspensie gedurende 24 uur weg bij 21 +/- 2 °C om de sedimentdeeltjes uit te laten zakken. Bewaar de extra serie bekeerglazen gevuld met sedimentsuspensie gedurende 48 uur in de koelcel bij 4 +/- 2 °C om de sedimentdeeltjes uit te laten zakken en vervolgens een dag voor het overzetten van de proef bij 21 +/- 2 °C om op temperatuur te komen.
- * Na 24 uur zijn de sediment/water-systemen klaar voor gebruik (t = 0 uur). De extra serie is na 72 uur klaar voor gebruik (t = 48 uur).

Op deze wijze zijn de sediment/water-systemen bereid volgens werkvoorschrift PCBB-B6/8995/1990-1.0.

Blootstelling

- * Neem indien gewenst op t = 0 uur monsters van de toetsoplossingen voor het bepalen van de actuele concentratie van de toxicant.
- * Meet op t = 0 uur de pH en het zuurstofgehalte van de controle(s) en alle concentraties van de A- en B-serie.
- * Zet op t = 0 uur in elk toetsvat at random 10 wormen in met behulp van een overzetbuisje. Probeer zo weinig mogelijk DSW over te brengen.
- * Vermijd contaminatie. Begin hiertoe bij de controle(s) en werk daarna van de lage naar de hoge concentratie.
- * Dek de toetsvaten af met glasplaten.
- * Belucht de proef in principe niet. Indien nodig kan belucht worden, maar dan mag de concentratie van de toetsstof niet minder dan 80% of significant afwijkend worden van de onbeluchte waarde. Neem hiertoe vlak voor en vlak na beluchten monsters van de toetsoplossingen voor het bepalen van de actuele concentraties.
- * Meet dagelijks de pH en het zuurstofgehalte van de controle(s) en alle concentraties (A- en B-serie).

- * Voer de wormen op dag 7 en 14, naar behoefte, met een klein stukje ontbonden sla. Zet, ten behoeve van het ontbinden van de sla, een aantal dagen voor het voeren enkele bevroren slabladeren op DSW.
- * Scoor de proef na 2, 7, 14 en 21 dagen volgens 4.5.3.
- * Ververs de sediment/water-systemen tenminste op dag 2, 7 en 14. Bereid voor de dagen 7 en 14 verse sediment/water-systemen. Gebruik voor het overzetten op dag 2 het sediment/water-systeem welke gedurende 48 uur in de koelcel, bij 4 +/- 2 °C en vervolgens bij 21 +/- 2 °C heeft gestaan; ververs afhankelijk van de stabiliteit van de stof de toetsoplossingen vaker.
- * Zoek na 2, 7, 14 en 21 dagen de wormen uit het sediment met behulp van een ontwikkelschaal en een fontax-pincet.
- * Verzamel de wormen per concentratie (A en B apart) in bekeerglazen (50 ml) gevuld met bovenstaand water.
- * Breng de wormen, na scoring (zie 4.5.3), na 2 dagen voorzichtig over in de daarvoor bedoelde sediment/water-systemen. Breng de wormen na 7 en 14 dagen, na scoring (zie 4.5.3), voorzichtig over in verse sediment/water-systemen.
- * Vermijd verstoringen welke het gedrag van de wormen kunnen beïnvloeden, zoals het onnodig blootstellen aan licht.
- * Scoor de proef op dag 21 volgens 4.5.3.
- * Bepaal op dag 21 het natgewicht van alle wormen individueel met behulp van een balans.
- * Sluit de proef na 21 dagen af.
- * Maak de wormen dood in de formaline 3,5%.

4.5.3 Toxicologische observaties

De volgende effecten worden op overzetzdagen kwantitatief beoordeeld:

- * Sterfte (letale effecten):
 - Een worm is dood als er geen lichaamsbewegingen meer worden waargenomen na lichamelijke stimulatie. De dode wormen zijn makkelijk te herkennen aan hun grijze-witte kleur. Het lichaam verkeerd vaak in ontbonden staat. Bekijk de wormen altijd onder de binoculair om de juiste diagnose vast te stellen.
- * Afwijkend gedrag (subletale effecten) zoals:

4.6.2 Bepaling van de NOLC en NOEC

Stel de NOLC- en NOEC-waarden van de experimenten vast uit de waargenomen concentratie-effect relaties. Hierbij geldt dat een NOEC een concentratie lager ligt dan de LOEC-waarde. Een concentratie met $\leq 10\%$ effect telt in dit geval als een concentratie zonder effect.

4.7 Herhaling experiment

Herhaal, in principe, het gehele experiment om de reproduceerbaarheid vast te stellen.

5. ONDERZOEK TER VERBETERING VAN DE KWEEKMETHODE

5.1 Inleiding

Om de kweek van *B. sowerbyi* in het laboratorium te optimaliseren, dat wil zeggen meer wormen met minder te besteden personele capaciteit, werd een aantal experimenten uitgevoerd. In dit hoofdstuk wordt verslag gedaan van deze experimenten. De resultaten zijn gebruikt om de kweekmethode van *B. sowerbyi* te verbeteren. In de in hoofdstuk 6 gepresenteerde methodebeschrijving zijn de resultaten verwerkt.

De volgende experimenten werden uitgevoerd:

- 91/P061 ter bepaling van kweekmedium, tijdstippen van verversen van het kweekmedium en voedsel,
- 91/P076 ter bepaling van het benodigd aantal wormen of cocons voor een goede reproductie,
- 91/P085 ter bepaling van het kweekmedium,
- 92/P001 ter bepaling van de optimale dichtheid van de wormen in de kweekvaten,
- 92/P023 ter bepaling van het kweekmedium, en
- 92/P024 ter bepaling van het kweekmedium en voedsel.

5.2 Materiaal en methoden

5.2.1 Organismen

De experimenten werden uitgevoerd met de oligochaet *B. sowerbyi*. Alle dieren werden in ons laboratorium gekweekt onder gecontroleerde omstandigheden maar met wisselende condities. Zie ook paragraaf 3.2.1. Tijdens de periode dat de kweek-experimenten werden uitgevoerd varieerde het voerregime van 1-6 * per 2 weken.

5.2.2 Media

De media die in de experimenten werden gebruikt zijn nader gespecificeerd in de tabellen die de experimentele condities weergeven (Tabel 12 t/m 17). Het sediment dat in de media werd gebruikt is sediment uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW). Specificaties hiervan zijn gegeven in Bijlage 2. Het zand dat werd gebruikt is M32-zand verkregen bij de firma Loon Vreeswijk te Nieuwegein. Het gebruikte water is Dutch Standard Water (DSW) waarvan de specificaties in Bijlage 1 zijn gegeven.

5.2.3 Experimentele methoden

Voor de hier gerapporteerde experimenten kan niet naar standaard-methodieken worden verwezen. De experimentele condities en observatie-parameters van de experimenten zijn gegeven in de tabellen 12 t/m 17. De wormen werden op de aangegeven observatie-tijdstippen geteld en beoordeeld op uiterlijk met behulp van een binoculair. Manipulatie van de wormen en cocons vond plaats met behulp van een Fontax-pincet en een glazen overzetbuisje met syphon speentje, doorsnede 7 mm en lengte 18 cm. De wormen en cocons werden niet uit het medium gezeefd maar met het oog gezocht door het medium uit te spreiden in een foto-ontwikkelingsbak.

De wormen werden, tenzij anders vermeld, niet geacclimatiseerd voor inzetten in een experiment. Ook werden de wormen voor inzetten niet gecontroleerd op afwijkend uiterlijk, tenzij anders vermeld in de tabellen.

5.2.4 Statistische analyse

De experimenten zijn over het algemeen met één tot drie groepen per behandeling uitgevoerd. Daar waar mogelijk is de Tukey "method of multiple comparisons" toegepast uit het gecomputeriseerde programma TOXSTAT, versie 3.3 (Gulley, 1990)

5.3 Resultaten

5.3.1 Experiment 91/P061: kweekmedium, verversing en voedsel

De tabellen 18 t/m 20 geven de resultaten van dit experiment weer. Eventuele effecten op uiterlijk waren goed te observeren. Het aantal juvenielen in dit experiment was zo

gering dat dit geen onderscheidende parameter vormde. Mogelijk is een periode van een maand tussen de verversingen te kort om juvenielen in de potten te geven. Het aantal geproduceerde cocons was in dit experiment in het algemeen niet hoog in vergelijking met later uitgevoerde experimenten. De aantallen zijn echter wel zodanig dat onderscheid gemaakt kan worden tussen de verschillende behandelingen.

Tabel 18 laat zien dat in het medium bestaande uit SW-sediment en DSW (geen zand; groep C) alle dieren gedurende meerdere observaties afwijkingen aan de kieuwen vertoonden. Dit betrof met name bloedingen en "rommelige" kieuwen. Ook het percentage sterfte was hoog in deze groep. Daarentegen produceerde deze groep het hoogste aantal cocons en juveniele wormen van alle groepen in dit experiment.

Het niet elke maand verversen van het medium (en daarmee manipuleren van de wormen; groep B) gaf geen verschillen te zien voor wat betreft sterfte, afwijkingen aan de kieuwen en insnoeringen (Tabel 19). Wel bleken de wormen die gedurende 4 maanden of langer op hetzelfde medium hadden gezeten, kleiner te zijn dan de groepen die maandelijks verversst werden. Er was nagenoeg geen coconproductie in deze groep.

Uit Tabel 20 blijkt dat er weinig of geen verschillen zijn in overleving en uiterlijk bij de verschillende soorten voer. De coconproductie is het hoogst bij de behandeling "koemest en sla" (groep A).

De tabellen laten in enkele gevallen van de verwachting afwijkende waarden zien voor het observatie-tijdstip $t = 186$ dagen. Vermeld dient te worden dat deze observatie door omstandigheden door een andere analist werd uitgevoerd dan de eerdere observaties. Dit wil niet zeggen dat dit de oorzaak van de afwijkingen is.

De zuurstofconcentraties in dit experiment lagen tussen 5,1 en 9,7 mg/l. De pH-waarden tussen 7,51 en 8,32.

5.3.2 Experiment 91/P076: benodigd aantal wormen of cocons

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in de tabellen 21 en 22. Bij de gekozen experimentele condities zijn er slechts weinig wormen uit de cocons gekomen zodat besloten werd om het cocon-deel van het experiment na 33 dagen niet voort te zetten (Tabel 21).

In het deel van het experiment waar gestart werd met wormen in plaats van cocons, had de dichtheid van de wormen geen invloed op de overleving (Tabel 22). Aanvankelijk

toonde een groter percentage wormen in groep E (25 wormen per pot) afwijkingen aan de kieuwen maar na 63 dagen waren deze afwijkingen zodanig hersteld dat er geen verschillen waren tussen de groepen. Een duidelijk verschil was wel aanwezig in het aantal geproduceerde cocons en jonge wormen. In de groep met 75 wormen per pot, groep D, was nauwelijks sprake van reproductie. De potten van groep E (25 wormen per pot) bevatten cocons en een geringer aantal juvenielen. Opgemerkt moet worden dat de hoeveelheid toegediend voedsel per pot gelijk was en dat groep E dus drie maal zo veel voedsel als groep D heeft gekregen.

5.3.3 Experiment 91/P085: kweekmedium

De resultaten van dit experiment zijn vermeld in Tabel 23. De wormen die op een medium van zand en DSW leefden groeien niet of nauwelijks. Deze groepen zijn niet verder geobserveerd.

De samenstelling van het medium had weinig onderscheidende invloed op de overleving van de wormen. De groei van de wormen was in de groepen C, D en E, met een relatief hoog percentage SW-sediment, aanvankelijk beter dan van de groepen A en B. De groepen D en E vertoonden bij de observatie op $t = 123$ dagen echter veel afwijkingen aan de kieuwen en insnoeringen in het lichaam. Het eerstgenoemde effect was ook waargenomen in experiment 91/P061 en komt waarschijnlijk door het relatief hoge percentage SW-sediment in de media.

Na 123 dagen was de gemiddelde coconproductie van groep C het grootst. In groep B was deze het kleinst van de vier overgebleven groepen. Dit geldt ook voor de productie per overlevende worm. Het aantal juvenielen was iets groter in groep D dan in groep C, beide waren echter groter dan de groepen B en E. Ook dit geldt voor de productie per overlevende worm.

Wanneer alle resultaten tezamen worden genomen dan verdient het medium van groep C de voorkeur vanwege de gunstige combinatie van een goede reproductie met een gering percentage afwijkingen aan het uiterlijk van de wormen.

5.3.4 Experiment 92/P001: optimale dichtheid van de wormen

Tabel 24 geeft de resultaten van dit experiment weer. De dichtheid van de wormen had niet veel invloed op de overleving hoewel deze met gemiddeld 93% het hoogst was in

de groepen met 25 wormen per pot. Deze wormen waren groter dan de wormen uit de overige groepen. De natgewichten bepaald aan het einde van het experiment tonen dat ook aan. De gewichten van groep C (25 wormen per pot) waren significant hoger dan die van de andere groepen (Tukey method of multiple comparisons; $P=0,05$). Opge-merkt moet worden dat het hier om het eindgewicht van de wormen gaat en niet om een gewichtstoename. Het gewicht van de wormen is bij aanvang van het experiment namelijk niet gemeten. De ingezette dieren waren echter van vergelijkbare grootte en leeftijd.

De produktie van cocons en juvenielen is het hoogst in de groep met 25 wormen per pot, zowel in produktie per overlevende adulte worm als in totale produktie per groep wormen. Groep C is voor wat betreft de produktie van cocons significant afwijkend van groep A met 75 wormen per pot (Tukey method of multiple comparisons; $P=0,05$).

5.3.5 Experiment 92/P023: kweekmedium

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in Tabel 25. De samenstelling van het medium en de hoeveelheid medium heeft geen invloed op de overleving van de wormen. Op groep A2 na bleven de mortaliteitspercentages beneden de 10%. Op het tijdstip $t = 70$ dagen werden relatief veel rode kieuwen waargenomen. Deze zijn als afwijkingen opgenomen in de tabel. De meeste van deze afwijkingen kwamen voor in het medium met de grootste absolute hoeveelheid SW-sediment. Mogelijk is het een aanpassing aan locale zuurstofomstandigheden in het medium. De overige waargenomen afwijkingen betroffen in de meeste gevallen ook rode kieuwen.

Andere afwijkingen in het uiterlijk zoals insnoeringen en zwellingen kwamen, met uitzondering van $t = 70$ dagen, sporadisch voor. Op $t = 70$ dagen kwam in groep A1 20% afwijkingen voor, waargenomen als "deukjes" in het lichaam.

De totale coconproduktie evenals de produktie per overlevende adulte worm was het hoogst in groep A en het laagst in de groepen C en E. Het experiment is niet zodanig opgezet dat eenduidige correlaties kunnen worden gelegd tussen produktie en medium-samenstelling. Toch zijn er enkele duidelijke aanwijzingen te verkrijgen. De laagste coconproduktie kwam voor in de groepen met de kleinste absolute hoeveelheid SW-sediment in het medium. De hoogste produktie vond plaats in de groep met de grootste

absolute hoeveelheid SW-sediment. De wormen in deze groep hadden echter ook de beschikking over de dikste laag bodem in de toetsvaten. De produktie was het hoogst op $t = 70$ dagen en nam vervolgens in de loop van het experiment af.

De opbrengst aan juvenielen toont een vergelijkbaar beeld als dat voor de cocons. Echter, groep D had evenals groep A een hoge produktie. Voor de groepen C en E was deze laag.

5.3.6 Experiment 92/P024: kweekmedium en voedsel

De tabellen 26 en 27 tonen de resultaten van dit experiment. In dit experiment werd enige sterfte waargenomen. De sterfte was het minst in groep A. In diverse toetsvaten kwamen afwijkingen aan de kieuwen voor, met name in groep B. De effecten bestonden uit rode plekje op de kieuwen of het afwezig zijn van de kieuwen. Bij de groepen B, D en E kwamen bloedingen in de wormen voor. Omdat er soms grote verschillen optraden tussen de verschillende replica's van een behandeling wordt aangenomen dat de waargenomen effecten niet een direct gevolg zijn van de behandeling.

Tussen de verschillende replica's van de diverse groepen waren soms grote verschillen te zien in reproductie. Significante verschillen zijn niet aanwezig. Groep E, welke 3 maal per week sla gevoerd kreeg, toonde de grootste produktie van cocons en wormen.

5.4 Discussie

De in 5.2 en 5.3 beschreven experimenten zijn in sommige gevallen tegelijkertijd uitgevoerd waardoor de gekozen proefopzet niet altijd de meest logische lijkt. Uit elk experiment zijn echter conclusies afgeleid die in de kweek van *B. sowerbyi* zijn toegepast. Het geheel aan veranderingen heeft tot verbeteringen geleid in produktie en te besteden tijd. Op basis van de verkregen informatie is een methode opgesteld zoals in hoofdstuk 6 beschreven. Het succes van deze methode zal na langdurig kweken worden beoordeeld.

5.5 Conclusies

De volgende conclusies werden uit de kweek-experimenten afgeleid:

- Wormen die gevoerd worden met gedroogde koemest en ontbonden sla geven een relatief hogere coconproductie te zien dan wormen die alleen met koemest of met sla worden gevoerd. Wormen die gekweekt worden in een medium dat alleen uit SW-sediment en DSW bestaat geven weliswaar een hogere coconproductie maar hebben veel afwijkingen aan de kieuwen in vergelijking met wormen die ook zand in hun medium bezitten. Maandelijkse verversing van het medium is beter voor de groei van de wormen en hun coconproductie dan het gedurende 4 maanden of langer niet verversen van het medium;
- Wanneer in een kweekmedium gestart wordt met 25 wormen per pot dan heeft na twee maanden reproductie plaatsgevonden. Starten met 75 wormen per pot geeft op dat tijdstip nog vrijwel geen reproductie. Wanneer gestart wordt met cocons komen in het gekozen kweekmedium weinig wormen uit de cocons.
- Een medium dat bestaat uit 2 delen zand, 2 delen SW-sediment en 4 delen DSW geniet de voorkeur als kweekmedium boven een medium dat relatief meer zand of meer sediment bezit;
- Een dichtheid van 25 wormen per 1500 ml medium geeft een betere groei van de wormen evenals een betere cocon- en juvenielenproductie in vergelijking met dichtheden van 50 of 75 wormen per pot;
- Een medium dat bestaat uit 125 ml M32-zand, 375 ml SW-sediment en DSW geeft een hoge reproductie als ook een groot percentage wormen met een goed uiterlijk.
- Drie maal per week voeren van de wormen met ontbonden sla geeft een hogere reproductie dan het minder vaak voeren van de wormen.

6. METHODEBESCHRIJVING: BENODIGDHEDEN EN WERKWIJZE VOOR HET KWEKEN VAN *BRANCHIURA SOWERBYI*

6.1 Inleiding

6.1.1 Doel

Dit voorschrift beschrijft de benodigdheden en werkwijze voor het onder gestandaardiseerde omstandigheden kweken van *Branchiura sowerbyi* Beddard (1892) voor het gebruik als toetsorganisme in aquatisch ecotoxicologisch onderzoek. *B. sowerbyi* is een zoetwater-oligochaet uit de familie van de *Tubificidae*.

6.1.2 Principe

B. sowerbyi wordt gekweekt in een continue kweek waarbij de verschillende levensstadia naast elkaar voorkomen.

6.1.3 Doelgroep

Dit voorschrift is bedoeld voor diegenen die *B. sowerbyi* in het laboratorium willen kweken.

6.1.4 Methode in ontwikkeling

De kweekmethode van *B. sowerbyi* is in ons laboratorium nog in ontwikkeling. Met name wordt geprobeerd om een zo gunstig mogelijke verhouding tussen opbrengst aan wormen en tijdsinspanning te verkrijgen. De hier beschreven methode geeft voldoende individuen voor instandhouding van de kweek als ook voor het uitvoeren van toxiciteits-experimenten.

6.2 Media en hulpmaterialen

- Dutch Standard Water (DSW, zie Bijlage 1)
- demiwater
- sediment afkomstig uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW), gefiltreerd over een 500 µm

- roest-vrij stalen zeef en bestraald met 10 kGy door Gammaster te Ede (zie Bijlage 2)
- roest-vrij stalen zeef, 425 μm
- zilverzand M32
- onbespoten sla
- perslucht
- bruissteentjes
- siliconenslang (\varnothing inw. 3,5 mm)
- minimum/maximum-thermometer
- anatomische pincetten, Fontax
- soeplepel
- houten lepel
- ontwikkelschalen
- kweekruimte, met een lichtregime van 16 uur licht en 8 uur donker (de verlichting is niet kritisch) en een temperatuur van 21 +/- 2 °C
- formaline 3,5 %
- viltstrijper
- filtreerpapier
- perlonwatten

6.3 Biologisch materiaal

- Populatie van *B. sowerbyi*

6.4 Apparatuur en glaswerk

- pH-meter
- zuurstofmeter
- binoculair
- volglazen bekerglazen van 3 l
- volglazen bekerglazen van 50 ml

- glazen opzuigbuisjes met syphonspeen, Ø 7 mm, lengte 18 cm
- afdekplaten van glas
- vriezer, temperatuur minimaal - 20 °C
- koelcel, temperatuur 4 +/- 2 °C
- petrischalen

6.5 Procedure

6.5.1 Algemeen

B. sowerbyi wordt gekweekt in volglazen 3 l-bekerglazen in een geconditioneerde ruimte (21 +/- 2 °C). De kweek wordt gestart met twee bekers met in elk 25 jonge wormen (kweekdieren, leeftijd < 2 maanden) in 1,5 l kweekmedium (zie 6.5.2). Voor het continueren van de kweek worden elke 2 maanden opnieuw twee bekers met in elk 25 wormen ingezet. Ter verkrijging van wormen voor toxiciteitsexperimenten (proefdieren) worden elke 2 maanden vier bekers met in elk 100 jonge wormen ingezet. Het bovenstaande water in de bekers wordt belucht, de bekers worden afgedekt met een glasplaat. De wormen worden om de twee maanden overgezet op vers medium.

6.5.2 Kweekmedium

- Bereid voor de kweekdieren het kweekmedium door menging van circa 375 ml (1/2 deel van 750 ml) SW-sediment en circa 375 ml (1/2 deel van 750 ml) M32-zand en voor de proefdieren door menging van circa 188 ml (1/4 deel van 750 ml) SW-sediment en circa 562 ml (3/4 deel van 750 ml) M32-zand in een 3 l-bekerglas.
- Meet deze hoeveelheden sediment en zand af met een maatcilinder.
- Meng dit medium met een geringe hoeveelheid DSW goed door elkaar met een houten lepel.
- Vul dit mengsel aan tot 1500 ml met DSW.
- Belucht zodanig dat het mengsel uit kan zakken tot een sedimentlaag met daarboven water. Na ongeveer 24 uur beluchten en uitzakken is het medium klaar voor gebruik.

6.5.3 Onderhoud van de kweek

Dagelijks:

- Controleer en noteer de minimale en maximale temperatuur van de kweekruimte.
- Controleer de beluchting.

3x per week

- Voer de kweekdieren een stukje onbespoten, bevroren sla (circa 7 x 7 cm). Laat de sla voor gebruik ontdooien in DSW. Leg dit stukje sla onder het bruissteentje.

1x per week

- Controleer het waterpeil in de bekerglazen. Vul eventueel bij met demiwater.
- Voer de proefdieren een stukje onbespoten, bevroren sla (circa 7 x 7 cm). Laat de sla voor gebruik ontdooien in DSW. Leg dit stukje sla onder het bruissteentje.

1x per maand:

- Reinig de glasplaten

1x per 2 maanden

- Bereid nieuw kweekmedium (zie 6.5.2).
- Zoek de kweek- en proefdieren uit het "oude sediment". Breng daartoe een schep "oud sediment" over in een ontwikkelschaal en zoek alleen de volwassen wormen uit. Breng de volwassen wormen met behulp van een fontax-pincet over in een 50 ml-bekerglas gevuld met DSW. Tel de volwassen wormen. Breng het "oude sediment" met daarin de cocons en jonge wormen, vanuit de ontwikkelschaal over in een zeef (425 μm). Zeef het sediment en zand door de zeef. Haal hiervoor de zeef heen en weer in een ontwikkelschaal gevuld met DSW. Breng achtergebleven jonge wormen en cocons (deze worden niet gebruikt) over in een andere ontwikkelschaal gevuld met DSW. Verwijder de jonge wormen uit de ontwikkelschaal met behulp van een opzuigbuisje. Breng de jonge wormen over in een 50 ml-bekerglas gevuld met DSW. Tel de jonge wormen. Verzamel uit al de potten minimaal 500 jonge wormen. Verzamel geen cocons. Zet de volwassen wormen over op vers kweekmedium. Het wordt afgeraden om volwassen wormen met behulp van een zeef uit te zoeken

omdat de kans op beschadiging van de staart groot is.

- Breng 2*25 jonge wormen over in twee 3 l-bekerglazen met vers kweekmedium voor het continueren van de kweek.
- Breng 4*100 jonge wormen in vier 3 l-bekerglazen met vers kweekmedium voor het opkweken van de wormen ten behoeve van toxiciteitsexperimenten.
- Reinig de vuile bekerglazen.

6.6 Kwaliteitscontrole

Overmatige sterfte, veranderingen in de ontwikkelingsduur en in de grootte en morfologie van de oligochaeten kunnen een aanwijzing zijn voor kwaliteitsverlies van de kweek. Noteer deze afwijkingen.

Dankwoord

Dr. P.F.M. Verdonschot en mw. J. Schot van het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek willen wij bedanken voor hun adviezen ten aanzien van het kweken van oligochaeten en hun bijdragen aan het bemonsteren en determineren van *B. sowerbyi*.

Dr. P. Leewangh en S. Crum van het Staringcentrum willen we bedanken voor hun hulp en gastvrijheid bij het bepalen van de gehalten ethyl-chloorpyrifos. Voor het uitvoeren van de overige chemische analyses danken we medewerkers van de afdeling Fysische en Chemische Technieken. Tot slot een woord van dank voor de andere medewerkers van de afdeling Aquatische Ecotoxicologie voor het ondersteunende werk bij de kweek van *B. sowerbyi*.

REFERENTIES

Aston, R.J., 1966.

Temperature relations, respiration and burrowing in *Branchiura sowerbyi* Beddard (Tubificidae Oligochaeta). Unpublished Ph.D. Thesis. Univ. of Reading. Gerefereerd in Brinkhurst and Jamieson, 1971.

Aston, R.J. and A.G.P. Milner, 1981/1982.

Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture*, **26**, pp 155-160.

Beddard, F.E., 1892.

A new branchiate Oligochaete (*Branchiura sowerbyi*). *Q. Jl. Micros. Sci.*, **33**, pp 325-341.

Brinkhurst, R.O., 1971.

A guide for the indentification of British aquatic oligochaeta. Freshwater Biological Association, Scientific publication, **no.22**, second edition, revised.

Brinkhurst, R.O and B.G.M. Jamieson, 1971.

Aquatic Oligochaeta of the world. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Brinkhurst, R.O. and D.G. Cook, 1974.

Aquatic earthworms (Annelida: Oligochaeta). In: *Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates*, Hart, C.W.Jr. and S.L.H. Fuller, pp 143-156.

Casellato, S., 1984.

Life-cycle and karyology of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, **115**, pp 65-69.

Casellato, S. and P. Negrisola, 1989.

Acute and chronic effects of an anionic surfactant on some freshwater tubificid species. *Hydrobiologia*, **180**, 243-252.

Chapman, P.M., M.A. Farell and R.O. Brinkhurst, 1982.

Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, **2**, 47-67.

Chapman, P.M. and R.O. Brinkhurst, 1984.

Lethal and sublethal tolerances of aquatic oligochaetes with reference to their use as a biotic index of pollution. *Hydrobiologia*, **115**, 139-144.

EG, 1984a.

Acute toxicity for *Daphnia*. In: *Official Journal of the European Communities L 251*, European Community, Bruxelles, Belgium.

- EG, 1984b.
Acute toxicity for fish. In: Official Journal of the European Communities L 251, European Community, Bruxelles, Belgium.
- Emerson, K., R.C. Russo, R.E. Lund and R.V. Thurston, 1975.
Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board. Can., **32**, 2379-2383.
- Gulley, D.D., A.M. Boelter and H.L. Bergman, 1990. Toxstat release 3.3. University of Wyoming, Laramie, Wyoming 82071, U.S.A.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston, 1977.
Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., **11**, pp 714-719.
Correction: **12**, p 417, 1978.
- Hoekstra, J.A., 1989.
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM), Bilthoven.
- Hoven, W. van, 1975.
Aspects of the respiratory physiology and oxygen preferences of four aquatic oligochaetes (Annelida). Zool. Afr., **10**, 29-46.
- Kawaguti, S., 1936.
On the respiration of *Branchiura sowerbyi*. Mem. Fac. Sci. Agr. **14**, pp 91-115.
- Maas-Diepenveen, J.L. en C. van de Guchte, 1990.
Ecotoxicologische testen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems; Methodebeschrijvingen. RIZA werkdokument nr. 90.173X. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.
- Naqvi, S.M.Z., 1973.
Toxicity of twenty-three insecticides to a tubificid worm *Branchiura sowerbyi* from the Mississippi delta. J. Econ. Entomol. **66**, 70-74.
- OECD, 1984a.
OECD 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test. In: Guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris, France.
- OECD, 1984b.
OECD 203: Fish, acute toxicity test. In: Guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris, France.
- Roghair, C.J., M.A.H. Wolters en M.P.A. Huijs, 1991.
Ontwikkeling van sedimenttoxiciteits-toetsen; I: De acute toxiciteit van sediment gecontamineerd met chloorpyrifos voor *Daphnia magna* en *Chironomus riparius*. Rapport nr. 719102004. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne.

- Roghair , C.J., M.A.H. Wolters en M.P.A.Huijs, 1993.
Ontwikkeling van sedimenttoxiteits-toetsten; II: De chronische toxiciteit van sediment gecontamineerd met chloorpyrifos voor *Daphnia magna*.
Rapport nr. 719102012. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne.
- Sobhana, S. and N. Balakrishnan Nair, 1984.
Observations on the breeding frequency of *Branchiura sowerbyi* Beddard and *Limnodilus hoffmeisteri* Clararede (Annelida: Oligochaeta: Tubificidae). *Comp. Physiol. Ecol.*, **9**, pp 302-305.
- Standard Methods, 1980a.
Nitrite and nitrate. In: Standard methods for the examination of water and waste water, 15th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p 378.
- Standard Methods, 1980b.
Chloride. In Standard methods for the examination of water and waste water, 15th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p 273.
- Verdonschot, P.F.M.
Instituut voor Bos en Natuuronderzoek (IBN), Broekhuizerlaan 2, 3596 NS Leersum.
- Verdouw, H., C.J.A. Echteveld en E.M.G. Dekkers, 1978.
Ammonium determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, **12**, pp 399-402.

Tabel 1: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een acute toxiciteits-experiment met *B. sowerbyi* in DSW; 1e experiment, code 91/P023.

| | |
|---------------------------|--|
| dosering | semi-statisch |
| duur belasting | 168 uur |
| verversing | op t = 48 en t = 96 uur |
| concentraties | controle - 0,0 - 0,010 - 0,032 - 0,10 - 0,32 - 1,0 - 2,0 mg/l |
| leeftijd wormen | serie A: > 5 maanden*; serie B: 5 maanden; serie C: 2,5 maand |
| lengte wormen | serie A: lang; serie B en C: middellang (B en C van gelijke lengte) |
| dieren/groep | serie A: 5; serie B: 10; serie C: 10 |
| groepen/concentratie | 2 |
| toetsvolume | 250 ml |
| beluchting | niet |
| temperatuur | 23 +/- 2 °C in de labruimte |
| belichting | geen: toetsvaten staan in afgesloten kartonnen dozen |
| voedsel | geen |
| zuurstof-meting | bij aanvang van de blootstelling in de controle en alle concentraties in één groep en voor verversing in de controle en alle concentraties in beide groepen; met behulp van een WTW Oxi-96 zuurstofmeter |
| pH-meting | zie zuurstofmeting; met behulp van een WTW pH-96 pH-meter |
| toxicologische parameters | sterfte, uiterlijk en gedrag (alle afwijkende vormen die waargenomen worden), met behulp van binoculair |
| observatietijden | t = 24, 48, 72, 96 en 168 uur |
| acclimatisatie-duur | 2 weken voor aanvang van de blootstelling (zonder voedsel) |

* Deze dieren zijn afkomstig uit het veld. De dieren van serie B en C zijn gekweekt in het eigen laboratorium.

Tabel 2: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een toxiciteits-experiment met *B. sowerbyi* in DSW; 2e experiment, code 91/P064.

| | |
|---------------------------|---|
| dosering | semi-statisch |
| duur belasting | 3 weken |
| verversing | 3 */week (maandag, woensdag en vrijdag) |
| concentraties | controle - 0,0 - 0,00032 - 0,0010 - 0,0032 - 0,010 - 0,032 - 0,10 - 0,32 - 1,0 mg/l |
| leeftijd wormen | ca. 6 maanden |
| lengte wormen | middelbare lengte, in alle concentraties gelijk |
| dieren/groep | 8 |
| groepen/concentratie | 2 + 2 (zie voedsel) |
| toetsvolume | 250 ml |
| beluchting | niet |
| temperatuur | 23 +/- 2 °C in de labruimte |
| belichting | geen: toetsvaten staan in afgesloten kartonnen dozen |
| voedsel | groepen A en B: geen; groepen C en D: 3*/week met ontbonden onbespoten sla en gedroogde koemest |
| zuurstof-meting | bij aanvang van de blootstelling in de controle en alle concentraties in de A- en C-groep en voor verversing in de controle en alle concentraties in alle groepen; met behulp van een WTW Oxi-96 zuurstof-meter |
| pH-meting | zie zuurstofmeting; met behulp van een WTW pH-96 pH-meter |
| toxicologische parameters | sterfte, uiterlijk en gedrag (alle afwijkende vormen die waargenomen worden) met behulp van binoculair |
| observatietijden | 3 */week (maandag, woensdag en vrijdag) |
| acclimatisatie-duur | 3 dagen voor aanvang van de blootstelling (zonder voedsel) |

Tabel 3: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en toxicologische parameters in een toxiciteits-experiment met *B. sowerbyi* in sediment; code 91/P026.

| | |
|---------------------------|--|
| dosering | semi-statisch |
| duur belasting | 3 weken |
| verversing | op t = 48 uur (op een medium van 48 uur oud), 1 week en 2 weken (op vers medium) |
| concentraties | controle - 0,0 - 3,2 - 10 - 32 - 100 - 320 - 1000 mg/kg ds * |
| leeftijd wormen | ca. 6 maanden |
| lengte wormen | middelbare lengte, in alle concentraties gelijk |
| dieren/groep | 5 |
| groepen/concentratie | 2 |
| toetsvolume | 250 ml |
| beluchting | niet |
| temperatuur | 23 +/- 2 °C in de labruimte |
| belichting | 16 uur licht en 8 uur donker |
| voedsel | na verversing van het medium op t = 1 week en 2 weken met gedroogde koemest |
| zuurstof-meting | dagelijks in de controle en alle concentraties (beide groepen) waarbij op de dagen van verversing van het medium, voor en na verversing is gemeten; met behulp van een WTW Oxi-96 zuurstof-meter |
| pH-meting | zie zuurstofmeting; met behulp van een WTW pH-96 pH-meter |
| toxicologische parameters | sterfte, uiterlijk en gedrag (alle afwijkende vormen die waargenomen worden) met behulp van binoculair |
| observatietijden | op t = 48 uur, 1 week, 2 weken en 3 weken |
| acclimatisatie | geen |

* De nacht voor het verversen van het medium op t = 1 week is waterschade opgetreden in de labruimte waarin dit experiment werd uitgevoerd. Hierbij is leidingwater in de toetsvaten terechtgekomen. De toetsvaten met vers medium, welke gereed stonden voor het op vers medium zetten van de wormen, hebben ogenschijnlijk geen leidingwater ontvangen. Deze toetsvaten zijn gebruikt voor het verversen van het medium.

Tabel 4: Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leef-tijd > 5 maanden (in mg/l; nominale concentraties).

| scorings-tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-------------------|------------|-----------------|---------------|-----------------|------------|------------|
| 24 uur | > 2,0 | 1,0- 2,0 | 1,0- 2,0 | 1,0- 2,0 | ≥ 2,0 | 1,0 |
| 48 uur | > 2,0 | 0,10- 0,32 | 1,2 | 0,10- 0,32 | ≥ 2,0 | 0,10 |
| 72 uur | > 2,0 | 0,10- 0,32 | 0,10- 0,32 | 0,10- 0,32 | ≥ 2,0 | 0,10 |
| 96 uur | 1,8 | 0,032- 0,10 | 0,10- 0,32 | 0,032- 0,10 | 1,0 | 0,032 |
| 168 uur | 1,3 | 0,010- 0,032 | 0,10- 0,32 | 0,010- 0,032 | 1,0 | 0,010 |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 100 |
| 0,32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 2,0 | 0 | 0 | 0 | 60 | 100 | 100 | 100 | 100 |

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| | 168 uur | | | | 168 uur | | | |
| controle | -- | | | | -- | | | |
| 0,0 mg/l | 0 | | | | 0 | | | |
| 0,010 | 0 | | | | 0 | | | |
| 0,032 | 0 | | | | 100 | | | |
| 0,10 | 0 | | | | 100 | | | |
| 0,32 | 0 | | | | 100 | | | |
| 1,0 | 10 | | | | 100 | | | |
| 2,0 | 100 | | | | 100 | | | |

-- = niet vastgesteld

| conc. (mg/l) | pH | | | | | | zuurstofgehalte in mg/l | | | | | |
|-----------------|-------|------|--------|------|--------|------|-------------------------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | 0 uur | | 48 uur | | 72 uur | | 0 uur | | 48 uur | | 72 uur | |
| | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max |
| controle | 8,46 | 8,49 | ---- | ---- | ---- | ---- | 9,1 | 9,4 | --- | --- | --- | --- |
| 0,0 | 8,49 | ---- | 7,92 | 8,21 | 8,15 | 8,21 | 9,6 | --- | 7,3 | 8,3 | 7,6 | 7,7 |
| 0,010 | 8,50 | ---- | 8,02 | 8,24 | 8,07 | 8,17 | 9,7 | --- | 7,6 | 8,4 | 7,6 | 7,8 |
| 0,032 | 8,50 | ---- | 7,99 | 8,21 | 7,91 | 8,05 | 9,8 | --- | 7,5 | 8,3 | 6,9 | 7,6 |
| 0,10 | 8,50 | ---- | 7,84 | 8,19 | 8,07 | 8,14 | 9,8 | --- | 6,9 | 8,4 | 7,5 | 7,9 |
| 0,32 | 8,50 | ---- | 7,78 | 8,11 | 8,03 | 8,09 | 9,7 | --- | 6,6 | 8,2 | 7,7 | 7,8 |
| 1,0 | 8,46 | ---- | 7,51 | 7,81 | 7,60 | 7,92 | 9,8 | --- | 4,7 | 7,1 | 5,3 | 7,0 |
| 2,0 | 8,47 | ---- | 7,26 | 7,65 | 8,14 | 8,34 | 9,7 | --- | 2,7 | 6,2 | 7,8 | 8,4 |

---- = niet vastgesteld

De actuele concentraties bedragen 73 % van de nominale concentraties.

Tabel 5: Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leef-tijd 5 maanden (in mg/l; nominale concentraties).

| scorings-tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-------------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|------------|
| 24 uur | 1,1 | 0,032- 0,10 | 0,085 | 0,048 | 0,32 | 0,010 |
| 48 uur | 1,1 | 0,010- 0,032 | 0,042 | 0,010- 0,032 | 0,32 | 0,010 |
| 72 uur | 1,0 | 0,010- 0,032 | 0,038 | 0,010- 0,032 | 0,32 | 0,010 |
| 96 uur | 0,40* | < 0,010 | ---- | ---- | 0,032* | ---- |
| 168 uur | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

* = niet betrouwbaar vast te stellen

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 100 | 100 | 100 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 20 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 0 | 0 | 5 | 15 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 25 | 30 | 30 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| | 168 uur | | | | 168 uur | | | |
| controle | 0 | | | | 25 | | | |
| 0,0 mg/l | 20 | | | | 100 | | | |
| 0,010 | 20 | | | | 100 | | | |
| 0,032 | 70 | | | | 100 | | | |
| 0,10 | 100 | | | | 100 | | | |
| 0,32 | 60 | | | | 100 | | | |
| 1,0 | 100 | | | | 100 | | | |
| 2,0 | 100 | | | | 100 | | | |

Sterfte en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % {sterfte + afwijkend uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkingen aan de kop} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|---|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 15 | 30 | 35 | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,10 | 50 | 95 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| 0,32 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 100 | 5 | 15 |
| 1,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

| concentratie | % {sterfte + afwijkingen aan de kieuwen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkende lengte} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|--------|--------|--------|---|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 15 | 30 | 35 | 95 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| 0,10 | 50 | 95 | 100 | 100 | 0 | 0 | 5 | 40 |
| 0,32 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 5 | 35 |
| 1,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 25 | 100 | 100 | 100 |
| 2,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

| concentratie | % {sterfte + zwellingen} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,10 | 0 | 0 | 10 | 35 |
| 0,32 | 0 | 0 | 30 | 35 |
| 1,0 | 25 | 30 | 45 | 100 |
| 2,0 | 100 | 100 | 100 | 100 |

De actuele concentraties bedragen 73 % van de nominale concentraties.

Tabel 6: Overzicht van de resultaten van een acute toxiciteit-experiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P023: leef-tijd 2,5 maand (in mg/l; nominale concentraties).

| scorings-tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-------------------|------------|-----------------|------------|---------------|------------|------------|
| 24 uur | > 2,0 | 0,10- 0,32 | 0,20 | 0,10- 0,32 | ≥ 2,0 | 0,10 |
| 48 uur | 1,1 | 0,010- 0,032 | 0,063 | 0,017 | 0,32 | 0,010 |
| 72 uur | 0,89 | < 0,010 | 0,018 | < 0,010 | 0,32 | < 0,010 |
| 96 uur | 0,29* | < 0,010* | ---- | ---- | 0,032* | ---- |
| 168 uur | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

* = niet betrouwbaar vast te stellen

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur |
| controle | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 5 | 5 | 50 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 65 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 100 | 100 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 0 | 0 | 0 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 0 | 25 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| | 168 uur | | | | 168 uur | | | |
| controle | 70 | | | | 100 | | | |
| 0,0 mg/l | 80 | | | | 100 | | | |
| 0,010 | 100 | | | | 100 | | | |
| 0,032 | 90 | | | | 100 | | | |
| 0,10 | 90 | | | | 100 | | | |
| 0,32 | 100 | | | | 100 | | | |
| 1,0 | 100 | | | | 100 | | | |
| 2,0 | 100 | | | | 100 | | | |

| conc. (mg/l) | pH | | | | | | zuurstofgehalte in mg/l | | | | | |
|-----------------|-------|------|--------|------|--------|------|-------------------------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | 0 uur | | 48 uur | | 72 uur | | 0 uur | | 48 uur | | 72 uur | |
| | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max |
| controle | 8,46 | 8,49 | 8,26 | 8,48 | 8,34 | 8,35 | 9,1 | 9,4 | 8,3 | 8,9 | 8,2 | 8,2 |
| 0,0 | 8,49 | ---- | 8,29 | 8,48 | 8,33 | 8,34 | 9,6 | --- | 8,5 | 9,1 | 8,0 | 8,1 |
| 0,010 | 8,50 | ---- | 8,32 | 8,48 | 8,33 | 8,33 | 9,7 | --- | 8,7 | 9,1 | 8,0 | 8,1 |
| 0,032 | 8,50 | ---- | 8,31 | 8,50 | 8,33 | 8,35 | 9,8 | --- | 8,4 | 9,4 | 8,2 | 8,2 |
| 0,10 | 8,50 | ---- | 8,30 | 8,49 | 8,34 | 8,35 | 9,8 | --- | 8,6 | 9,5 | 8,2 | 8,2 |
| 0,32 | 8,50 | ---- | 8,28 | 8,46 | 8,35 | 8,35 | 9,7 | --- | 8,7 | 9,6 | 8,2 | 8,3 |
| 1,0 | 8,46 | ---- | 8,31 | 8,37 | ---- | ---- | 9,8 | --- | 8,8 | 9,3 | --- | --- |
| 2,0 | 8,47 | ---- | 8,37 | 8,37 | ---- | ---- | 9,7 | --- | 9,3 | 9,4 | --- | --- |

---- = niet vastgesteld

De actuele concentraties bedragen 73 % van de nominale concentraties.

Tabel 7: Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P064: wormen niet gevoerd (in mg/l; nominale concentraties).

| scorings- tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-----------------------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------|------------|
| 48 uur | > 1,0 | 0,010- 0,032 | 0,34 | 0,010- 0,032 | ≥ 1,0 | 0,010 |
| dag 7 | > 1,0 | 0,010- 0,032 | 0,017 | 0,017 | 0,32 | 0,010 |
| dag 14 | 0,32- 1,0 | 0,0032- 0,010 | 0,0032- 0,010 | 0,0032- 0,010 | 0,32 | 0,0032 |
| dag 21 | 0,53 | 0,0032- 0,010 | 0,0032- 0,010 | 0,0032- 0,010 | 0,32 | 0,0032 |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 * | 13 * |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 * |
| 0,0032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 100 | 100 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 0 | 0 | 0 | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 0 | 31 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

Sterfte en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % {sterfte + afwijkend uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkingen aan de kop} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|---|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 38 * | 13 * | 0 | 0 | 0 | 6 * |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 38 * | 0 | 0 | 0 | 13 * |
| 0,0032 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 6 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 19 * |
| 0,032 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 0,10 | 13 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 19 |
| 0,32 | 31 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 25 |
| 1,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + afwijkingen aan de kieuwen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkende lengte} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|---|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 38 * | 6 * | 0 | 0 | 0 | 6 * |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 25 * | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 6 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 0,10 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 13 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + zwellingen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + insnoeringen} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 * | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 * |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 13 | 6 | 6 |
| 0,32 | 0 | 0 | 0 | 6 | 19 | 38 | 6 | 13 |
| 1,0 | 0 | 38 | 100 | 100 | 100 | 31 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

De actuele concentraties bedragen 67 % van de nominale concentraties.

Tabel 8: Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 91/P064: wormen gevoerd (in mg/l; nominale concentraties).

| scorings- tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-----------------------|------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| 48 uur | > 1,0 | 0,032- 0,10 | 0,10- 0,32 | 0,032- 0,10 | ≥ 1,0 | 0,032 |
| dag 7 | > 1,0 | 0,010- 0,032 | 0,010- 0,032 | 0,010- 0,032 | 0,32 | 0,010 |
| dag 14 | 0,65 | 0,0032- 0,010 | 0,0046 | 0,0046 | 0,32 | 0,0010 |
| dag 21 | 0,61 | 0,0010- 0,0032 | 0,0022 | 0,0017 | 0,32 | 0,0010 |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 * | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 0,010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 0,032 | 0 | 0 | 0 | 6 * | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 0 | 13 | 81 | 88 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

Sterfte en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % {sterfte + afwijkend uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkingen aan de kop} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|---|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 6 * | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 13 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 44 * |
| 0,032 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 56 * |
| 0,10 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 19 * |
| 0,32 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |
| 1,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + afwijkingen aan de kieuwen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkende lengte} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|---|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 6 * | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 13 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,032 | 0 | 13 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,10 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,32 | 19 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1,0 | 75 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % (sterfte + insnoeringen) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0 mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,00032 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0010 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,010 | 0 | 0 | 6 * | 0 |
| 0,032 | 0 | 6 * | 6 * | 19 * |
| 0,10 | 0 | 6 * | 0 | 6 * |
| 0,32 | 6 | 0 | 0 | 6 * |
| 1,0 | 69 | 13 | 81 | 88 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

De actuele concentraties bedragen 67 % van de nominale concentraties.

Tabel 9: Overzicht van de resultaten van een toxiciteitsexperiment met *B. sowerbyi* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in een sediment/water-systeem; code 91/P026 (in mg/kg ds; nominale concentraties).

| scorings- tijdstip | LC50 1) | EC50 2) | EC50 3) | EC50 4) | NOLC 1) | NOEC 4) |
|-----------------------|------------|------------|--------------|--------------|------------|------------|
| 48 uur | > 1000 | > 1000 | 320- 1000 | 320- 1000 | 320 | 320* |
| dag 7 | > 1000 | 32- 100 | 32- 100 | 32- 100 | 320 | 32 |
| dag 14 | 185 | 10- 32 | 32- 100 | 10- 32 | 32 | 10 |
| dag 21 | 74 | 10- 32 | 32- 100 | 10- 32 | 32 | 10 |

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit en afwijkend gedrag

3) E = mortaliteit en afwijkend uiterlijk

4) E = mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

* = niet betrouwbaar vast te stellen

Sterfte, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % sterfte op diverse tijdstippen | | | | % (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|----------------------------------|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 0 | 0 | 10 * | 10 * | 20 * | 0 | 20 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 20 * | 10 * |
| 32 | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 50 * | 10 * | 100 | 100 |
| 100 | 10 * | 10 * | 60 | 100 | 30 * | 100 | 100 | 100 |
| 320 | 0 | 0 | 50 | 80 | 20 * | 100 | 100 | 100 |
| 1000 | 20 | 40 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| conc. (mg/kg ds) | pH | | | | | | zuurstofgehalte in mg/l | | | | | |
|---------------------|-------|------|---------|------|--------------|------|-------------------------|-----|---------|-----|--------------|-----|
| | 0 uur | | 168 uur | | gehele toets | | 0 uur | | 168 uur | | gehele toets | |
| | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max | min | max |
| controle | 7,63 | 7,72 | 7,97 | 8,07 | 7,47 | 8,07 | 0,9 | 2,1 | 3,2 | 3,9 | 0,0 | 4,1 |
| 0,0 | 7,48 | 7,77 | 7,93 | 8,14 | 7,48 | 8,14 | 1,0 | 2,5 | 2,4 | 4,7 | 0,0 | 5,1 |
| 3,2 | 7,67 | 7,80 | 7,93 | 8,11 | 7,64 | 8,11 | 1,4 | 2,9 | 2,6 | 4,3 | 0,0 | 4,3 |
| 10 | 7,61 | 7,75 | 7,91 | 8,18 | 7,56 | 8,18 | 1,8 | 2,9 | 2,8 | 4,2 | 0,0 | 4,2 |
| 32 | 7,63 | 7,74 | 7,98 | 8,18 | 7,63 | 8,18 | 0,4 | 2,9 | 3,1 | 4,5 | 0,0 | 4,5 |
| 100 | 7,62 | 7,71 | 8,13 | 8,20 | 7,60 | 8,20 | 0,6 | 2,5 | 4,0 | 4,6 | 0,0 | 4,6 |
| 320 | 7,67 | 7,81 | 8,17 | 8,26 | 7,59 | 8,26 | 0,4 | 2,7 | 4,0 | 4,9 | 0,0 | 4,9 |
| 1000 | 7,67 | 7,73 | 8,22 | 8,22 | 7,52 | 8,22 | 0,4 | 2,9 | 5,5 | 5,5 | 0,0 | 5,5 |

Sterfte en afwijkend gedrag

| concentratie | % {sterfte + afwijkend gedrag} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + meer in elkaar gerold} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|---|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 0 | 0 | 10 * | 10 * | 0 | 0 | 10 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * |
| 32 | 0 | 10 * | 100 | 100 | 0 | 10 * | 100 | 100 |
| 100 | 10 * | 100 | 100 | 100 | 10 * | 10 * | 100 | 100 |
| 320 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 1000 | 20 | 100 | 100 | 100 | 20 | 70 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + traag} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|---|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 0 | 0 | 10 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * |
| 32 | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 100 | 10 * | 100 | 100 | 100 |
| 320 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1000 | 20 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

Sterfte en afwijkend uiterlijk

| concentratie | % {sterfte + afwijkend uiterlijk} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkingen aan de kop} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|---|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 20 * | 0 | 20 * | 10 * | 0 | 0 | 10 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 20 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * |
| 32 | 50 * | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 100 | 30 * | 100 | 100 | 100 | 10 * | 100 | 100 | 100 |
| 320 | 20 * | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 80 |
| 1000 | 100 | 100 | 100 | 100 | 20 | 100 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + afwijkingen aan de kieuwen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + afwijkende lengte} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|---|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 20 * | 0 | 10 * | 10 * | 0 | 0 | 10 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * |
| 32 | 40 * | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 100 | 30 * | 10 * | 100 | 100 | 10 * | 10 * | 60 | 100 |
| 320 | 20 * | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 50 | 80 |
| 1000 | 100 | 60 | 100 | 100 | 40 | 60 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

| concentratie | % {sterfte + insnoeringen} op diverse tijdstippen | | | | % {sterfte + bloedingen} op diverse tijdstippen | | | |
|--------------|--|-------|--------|--------|--|-------|--------|--------|
| | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 | 48 uur | dag 7 | dag 14 | dag 21 |
| controle | 0 | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 0,0 mg/kg ds | 0 | 10 * | 20 * | 20 * | 0 | 10 * | 20 * | 20 * |
| 3,2 | 0 | 0 | 20 * | 10 * | 0 | 0 | 10 * | 10 * |
| 10 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 20 * | 10 * |
| 32 | 10 * | 10 * | 10 * | 10 * | 0 | 10 * | 10 * | 10 * |
| 100 | 10 * | 10 * | 60 | 100 | 10 * | 10 * | 60 | 100 |
| 320 | 0 | 0 | 50 | 80 | 0 | 0 | 50 | 80 |
| 1000 | 20 | 50 | 100 | 100 | 20 | 40 | 100 | 100 |

* = (deels) niet concentratie gerelateerd effect

Tabel 10: Gemeten CPF-concentraties in bovenstaand water (C_w) en sediment (C_s) direct na verversen (dag 0) en voor de volgende verversing (dag 7) in het experiment met sediment; code 91/P026.

| | concentratie | C_w in mg/l | C_s in mg/kg | C_s/C_w in l/kg |
|-------|--------------|---------------|----------------|-------------------|
| dag 0 | 3,2 mg/kg | 0,003 | 1,8 | 617 |
| | 32 | 0,035 | 19 | 543 |
| | 320 | 0,412 | 170 | 413 |
| dag 7 | 3,2 mg/kg | 0,001 | 1,8 | 1800 |
| | 32 | 0,012 | 19 | 1608 |
| | 320 | 0,084 | 171 | 2036 |

Tabel 11:

Gemeten minimum- en maximum-waarden van nitriet (in mg N-NO₂/l), nitraat (in mg N-NO₃/l), ammonium (in mg N-NH₄/l) en chloride (in mg Cl/l) in bovenstaand water van de sediment/water-systemen (code 91/P026). Tevens is de berekende ammoniak-concentratie vermeld (in mg NH₃/l).

| | minimum t=0 uur | maximum t=0 uur | minimum t= dag 7 | maximum t= dag 7 |
|------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| - nitriet | 0,003 | 0,007 | 0,007 | 0,008 |
| - nitraat | 0,03 | 0,18 | 0,01 | 0,06 |
| - ammonium | 21,8 | 25,0 | 17,5 | 19,1 |
| * ammoniak | 0,40 | 0,95 | 0,31 | 0,99 |
| - chloride | 82 | 84 | 92 | 106 |

Tabel 12: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: medium, verversing en voeding; code 91/P061.

| | | |
|-----------------------|---|---|
| behandeling: | | |
| - medium | groep A, B, D en E: | 180 ml zand + 63 ml SW* + 250 ml DSW (3:1:4) |
| | groep C: | 0 ml zand + 250 ml SW* + 250 ml DSW (0:4:4) |
| - verversing medium | groep A, C, D en E: | 1 x per maand |
| | groep B: | geen verversing** |
| - voeding | 1 x per twee weken: | |
| | groep A, B en C: | gedroogde koemest en ontbonden sla |
| | groep D: | gedroogde koemest |
| | groep E: | ontbonden sla |
| duur experiment | 6 maanden met uitzondering van groep B (welke bestaat uit 6 toetsvaten): B1: 1 maand; B2: 2 maanden ... B6: 6 maanden | |
| leeftijd wormen | jonger dan 1 maand | |
| dieren/groep | 35 | |
| groepen/behandeling | 1 | |
| volume medium | 500 ml | |
| toetsvat | 1 l-bekerglas afgedekt met glasplaat | |
| beluchting | ja | |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C | |
| belichting | 12 L en 12 D | |
| zuurstof-meting | in alle groepen 1 x per maand; met behulp van een WTW Oxi-96 zuurstof-meter | |
| pH-meting | zie zuurstofmeting; met behulp van een WTW pH-96 pH-meter | |
| observatie-parameters | overleving, uiterlijk (met behulp van binoculair), groei (kwalitatief) en aantal cocons en juvenielen | |
| observatietijden | groep A, C, D en E: | 1 x per maand bij verversen |
| | groep B: | B1: na 1 maand; B2: na 2 maanden ... B6: na 6 maanden |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

** Groep B bestaat uit 6 toetsvaten die na 1 (B1), 2 (B2) ... 6 (B6) maanden wordt beoordeeld op de observatie-parameters. De wormen uit deze potten worden niet meer op een vers medium gezet.

Tabel 13 : Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: benodigd aantal wormen of cocons; code 91/P076.

| | |
|---------------------------|---|
| behandeling: | |
| - aantal cocons per groep | groep A: 100 cocons groep B: 50 cocons groep C: 25 cocons |
| - aantal wormen per groep | groep D: 75 wormen groep E: 25 wormen |
| duur experiment | cocons: 33 dagen; wormen: 63 dagen |
| leeftijd cocons en wormen | jonger dan 1 maand |
| groepen/behandeling | cocons: 3; wormen: 2 |
| medium | 563 ml zand + 188 ml SW* + 750 ml DSW (3:1:4) |
| volume medium | 1500 ml |
| toetsvat | 3 l-bekerglas afgedekt met glasplaat |
| verversing medium | cocons: niet; wormen: op t = 33 dagen |
| voedsel | 1 x per 2 weken gedroogde koemest en ontbonden sla; de hoeveelheid voedsel is per toetsvat gelijk |
| beluchting | ja |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C |
| belichting | 16 L en 8 D |
| zuurstof-meting | niet uitgevoerd |
| pH-meting | niet uitgevoerd |
| observatie-parameters | overleving, uiterlijk (met behulp van binoculair), groei (kwalitatief) en aantal cocons en juvenielen |
| observatietijden | cocons: t = 33 dagen; wormen: t = 33 en 63 dagen |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

Tabel 14: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: samenstelling van het kweekmedium; code 91/P085.

| | |
|-----------------------|--|
| behandeling: | |
| - medium | groep A: 250 ml zand + 0 ml SW* + 250 ml DSW (4:0:4) groep B: 188 ml zand + 63 ml SW* + 250 ml DSW (3:1:4) groep C: 125 ml zand + 125 ml SW* + 250 ml DSW (2:2:4) groep D: 63 ml zand + 188 ml SW* + 250 ml DSW (1:3:4) groep E: 0 ml zand + 250 ml SW* + 250 ml DSW (0:4:4) |
| duur experiment | 153 dagen (ca. 5 maanden) |
| leeftijd wormen | jonger dan 5 weken |
| kwaliteit wormen | alle wormen zijn voor inzetten gecontroleerd op hun kieuwen |
| dieren/groep | 35 |
| groepen/behandeling | 2 |
| volume medium | 500 ml |
| toetsvat | 1 l-bekerglas afgedekt met glasplaat |
| verversing medium | op t = 33, 67, 89 en 123 dagen |
| voedsel | 1 x per 2 weken gedroogde koemest en ontbonden sla |
| beluchting | ja |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C |
| belichting | 16 L en 8 D |
| zuurstof-meting | niet uitgevoerd |
| pH-meting | niet uitgevoerd |
| observatie-parameters | overleving, uiterlijk (met behulp van binoculair), groei (kwalitatief) en aantal cocons en juvenielen |
| observatietijden | t = 33, 67, 89, 123 en 153 dagen |
| acclimatisatie | 1 week voor inzetten werden de wormen op DSW gezet |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

Tabel 15: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: optimale dichtheid van de wormen; code 92/P001.

| | |
|---------------------------|--|
| behandeling: | |
| - aantal wormen per groep | groep A: 75 wormen groep B: 50 wormen groep C: 25 wormen |
| duur experiment | 81 dagen (ca. 2,5 maand) |
| leeftijd wormen | jonger dan 1 maand |
| groepen/behandeling | 3 |
| medium | 563 ml zand + 188 ml SW* + 750 ml DSW (3:1:4) |
| volume medium | 1500 ml |
| toetsvat | 3 l-bekerglas afgedekt met glasplaat |
| verversing medium | op t = 35 en 54 dagen |
| voedsel | 1 x per 2 weken gedroogde koemest en ontbonden sla; groep A krijgt 3* en groep B 2* de hoeveelheid gevoerd aan groep C |
| beluchting | ja |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C |
| belichting | 16 L en 8 D |
| zuurstof-meting | niet uitgevoerd |
| pH-meting | niet uitgevoerd |
| observatie-parameters | overleving, groei na 81 dagen (als gewicht van 10 wormen per groep) en aantal cocons en juvenielen |
| observatietijden | t = 35, 54 en 81 dagen |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

Tabel 16: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: samenstelling van het kweekmedium; code 92/P023.

| | |
|-----------------------|---|
| behandeling: | |
| - medium | groep A: 563 ml zand + 188 ml SW* + 750 ml DSW (9:3:12) groep B: 375 ml zand + 125 ml SW* + 1000 ml DSW (6:2:16) groep C: 188 ml zand + 63 ml SW* + 1250 ml DSW (3:1:20) groep D: 375 ml zand + 125 ml SW* + 500 ml DSW (6:2: 8) groep E: 188 ml zand + 63 ml SW* + 500 ml DSW (3:1: 8) |
| duur experiment | 125 dagen (ca. 4 maanden) |
| leeftijd wormen | jonger dan 1 maand |
| dieren/groep | 25 |
| groepen/behandeling | 2 |
| volume medium | 1500 ml (groep A-C), 1000 ml (groep D) en 750 ml (groep E) |
| toetsvat | 3 l-bekerglas afgedekt met glasplaat |
| verversing medium | op t = 42, 70, en 98 dagen |
| voedsel | 1 x per 2 weken gedroogde koemest en ontbonden sla |
| beluchting | ja |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C |
| belichting | 16 L en 8 D |
| zuurstof-meting | niet uitgevoerd |
| pH-meting | niet uitgevoerd |
| observatie-parameters | overleving, uiterlijk (met behulp van binoculair), groei (kwalita- tief), aantal cocons en aantal juvenielen |
| observatietijden | t = 42, 70, 98 en 125 dagen (= week 6, 10, 14 en 18) |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

Tabel 17: Experimentele condities, zuurstof- en pH-meting en observatie-parameters in een experiment met *B. sowerbyi* ter verbetering van de kweekmethode: kweekmedium en voeding; code 92/P024.

| | |
|-----------------------|---|
| behandeling: | |
| - medium | groep A: 563 ml zand + 188 ml SW* + 750 ml DSW (1:3:4) groep B-E: 375 ml zand + 375 ml SW* + 750 ml DSW (2:2:4) |
| - voeding | groep A en B: gedroogde koemest en ontbonden sla: 1 */ 2 weken groep C: ontbonden sla: 1 */2 weken groep D: ontbonden sla: 1 */week groep E: ontbonden sla: 3 */week De hoeveelheid gevoerde sla is per voertbeurt hetzelfde, dwz groep E krijgt 6 * de hoeveelheid van groep C |
| duur experiment | 69 dagen (ca. 2 maanden) |
| leeftijd wormen | jonger dan 1 maand |
| dieren/groep | 25 |
| groepen/behandeling | 3 |
| volume medium | 1500 ml |
| toetsvat | 3 l-bekerglas afgedekt met glasplaat |
| verversing medium | op t = 35 dagen |
| beluchting | ja |
| temperatuur | 21 +/- 2 °C |
| belichting | 16 L en 8 D |
| zuurstof-meting | niet uitgevoerd |
| pH-meting | niet uitgevoerd |
| observatie-parameters | overleving, uiterlijk (met behulp van binoculair), groei (kwalitatief) en aantal cocons en juvenielen |
| observatietijden | t = 35 en 69 dagen (5 en 10 weken) |

* SW = nat sediment afkomstig van het Schoonrewoerdse Wiel

Tabel 18: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met twee verschillende kweekmedia; code 91/P061.

| % sterfte op diverse tijdstippen, (cumulatief) | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| 3:1:4 (groep A) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 0:4:4 (groep C) | 11 | 17 | 17 | 23 | 23 | 29 |

| % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| 3:1:4 (groep A) | 18 | 9 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 0:4:4 (groep C) | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |

| % afwijkende lengte op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| 3:1:4 (groep A) | 0 | 12 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| 0:4:4 * (groep C) | 19 | 7 | 21 | 4 | 4 | 0 |

* De wormen van groep C waren over het algemeen groter dan die van groep A.

| % insnoeringen in het lichaam op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| 3:1:4 (groep A) | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| 0:4:4 (groep C) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| 3:1:4 (groep A) | 76 | 73 | 91 | 88 | 88 | 94 |
| 0:4:4 * (groep C) | 67 | 0 | 0 | 0 | 0 | 71 |

* De wormen van groep C waren over het algemeen groter dan die van groep A.

| | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | | | | totaal |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| 3:1:4 (groep A) | 0 | 0 | 19 | 35 | 41 | 4 | 99 |
| 0:4:4 (groep C) | 0 | 3 | 36 | 50 | 95 | 15 | 199 |

| | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | | | | totaal |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| 3:1:4 (groep A) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0:4:4 (groep C) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 81 | 82 |

Tabel 19: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende tijdstippen van verversen van het kweekmedium; code 91/P061.

| % sterfte op diverse tijdstippen | | | | | | |
|------------------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| observatie-tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| elk tijdstip (cumulatief, groep A) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| dag 28 (groep B1) | 6 | -- | -- | -- | -- | -- |
| dag 55 (groep B2) | -- | 3 | -- | -- | -- | -- |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 14 | -- | -- | -- |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 9 | -- | -- |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 9 | -- |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 3 |

| % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| observatie-tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| elk tijdstip (groep A) | 18 | 9 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| dag 28 (groep B1) | 9 | -- | -- | -- | -- | -- |
| dag 55 (groep B2) | -- | 0 | -- | -- | -- | -- |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 0 | -- | -- | -- |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 0 | -- | -- |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 0 | -- |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 0 |

| % afwijkende lengte op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| observatie-tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| elk tijdstip (groep A) | 0 | 12 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| dag 28 (groep B1) | 0 | -- | -- | -- | -- | -- |
| dag 55 (groep B2) | -- | 3 | -- | -- | -- | -- |
| 84 dagen (groep B3) | -- | -- | 13 | -- | -- | -- |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 100 | -- | -- |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 100 | -- |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 100 |

| % insnoeringen in het lichaam op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| observatie- tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| elk tijdstip (groep A) | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| dag 28 (groep B1) | 0 | -- | -- | -- | -- | -- |
| dag 55 (groep B2) | -- | 0 | -- | -- | -- | -- |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 3 | -- | -- | -- |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 0 | -- | -- |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 0 | -- |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 0 |

| % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| observatie- tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| elk tijdstip (groep A) | 76 | 73 | 91 | 88 | 88 | 94 |
| dag 28 (groep B1) | 85 | -- | -- | -- | -- | -- |
| dag 55 (groep B2) | -- | 94 | -- | -- | -- | -- |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 70 | -- | -- | -- |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 0 | -- | -- |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 0 | -- |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 0 |

| totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | | | | | totaal |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| observatie- tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| elk tijdstip (groep A) | 0 | 0 | 19 | 35 | 41 | 4 | 99 |
| dag 28 (groep B1) | 0 | -- | -- | -- | -- | -- | 0 |
| dag 55 (groep B2) | -- | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 1 | -- | -- | -- | 1 |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 1 | -- | -- | 1 |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 1 | -- | 1 |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 1 | 1 |

| | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | | | | totaal |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| observatie- tijdstippen | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| elk tijdstip (groep A) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| dag 28 (groep B1) | 0 | -- | -- | -- | -- | -- | 0 |
| dag 55 (groep B2) | -- | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| dag 84 (groep B3) | -- | -- | 0 | -- | -- | -- | 0 |
| dag 113 (groep B4) | -- | -- | -- | 0 | -- | -- | 0 |
| dag 140 (groep B5) | -- | -- | -- | -- | 1 | -- | 1 |
| dag 186 (groep B6) | -- | -- | -- | -- | -- | 0 | 0 |

Tabel 20: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende soorten voedsel; code 91/P061.

| % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| koemest + sla (groep A) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| koemest (groep D) | 6 | 6 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| sla (groep E) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

| % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| koemest + sla (groep A) | 18 | 9 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| koemest (groep D) | 3 | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| sla (groep E) | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 |

| % afwijkende lengte op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| koemest + sla (groep A) | 0 | 12 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| koemest (groep D) | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| sla (groep E) | 0 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 |

| % insnoeringen in het lichaam op diverse tijdstippen | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| koemest + sla (groep A) | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| koemest (groep D) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| sla (groep E) | 0 | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 |

| % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen |
| koemest + sla (groep A) | 76 | 73 | 91 | 88 | 88 | 94 |
| koemest (groep D) | 91 | 82 | 85 | 91 | 91 | 91 |
| sla (groep E) | 94 | 88 | 88 | 88 | 97 | 97 |

| totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | | | | | totaal |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| koemest + sla (groep A) | 0 | 0 | 19 | 35 | 41 | 4 | 99 |
| koemest (groep D) | 0 | 0 | 5 | 22 | 20 | 3 | 50 |
| sla (groep E) | 0 | 0 | 2 | 46 | 13 | 0 | 61 |

| totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | | | | | totaal |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| wormen gevoerd met | 28 dagen | 55 dagen | 84 dagen | 113 dagen | 140 dagen | 186 dagen | einde proef |
| koemest + sla (groep A) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| koemest (groep D) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| sla (groep E) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabel 21: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende dichtheden van de cocons; code 91/P076.

| dichtheid | % uitgekomen cocons, uitgaande van 1 worm per cocon na | | | | % afwijkingen aan de kieuwen na | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|---------------------------------|--|--|--|
| | 33 dagen | | | | 33 dagen | | | |
| 100 cocons (groep A1) | 24 | | | | 29 | | | |
| 100 cocons (groep A2) | 35 | | | | 9 | | | |
| 100 cocons (groep A3) | 34 | | | | 15 | | | |
| 50 cocons (groep B1) | 26 | | | | 31 | | | |
| 50 cocons (groep B2) | 16 | | | | 25 | | | |
| 50 cocons (groep B3) | 26 | | | | 23 | | | |
| 25 cocons (groep C1) | 32 | | | | 0 | | | |
| 25 cocons (groep C2) | 40 | | | | 0 | | | |
| 25 cocons (groep C3) | 8 | | | | 0 | | | |

| dichtheid | % afwijkende lengte na | | | | % insnoeringen in het lichaam na | | | |
|-----------------------|------------------------|--|--|--|----------------------------------|--|--|--|
| | 33 dagen | | | | 33 dagen | | | |
| 100 cocons (groep A1) | 8 | | | | 0 | | | |
| 100 cocons (groep A2) | 11 | | | | 3 | | | |
| 100 cocons (groep A3) | 21 | | | | 0 | | | |
| 50 cocons (groep B1) | 8 | | | | 0 | | | |
| 50 cocons (groep B2) | 0 | | | | 0 | | | |
| 50 cocons (groep B3) | 8 | | | | 0 | | | |
| 25 cocons (groep C1) | 13 | | | | 0 | | | |
| 25 cocons (groep C2) | 0 | | | | 0 | | | |
| 25 cocons (groep C3) | 100 | | | | 0 | | | |

| | | % wormen normaal na | | |
|--------------------------|-------------|---------------------|--|--|
| dichtheid | 33 dagen | | | |
| 100 cocons (groep A1) | 63 | | | |
| 100 cocons (groep A2) | 77 | | | |
| 100 cocons (groep A3) | 64 | | | |
| 50 cocons (groep B1) | 61 | | | |
| 50 cocons (groep B2) | 75 | | | |
| 50 cocons (groep B3) | 69 | | | |
| 25 cocons (groep C1) | 87 | | | |
| 25 cocons (groep C2) | 100 | | | |
| 25 cocons (groep C3) | 0 | | | |

Tabel 22: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende dichtheden van de wormen; code 91/P076.

| dichtheid | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | |
|----------------------|---|----------|--|--|---|----------|--|--|
| | 33 dagen | 63 dagen | | | 33 dagen | 63 dagen | | |
| 75 wormen (groep D1) | 7 | 9 | | | 7 | 3 | | |
| 75 wormen (groep D2) | 7 | 8 | | | 10 | 4 | | |
| 25 wormen (groep E1) | 4 | 8 | | | 25 | 4 | | |
| 25 wormen (groep E2) | 8 | 8 | | | 22 | 0 | | |

| dichtheid | % overige effecten op diverse tijdstippen | | | | % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | |
|----------------------|---|----------|--|--|---|----------|--|--|
| | 33 dagen | 63 dagen | | | 33 dagen | 63 dagen | | |
| 75 wormen (groep D1) | 0 | 0 | | | 86 | 88 | | |
| 75 wormen (groep D2) | 0 | 3 | | | 83 | 85 | | |
| 25 wormen (groep E1) | 0 * | 0 | | | 71 * | 88 | | |
| 25 wormen (groep E2) | 4 * | 4 | | | 66 * | 88 | | |

* Een aantal wormen was groter dan die van de groepen D1 en D2.

| dichtheid | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef |
|----------------------|---|----------|--|--------------------|---|----------|--|--------------------|
| | 33 dagen | 63 dagen | | | 33 dagen | 63 dagen | | |
| 75 wormen (groep D1) | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| 75 wormen (groep D2) | 0 | 7 | | 7 | 0 | 1 | | 1 |
| 25 wormen (groep E1) | 0 | 69 | | 69 | 0 | 16 | | 16 |
| 25 wormen (groep E2) | 0 | 87 | | 87 | 0 | 41 | | 41 |

Tabel 23: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende kweekmedia; code 91/P085.

| kweekmedia zand:sed:DSW | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | 6 | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | 3 | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 6 | 6 | 11 | 11 | 11 |
| 3:1:4 (groep B2) | 6 | 6 | 6 | 11 | 11 |
| 2:2:4 (groep C1) | 6* | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 2:2:4 (groep C2) | 14 | 17* | 14 | 14 | 14 |
| 1:3:4 (groep D1) | 0 | 14* | 6 | 11 | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 6* | 0 | 3 | 6 | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 3 | 9* | 3 | 3 | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 | 9* | 6 | 9 | -- |

-- niet vastgesteld
* vermoedelijk foutieve telling

| kweekmedia zand:sed:DSW | % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | | |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 |
| 3:1:4 (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 10 | 3 |
| 2:2:4 (groep C1) | 0 | 0 a | 0 | 15 | 3 |
| 2:2:4 (groep C2) | 0 | 0 a | 0 | 23 | 0 |
| 1:3:4 (groep D1) | 0 | 0 b | 0 b | ? | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 0 | 0 b | 0 b | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 3 c | 0 b | 0 c | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 c | 0 b | 0 c | ? | -- |

a Kieuwstructuur iets minder ontwikkeld dan van de groepen D en E.
b Kieuwstructuur beter ontwikkeld dan van de groepen B en C.
c Kieuwstructuur beter ontwikkeld dan van de overige groepen.
? Een aantal wormen had een wat rommelige kieuwstructuur en bloedingen aan de staart, er is niet bepaald hoeveel wormen dit effect hadden; deze groepen vallen op dit tijdstip af als mogelijkheid voor kweekmedium.
-- niet vastgesteld

| % afwijkende lengte op diverse tijdstippen | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | 100 a | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | 100 a | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 |
| 3:1:4 (groep B2) | 12 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 2:2:4 (groep C1) | 3 a | 0 a | 6 a | 0 | 0 |
| 2:2:4 (groep C2) | 20 a | 0 a | 10 a | 0 | 0 |
| 1:3:4 (groep D1) | 20 a | 0 a | 12 a | 0 | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 9 a | 0 a | 21 a | 0 | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 12 a | 0 a | 9 a | 0 | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 17 a | 0 a | 9 a | 0 | -- |

a De wormen van groep A waren na 33 dagen allemaal kleiner dan de wormen in de overige groepen. De wormen van de groepen C en D leken allemaal dikker dan de wormen van groep B. De wormen van groep E waren in het begin dikker dan alle overige groepen. Na 89 dagen werd dit effect niet meer waargenomen en waren deze wormen alleen nog dikker dan de wormen van groep B.

-- niet vastgesteld

| % insnoeringen in het lichaam op diverse tijdstippen | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3:1:4 (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2:2:4 (groep C1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 2:2:4 (groep C2) | 7 | 0 | 7 | 0 | 3 |
| 1:3:4 (groep D1) | 3 | 0 | 12 | ? | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 0 | 0 | 0 | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 0 | 0 | 0 | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 | 3 | 9 | ? | -- |

? Een aantal wormen had insnoeringen in het lichaam, er is niet bepaald hoeveel wormen dit effect hadden; deze groepen vallen op dit tijdstip af als mogelijkheid voor kweekmedium.

-- niet vastgesteld

| % bloedingen (niet aan de staart) op diverse tijdstippen | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3:1:4 (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2:2:4 (groep C1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2:2:4 (groep C2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 1:3:4 (groep D1) | 0 | 0 | 0 | 0 | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 0 | 0 | 0 | 0 | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 0 | 0 | 0 | 0 | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 | 0 | 0 | 0 | -- |

-- niet vastgesteld

| % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen |
| 4:0:4 (groep A1) | 0 | -- | -- | -- | -- |
| 4:0:4 (groep A2) | 0 | -- | -- | -- | -- |
| 3:1:4 (groep B1) | 94 | 91 | 83 | 73 | 89 |
| 3:1:4 (groep B2) | 82 | 94 | 91 | 79 | 86 |
| 2:2:4 (groep C1) | 91 | 97 | 91 | 82 | 91 |
| 2:2:4 (groep C2) | 59 | 83 | 69 | 63 | 80 |
| 1:3:4 (groep D1) | 77 | 86 | 73 | ? | -- |
| 1:3:4 (groep D2) | 85 | 100 | 76 | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E1) | 85 | 91 | 88 | ? | -- |
| 0:4:4 (groep E2) | 83 | 88 | 76 | ? | -- |

? Een aantal wormen had een wat rommelige kieuw-structuur, bloedingen aan de staart en insnoeringen in het lichaam, er is niet bepaald hoeveel wormen dit effect hadden; deze groepen vallen op dit tijdstip af als mogelijkheid voor kweekmedium.
-- niet vastgesteld

| | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | | | totaal |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen | einde proef |
| 4:0:4 (groep A1) | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| 4:0:4 (groep A2) | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 5 | 31 | 1 | 0 | 37 |
| 3:1:4 (groep B2) | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 |
| 2:2:4 (groep C1) | 0 | 3 | 67 | 6 | 0 | 76 |
| 2:2:4 (groep C2) | 0 | 15 | 112 | 3 | 1 | 131 |
| 1:3:4 (groep D1) | 0 | 0 | 81 | 4 | -- | 85 |
| 1:3:4 (groep D2) | 0 | 7 | 49 | 2 | -- | 58 |
| 0:4:4 (groep E1) | 0 | 23 | 82 | 0 | -- | 105 |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 | 17 | 65 | 0 | -- | 82 |

-- niet vastgesteld

| | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | | | totaal |
|----------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| kweekmedia zand:sed:DSW | 33 dagen | 67 dagen | 89 dagen | 123 dagen | 153 dagen | einde proef |
| 4:0:4 (groep A1) | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| 4:0:4 (groep A2) | 0 | -- | -- | -- | -- | 0 |
| 3:1:4 (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 34 | 0 | 34 |
| 3:1:4 (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 | 32 |
| 2:2:4 (groep C1) | 0 | 2 | 0 | 105 | 0 | 107 |
| 2:2:4 (groep C2) | 0 | 2 | 1 | 87 | 0 | 90 |
| 1:3:4 (groep D1) | 0 | 2 | 1 | 91 | -- | 94 |
| 1:3:4 (groep D2) | 0 | 1 | 0 | 110 | -- | 111 |
| 0:4:4 (groep E1) | 0 | 2 | 1 | 64 | -- | 67 |
| 0:4:4 (groep E2) | 0 | 3 | 0 | 57 | -- | 60 |

-- niet vastgesteld

Tabel 24: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende dichtheden van de wormen; code 92/P001.

| dichtheid | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | % afwijkende lengte op diverse tijdstippen | | |
|----------------------|---|----------|----------|--|----------|----------|
| | 35 dagen | 54 dagen | 81 dagen | 35 dagen | 54 dagen | 81 dagen |
| 75 wormen (groep A1) | 3 | 9* | 7 | 100 a | 100 b | ** |
| 75 wormen (groep A2) | 3 | 15 | 15 | 100 a | 100 b | ** |
| 75 wormen (groep A3) | 9* | 7 | 8 | 100 a | 100 b | ** |
| 50 wormen (groep B1) | 0 | 0 | 2 | 100 c | 100 c | ** |
| 50 wormen (groep B2) | 10 | 10 | 10 | 100 c | 100 c | ** |
| 50 wormen (groep B3) | 8 | 10 | 10 | 100 c | 100 c | ** |
| 25 wormen (groep C1) | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | ** |
| 25 wormen (groep C2) | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | ** |
| 25 wormen (groep C3) | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | ** |

- a Groep A kleiner dan de groepen B en C.
 b Groep A kleiner dan groep C, gelijk aan groep B.
 c Groep B kleiner dan groep C.
 * Vermoedelijk foutieve telling.
 ** Zie natgewicht bepaling.

| dichtheid | % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | natgewicht per worm in g op dag 81 (s = standaardafwijking) | |
|----------------------|---|----------|----------|---|--------|
| | 35 dagen | 54 dagen | 81 dagen | natgewicht | s |
| 75 wormen (groep A1) | 0 | 0 | 0 | 0,0255 | 0,0059 |
| 75 wormen (groep A2) | 0 | 0 | 0 | 0,0253 | 0,0023 |
| 75 wormen (groep A3) | 0 | 0 | 0 | 0,0280 | 0,0025 |
| 50 wormen (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 0,0287 | 0,0037 |
| 50 wormen (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 0,0253 | 0,0050 |
| 50 wormen (groep B3) | 0 | 0 | 0 | 0,0292 | 0,0041 |
| 25 wormen (groep C1) | 96 | 96 | 96 | 0,0374 | 0,0047 |
| 25 wormen (groep C2) | 100 | 100 | 96 | 0,0360 | 0,0037 |
| 25 wormen (groep C3) | 88 | 88 | 88 | 0,0384 | 0,0033 |

| dichtheid | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | totaal | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | totaal |
|-------------------------|--|-------------|-------------|----------------|--|-------------|-------------|----------------|
| | 35 dagen | 54 dagen | 81 dagen | einde proef | 35 dagen | 54 dagen | 81 dagen | einde proef |
| 75 wormen (groep A1) | 0 | 1 | 170 | 171 | 0 | 0 | 16 | 16 |
| 75 wormen (groep A2) | 0 | 0 | 121 | 121 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 75 wormen (groep A3) | 0 | 5 | 111 | 116 | 0 | 0 | 35 | 35 |
| 50 wormen (groep B1) | 0 | 20 | 148 | 168 | 0 | 1 | 20 | 21 |
| 50 wormen (groep B2) | 0 | 22 | 162 | 184 | 0 | 0 | 30 | 30 |
| 50 wormen (groep B3) | 0 | 29 | 117 | 146 | 0 | 0 | 44 | 44 |
| 25 wormen (groep C1) | 0 | 73 | 140 | 213 | 0 | 0 | 52 | 52 |
| 25 wormen (groep C2) | 0 | 71 | 125 | 196 | 0 | 1 | 51 | 52 |
| 25 wormen (groep C3) | 0 | 84 | 146 | 230 | 0 | 0 | 34 | 34 |

Tabel 25: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende kweekmedia; code 92/P023.

| kweekmedia zand:sed:DSW | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | |
|-------------------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--|-------------|-------------|--------------|
| | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 48 | 0 | 0 |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A2) | 12 | 12 | 12 | 12 | 5 | 41 | 0 | 0 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 20 | 8 | 8 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C1) | 4 | 4 | 4 | 4 | 17 | 29 | 0 | 21 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C2) | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 42 | 0 | 17 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 20 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D2) | 4* | 4* | 0 | 0 | 4 | 25 | 0 | 0 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E1) | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E2) | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 | 4 | 21 |

* vermoedelijk foutieve telling

| kweekmedia zand:sed:DSW | % overige effecten op diverse tijdstippen | | | | % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | |
|-------------------------------------|--|-------------|-------------|--------------|--|-------------|-------------|--------------|
| | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A1) | 0 | 20 | 0 | 0 | 84 | 32 | 100 | 100 |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A2) | 0 | 5 | 0 | 0 | 83 | 42 | 88 | 88 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B1) | 4 | 8 | 0 | 0 | 96 | 60 | 100 | 100 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B2) | 0 | 12 | 0 | 0 | 88 | 68 | 92 | 92 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 79 | 67 | 96 | 75 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 | 54 | 96 | 79 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D1) | 0 | 4 | 0 | 0 | 100 | 76 | 100 | 80 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D2) | 0 | 0 | 0 | 4 | 92 | 71 | 100 | 96 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E1) | 8 | 0 | 0 | 0 | 88 | 96 | 96 | 61 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E2) | 8 | 8 | 4 | 4 | 88 | 84 | 92 | 75 |

| kweekmedia zand:sed:DSW | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | | totaal |
|-------------------------------------|--|-------------|-------------|--------------|----------------|
| | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen | einde proef |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A1) | 4 | 58 | 73 | 5 | 140 |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A2) | 14 | 133 | 67 | 37 | 251 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B1) | 0 | 64 | 45 | 46 | 155 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B2) | 5 | 58 | 27 | 9 | 99 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C1) | 0 | 32 | 17 | 0 | 49 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C2) | 0 | 9 | 15 | 0 | 24 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D1) | 0 | 40 | 70 | 20 | 130 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D2) | 0 | 35 | 31 | 25 | 91 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E1) | 0 | 8 | 3 | 1 | 12 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E2) | 0 | 13 | 0 | 0 | 13 |

| kweekmedia zand:sed:DSW | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | | totaal |
|-------------------------------------|--|-------------|-------------|--------------|----------------|
| | 42 dagen | 70 dagen | 98 dagen | 125 dagen | einde proef |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A1) | 0 | 42 | 10 | 0 | 52 |
| 9:3:12 (Σ 24) (groep A2) | 0 | 13 | 36 | 2 | 51 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B1) | 0 | 5 | 16 | 0 | 21 |
| 6:2:16 (Σ 24) (groep B2) | 0 | 18 | 2 | 0 | 20 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C1) | 0 | 0 | 7 | 0 | 7 |
| 3:1:20 (Σ 24) (groep C2) | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D1) | 0 | 18 | 11 | 1 | 30 |
| 6:2:8 (Σ 16) (groep D2) | 0 | 38 | 10 | 2 | 50 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E1) | 0 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| 3:1:8 (Σ 12) (groep E2) | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 |

Tabel 26: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met twee verschillende kweekmedia; code 92/P024.

| kweekmedia zand:sed:DSW | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | |
|----------------------------|--|-------------|--|--|--|-------------|--|--|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| 3:1:4 (groep A1) | 4 | 4 | | | 0 a | 0 a | | |
| 3:1:4 (groep A2) | 0 | 4 | | | 0 a | 0 a | | |
| 3:1:4 (groep A3) | 0 | 0 | | | 0 a | 0 a | | |
| 2:2:4 (groep B1) | 4 | 4 | | | 0 | 4 | | |
| 2:2:4 (groep B2) | 16 | 12 | | | 38 | 32 | | |
| 2:2:4 (groep B3) | 24 | 24 | | | 0 | 11 | | |

a Deze wormen bezaten kortere kieuwen; dit effect wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de samenstelling van het medium en daarom niet als nadelig effect beschouwd.

| kweekmedia zand:sed:DSW | % overige effecten op diverse tijdstippen | | | | % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | |
|----------------------------|--|-------------|--|--|--|-------------|--|--|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| 3:1:4 (groep A1) | 100 a | 0 | | | 0 | 96 | | |
| 3:1:4 (groep A2) | 100 a | 0 | | | 0 | 96 | | |
| 3:1:4 (groep A3) | 100 a | 8 | | | 0 | 92 | | |
| 2:2:4 (groep B1) | 100 b | 8 | | | 0 | 84 | | |
| 2:2:4 (groep B2) | 0 | 5 | | | 46 | 51 | | |
| 2:2:4 (groep B3) | 21 | 5 | | | 55 | 60 | | |

a Deze wormen waren kleiner.

b Deze wormen hadden rode plekje's in het lichaam.

| kweekmedia zand:sed:DSW | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef |
|----------------------------|--|-------------|--|--------------------------|--|-------------|--|--------------------------|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| 3:1:4 (groep A1) | 0 | 118 | | 118 | 0 | 56 | | 56 |
| 3:1:4 (groep A2) | 0 | 46 | | 46 | 0 | 40 | | 40 |
| 3:1:4 (groep A3) | 0 | 101 | | 101 | 0 | 106 | | 106 |
| 2:2:4 (groep B1) | 0 | 51 | | 51 | 1 | 35 | | 36 |
| 2:2:4 (groep B2) | 0 | 92 | | 92 | 0 | 93 | | 93 |
| 2:2:4 (groep B3) | 0 | 98 | | 98 | 0 | 131 | | 131 |

Tabel 27: Overzicht van de resultaten van een kweek-experiment met *B. sowerbyi* met verschillende soorten voedsel; code 92/P024.

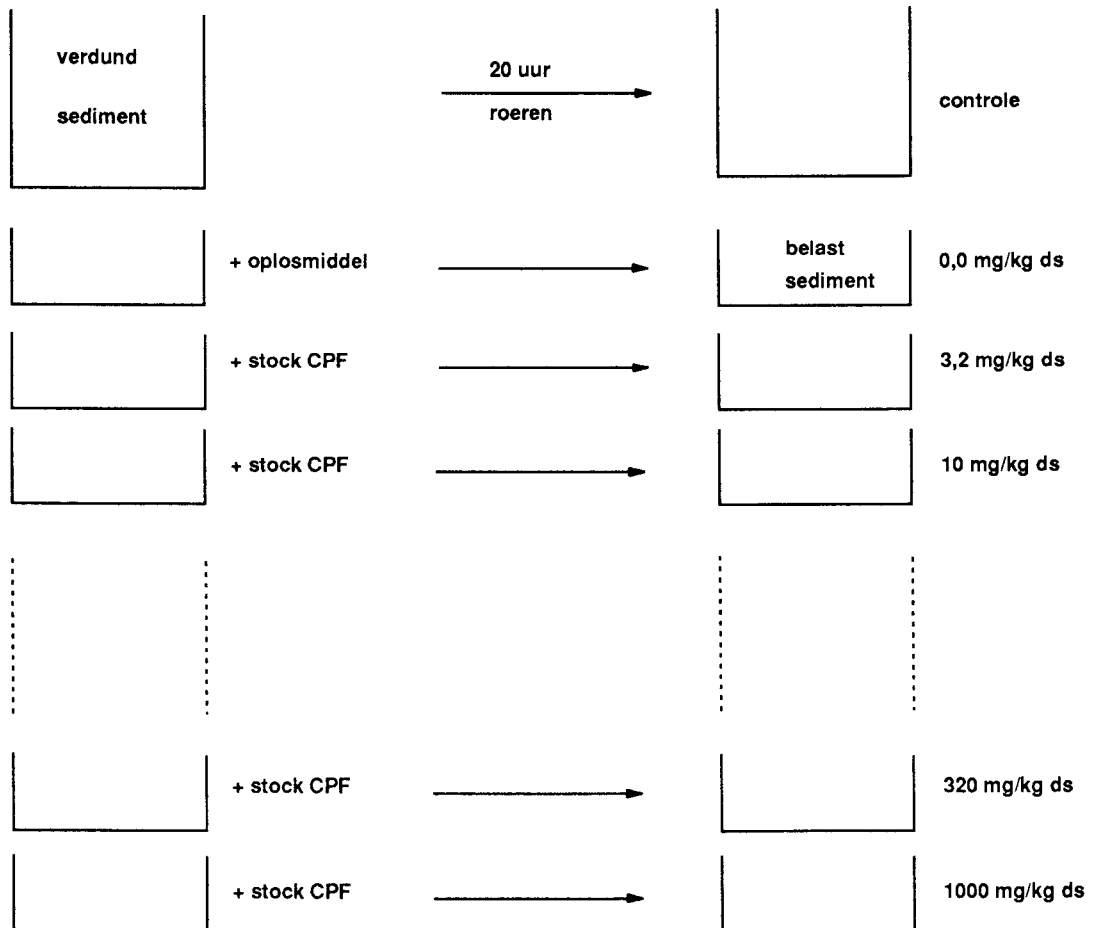
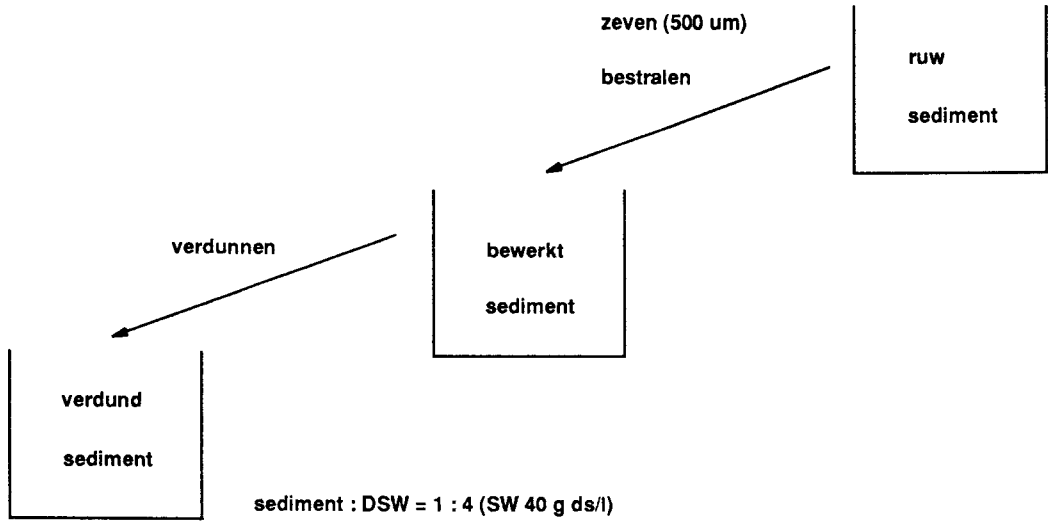
| wormen gevoerd met | % sterfte op diverse tijdstippen (cumulatief) | | | | % afwijkingen aan de kieuwen op diverse tijdstippen | | | |
|---|--|-------------|--|--|--|-------------|--|--|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B1) | 4 | 4 | | | 0 | 4 | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B2) | 16 | 12 | | | 38 | 32 | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B3) | 24 | 24 | | | 0 | 11 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C1) | 16 | 20 | | | 14 | 10 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C2) | 24 | 24 | | | 16 | 0 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C3) | 12 | 12 | | | 0 | 5 | | |
| sla 1x/week (groep D1) | 8 | 12 | | | 48 | 0 | | |
| sla 1x/week (groep D2) | 8 | 16 | | | 9 | 38 | | |
| sla 1x/week (groep D3) | 8 | 8 | | | 0 | 9 | | |
| sla 3x/week (groep E1) | 4 | 4 | | | 0 | 4 | | |
| sla 3x/week (groep E2) | 4 | 4 | | | 0 | 0 | | |
| sla 3x/week (groep E3) | 20 | 20 | | | 0 | 0 | | |

| wormen gevoerd met | % overige effecten op diversen tijdstippen | | | | % wormen normaal op diverse tijdstippen | | | |
|---|---|-------------|--|--|--|-------------|--|--|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B1) | 100 a | 8 | | | 0 | 84 | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B2) | 0 | 5 | | | 46 | 51 | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B3) | 21 | 5 | | | 55 | 60 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C1) | 5 | 5 | | | 65 | 65 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C2) | 5 | 11 | | | 55 | 65 | | |
| sla 1x/2 weken (groep C3) | 0 | 0 | | | 88 | 83 | | |
| sla 1x/week (groep D1) | 0 | 5 | | | 44 | 83 | | |
| sla 1x/week (groep D2) | 9 | 10 | | | 74 | 36 | | |
| sla 1x/week (groep D3) | 100 a | 0 | | | 0 | 83 | | |
| sla 3x/week (groep E1) | 29 | 4 | | | 67 | 88 | | |
| sla 3x/week (groep E2) | 38 | 0 | | | 58 | 96 | | |
| sla 3x/week (groep E3) | 100 a | 0 | | | 0 | 80 | | |

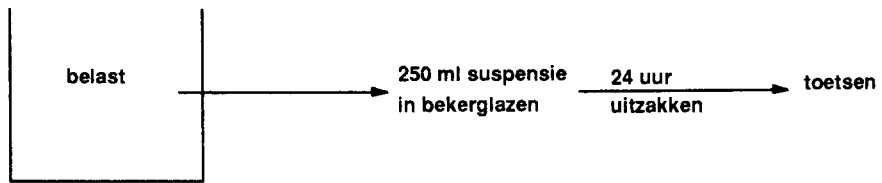
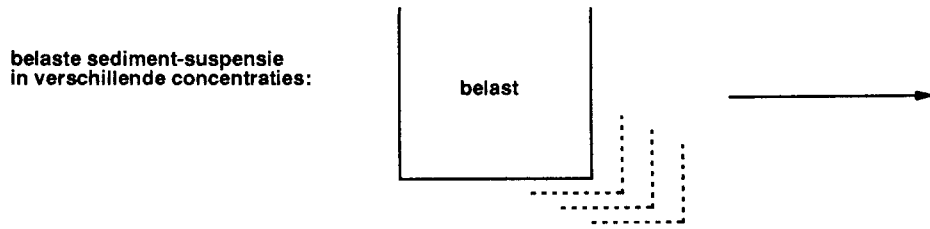
a

Deze wormen hadden rode plekje's in het lichaam.

| wormen gevoerd met | totaal aantal cocons op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef | totaal aantal juvenielen op diverse tijdstippen | | | totaal einde proef |
|---|--|-------------|--|--------------------------|--|-------------|--|--------------------------|
| | 35 dagen | 69 dagen | | | 35 dagen | 69 dagen | | |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B1) | 0 | 51 | | 51 | 1 | 35 | | 36 |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B2) | 0 | 92 | | 92 | 0 | 93 | | 93 |
| koemest + sla 1x/2 weken (groep B3) | 0 | 98 | | 98 | 0 | 131 | | 131 |
| sla 1x/2 weken (groep C1) | 0 | 35 | | 35 | 0 | 39 | | 39 |
| sla 1x/2 weken (groep C2) | 0 | 101 | | 101 | 0 | 65 | | 65 |
| sla 1x/2 weken (groep C3) | 0 | 6 | | 6 | 0 | 45 | | 45 |
| sla 1x/week (groep D1) | 0 | 50 | | 50 | 0 | 49 | | 49 |
| sla 1x/week (groep D2) | 0 | 122 | | 122 | 0 | 48 | | 48 |
| sla 1x/week (groep D3) | 0 | 39 | | 39 | 0 | 19 | | 19 |
| sla 3x/week (groep E1) | 0 | 134 | | 134 | 0 | 128 | | 128 |
| sla 3x/week (groep E2) | 0 | 124 | | 124 | 0 | 148 | | 148 |
| sla 3x/week (groep E3) | 0 | 80 | | 80 | 0 | 80 | | 80 |



Figuur 1: Schematische weergave van de bereiding van de sediment/water-systemen.



Vervolg Figuur 1

Samenstelling van Dutch Standard Water (DSW)

Aan gedemineraliseerd water (Elgastat-patroon) worden zouten toegevoegd waarbij de volgende concentraties aan ionen ontstaan.

| | | |
|-------------------------------|---|-------------|
| Ca ²⁺ | 54,5 mg/l | 1,36 mmol/l |
| Mg ²⁺ | 17,8 mg/l | 0,73 mmol/l |
| Na ⁺ | 27,4 mg/l | 1,19 mmol/l |
| K ⁺ | 7,8 mg/l | 0,20 mmol/l |
| Cl ⁻ | 96,3 mg/l | 2,72 mmol/l |
| HCO ³⁻ | 84,8 mg/l | 1,39 mmol/l |
| SO ₄ ²⁻ | 70,2 mg/l | 0,73 mmol/l |
| hardheid | 11,7 DH, overeenkomend met 210 mg/l CaCO ₃ | |
| pH | 8,2 ± 0,2 | |

Voorbehandeling van het sediment

Sediment uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW) wordt bemonsterd onder leiding van het RIZA zoals beschreven in Maas-Diepeveen en Van de Guchte (1990). Dit bemonsterde ruwe sediment wordt gezeefd over een 500 µm roest-vrij stalen zeef en bestraald met 10 kGy door Gammaster te Ede. Het sediment wordt in 3-liter PVC-emmers bewaard bij 4± 2 °C tot gebruik.

Karakteristieken van het Schoonrewoerdse Wiel-sediment (SW)

Bemonsteringsdatum sediment: 07.11.89

Behandeling sediment voor analyses: verdunning met DSWL (DSW op basis van Lindschoter grondwater) volgens sed/DSWL= 2:1 v/v, zeven over 500 µm r.v.s. zeef, bestralen met 10 kGy.

Analyses uitgevoerd door RIZA.

| | |
|---------------------------|--------|
| organisch C-gehalte | 9,4 % |
| anorganisch C-gehalte | 5,0 % |
| korrelgrootte KGF < 63 µm | 16,6 % |
| < 50 µm | 15,4 % |
| < 16 µm | 8,2 % |
| < 10 µm | 5,8 % |
| < 2 µm | 1,4 % |

| | |
|---------------|---------------------|
| zware metalen | gehalte in mg/kg ds |
|---------------|---------------------|

| | |
|----|-----|
| As | 8,8 |
| Cd | 2,0 |
| Cr | 24 |
| Cu | 30 |

| | |
|----|-------|
| Fe | 34600 |
| Hg | 0,2 |
| Mn | 1450 |
| Ni | 15 |
| Pb | 70 |
| Zn | 204 |

| PAKs | gehalte in mg/kg ds |
|------|---------------------|
|------|---------------------|

| | |
|--------|-------|
| BaP | 0,1 |
| BbF | 0,1 |
| BghiPe | 0,1 |
| BkF | < 0,1 |
| Flu | 0,2 |
| Inp | 0,1 |
