

Bruikbaarheid van de kroostoets als indicator voor herbiciden in oppervlaktewater



2000

32

**Bruikbaarheid van de kroostoets als
indicator voor herbiciden in oppervlaktewater**

Auteur: Frank de Jong

Arthur van Schendelstraat 816
Postbus 8090, 3503 RB Utrecht
Telefoon 030 232 11 99
Fax 030 232 17 66
E-mail stowa@stowa.nl
<http://www.stowa.nl>

Publicaties en het publicatie-
overzicht van de STOWA kunt u
uitsluitend bestellen bij:
Hageman Fulfilment
Postbus 1110
3300 CC Zwijndrecht
tel. 078 - 629 33 32
fax 078 - 610 42 87
e-mail: hff@wxs.nl
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en
een duidelijk afleveradres.
ISBN 90.5773.112.6

2000

32

TEN GELEIDE

In een eerder uitgevoerd STOWA-onderzoek is de veldbioassay met kroos aangemerkt als kansrijke biomonitoringstechniek voor herbiciden. Nader onderzoek naar praktische toepassingsmogelijkheden bleek noodzakelijk. In dit licht heeft STOWA aan het Centrum voor Milieukunde van de Universiteit Leiden (CML) opdracht gegeven om de bruikbaarheid van de kroostoets als indicator voor herbiciden in oppervlaktewater te onderzoeken.

Tegelijkertijd heeft het CML in opdracht van het ministerie van VROM een richtlijn opgesteld voor de uitvoering van veldbioassays ten behoeve van het oppervlaktewaterbeheer. De kroostoets is daarin als mogelijke toets voor herbiciden genoemd. Bij het opstellen van de richtlijn is ook veldonderzoek verricht. Relevante onderzoeksgegevens zijn -met dank aan VROM- ook opgenomen in het onderhavig rapport.

De kroostoets blijkt in zijn huidige vorm onvoldoende goed toepasbaar als veldtoets voor herbiciden. Reden hiervoor is dat kroos onder praktijkomstandigheden niet gevoelig genoeg is om de gehalten herbiciden die in oppervlaktewater worden aangetroffen en verwacht mogen worden aan te kunnen tonen.

Het project is uitgevoerd door een projectteam bestaande uit drs. F.M.W. de Jong (projectleider CML), R.J. van der Poll (analist CML) en drs. C.J. Houtman (student CML). Begeleiding van het project is verzorgd door een begeleidingscommissie bestaande uit: ir. S. van Breukelen (Hoogheemraadschap van Rijnland), dr. T.C.M. Brock (Alterra), ir. M.R.A. Clewits (STOWA), ing. W.P.J. van der Ende (Hoogheemraadschap van Delfland), ir. B. Moonen (Waterschap Groot Salland), ir. M.J.G. Talsma (STOWA) en dr. H.Th. Wolterbeek (Interfacultair Reactor Instituut, IRI). Het basismateriaal voor de experimenten is verkregen van het IRI (*Lemna minor*) en BASF (*Lemna gibba*). Plant Research International stelde een fotosynthesemeter beschikbaar.

Ik spreek de wens uit dat de resultaten van dit onderzoek een bijdrage leveren aan verder onderzoek naar praktisch toepasbare bioassays.

Ir. J.M.J. Leenen
Directeur STOWA

Utrecht, november 2000

Inhoudsopgave

I.	Samenvatting	VII
II.	Summary	IX
1.	Inleiding	1
2.	Werkwijze	5
	2.1 Onderzoeksvraag 1	5
	2.2 Onderzoeksvraag 2	5
	2.3 Onderzoeksvraag 3	8
3.	Resultaten laboratoriumexperimenten	9
	3.1 Blootstelling	9
	3.2 Gevoeligheid kroos	11
4.	De kroostoets in de praktijk	13
	4.1 Behoeftte bij de waterschappen	13
	4.2 Randvoorwaarden voor uitvoering van de kroostoets	13
	4.3 Veldexperimenten	16
5.	Conclusies, discussie, & aanbevelingen	17
	5.1 Conclusies	17
	5.2 Discussie	18
	5.3 Aanbevelingen	18
	Literatuur	19
	Bijlagen	21
1.	Selectie herbiciden	23
2.	Resultaten laboratoriumexperimenten	27
3.	Samenvatting literatuurgegevens herbiciden	49
4.	Richtlijn voor het uitvoeren van de veldbioassay met kroos	53
5.	Veldexperimenten	59

SAMENVATTING

DE KROOSTOETS

Bruikbaarheid van de kroostoets als indicator voor herbiciden in oppervlaktewater.

Uit metingen van het voorkomen van landbouwbestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater blijkt dat deze middelen op veel plaatsen regelmatig in het water worden aangetroffen. Op de helft van de locaties in de regionale wateren wordt hierbij ook de norm van één of meer stoffen (het MTR) overschreden. Vanwege de grote variatie in het voorkomen van middelen, middelengroepen, tijdstip en duur van blootstelling etc. is het niet mogelijk om altijd en overal alle middelen te meten. Het toepassen van veldbioassays zou daarom een belangrijke rol kunnen spelen bij het aantonen van bestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater. Bioassays zijn gevoelig voor groepen van middelen, geven een beeld van de blootstelling gedurende een bepaalde periode en geven direct aan dat er ook blootstelling van organismen heeft plaatsgevonden.

De drie belangrijkste groepen bestrijdingsmiddelen, insecticiden, herbiciden en fungiciden werken tegen evertebraten, onkruiden en schimmels. Als indicator voor de middelen tegen evertebraten wordt de watervlooiëntoets reeds toegepast. Voor de middelen tegen onkruiden is deze echter ongeschikt en is op dit moment nog geen toets voorhanden. Daarom worden in deze studie de mogelijkheden voor een herbicidentoets met kroos nader onderzocht.

Hierbij zijn de volgende onderzoeksvragen gesteld:

- I. Is er behoefte aan een kroostoets bij de waterschappen en aan welke eisen moet een dergelijke toets voldoen om te worden ingezet.

Als een kroostoets goed uitvoerbaar is, niet te duur en vooral goed interpreteerbare resultaten oplevert bestaat er zeker belangstelling bij een aantal waterschappen om een kroostoets uit te gaan voeren.

- II. Kan de kroostoets worden gebruikt voor het signaleren van effecten van herbiciden in het oppervlaktewater, dus bij blootstelling via het water?

Zowel uit de literatuur als uit de uitgevoerde experimenten blijkt dat een aantal herbiciden in het water tot groeiremming van klein kroos *Lemna minor* aanleiding geeft. De kroostoets is dus in principe geschikt om effecten van herbiciden te signaleren.

Uit de laboratoriumexperimenten blijkt verder dat er geen grote verschillen in gevoeligheid bestaan tussen *Lemna minor* en *Lemna gibba*. Ook laboratoriumexperimenten met *Lemna trisulca* zijn goed uitvoerbaar, maar de effecten lijken op basis van enkele oriënterende experimenten niet aanzienlijk te verschillen van de drijvende kroossoorten.

- III. Kunnen met de toets onder praktijkomstandigheden effecten van herbiciden worden aangetoond?

Uit laboratoriumproeven blijkt dat slechts een deel van de herbiciden effecten op kroos teweeg brengt, althans in concentraties gelijk of lager aan concentraties die op zouden treden wanneer de maximum velddosering in het oppervlaktewater terecht zou komen. Effecten bij 5% van de velddosering kunnen bij vijf van de 11 onderzochte herbiciden in het laboratorium worden

aangetoond. Bij concentraties lager dan 5% van de velddosering konden geen effecten (statistisch significant) worden aangetoond. Het is dus onwaarschijnlijk dat effecten bij minder dan 5% drift in het veld wel aangetoond kunnen worden. Daarnaast blijkt dat middelen die zich snel aan organisch materiaal binden, niet lang genoeg in het oppervlaktewater aanwezig zijn om tot effecten op de kroosgroei te kunnen leiden.

Uit de veldproeven blijkt dat er een relatief grote spreiding in de kroosgroei optreedt. Het is daarmee onwaarschijnlijk dat effecten van 5% drift in het veld statistisch significant kunnen worden aangetoond. Aangezien 5% drift op dit moment als maximum voor een aantal belangrijke teelten wordt verondersteld, is het dus onwaarschijnlijk dat er met de kroostoets in de huidige opzet effecten van normale drift van herbiciden kunnen worden aangetoond.

Uit het onderzoek wordt geconcludeerd dat de kroostoets in de huidige opzet niet geschikt is voor het aantonen van de te verwachten concentraties van herbiciden in het veld. Als de gevoeligheid van de toets zou kunnen worden vergroot, bijvoorbeeld door de variatie van de groei in het veld te verminderen zijn er mogelijk wel perspectieven.

Aanbevolen wordt om te onderzoeken of er andere aquatische plantensoorten zijn die gevoeliger zijn voor herbiciden dan kroos, en voor een breder scala aan herbiciden.

SUMMARY

THE DUCKWEED FIELD BIOASSAY

On the usefulness of the duckweed field bioassay as an indicator of herbicide contamination of surface waters

Monitoring shows that many Dutch watercourses are regularly contaminated with agricultural herbicides: at half the monitoring points on regional waterways water quality criteria (the MTR) are exceeded for one or more substances. Because of the wide range of (types of) compounds involved, the time and duration of exposure, and so on, it is not feasible to monitor all these substances in a continuous or comprehensive manner. Field bioassays might therefore provide a useful means of signalling herbicide contamination of surface waters. Bioassays provide sensitivity to broad groups of compounds, reflect overall exposure over a given period and directly signal any exposure of aquatic organisms.

There are three principal classes of pesticides: insecticides, herbicides and fungicides, used to control invertebrates, weeds, and moulds and other fungal infections, respectively. The water flea test is already employed for monitoring insecticide contamination of surface water. This test is inappropriate for herbicides, however, a purpose for which no other test is yet available. This study therefore examined the potential offered by a herbicide test using duckweed.

In particular, the study addresses the following three questions:

- I. Would water boards be interested in a duckweed test and what criteria would the test have to meet for it to practically implemented?

There are certainly a number of water boards interested in implementing a duckweed test, provided it is practicable and not too expensive and, above all, yields results that can be readily interpreted.

- II. Can the duckweed test be used as an indicator of the impact of surface water contamination with herbicides, i.e. exposure of aquatic organisms?

That the growth of Common duckweed (*Lemna minor*) is depressed by a number of waterborne herbicides is familiar from the literature and was confirmed in laboratory experiments. In principle, therefore, the duckweed test is suitable for signalling the impact of herbicide contamination. The laboratory trials also showed that there are no major differences in sensitivity between *Lemna minor* and *Lemna gibba*. Although laboratory tests with *Lemna trisulca* are also unproblematical, a series of pilot tests showed that the effects differed little from those obtained with the floating duckweed species.

- III. Can the test be used to signal the effects of herbicides under practical conditions?

In the laboratory trials only certain (groups of) herbicides were found to have a discernible impact on duckweed at concentrations up to those occurring in the event of complete drift of the maximum field dosage into an adjacent waterway. With 5% drift of the maximum field dose, effects were observed in the laboratory for five of the eleven herbicides investigated. Below this concentration no (statistically significant) effects were observed. It therefore seems unlikely that any effects can be demonstrated in the field at below 5% drift. In addition, herbicides that bind

readily to organic matter were found to remain available in watercourses too briefly to have a visible impact on duckweed growth.

The field trials also showed that there is a relatively large spread in duckweed growth, making it unlikely that any discernible effects of 5% drift will be statistically significant in the field situation. Because 5% drift is currently assumed to be the maximum for several major crops, it is therefore unlikely that the duckweed test, as currently conceived, can be used to signal the effects of normal herbicide drift.

The study concludes that the present elaboration of the duckweed test is unsuitable for demonstrating the presence of herbicides at the concentrations anticipated in the field.

It is recommended to investigate whether there are other species of aquatic plant that are more sensitive than duckweed to herbicides, as well as to a wider range of herbicides.

1 INLEIDING

Algemeen

Waterkwaliteitsbeheerders onderzoeken regelmatig de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater met behulp van chemische analysemethoden. Werden hierbij zo'n tien jaar geleden nog voornamelijk de organochloor-bestrijdingsmiddelen bemeten, tegenwoordig is het analysepakket veel breder. In de periode 1992-1996 zijn circa 150 van de 300 toegelaten werkzame stoffen van bestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater onderzocht. Hieruit blijkt dat in het oppervlaktewater op grote schaal bestrijdingsmiddelen voorkomen (CIW, 1999), waarbij in 1996 op meer dan de helft van de onderzochte locaties (56%) in de regionale wateren de Maximale Toelaatbare Risico waarde (MTR) voor minstens één bestrijdingsmiddel is overschreden. Landelijke normen (MTR-waarde, streefwaarde) voor het oppervlaktewater zijn gebaseerd op toxicologisch onderzoek. Ongeveer 20% van de onderzochte middelen blijken in regionale wateren daadwerkelijk hun MTR-waarde te overschrijden.

Beperkingen chemische methoden

Chemische analysemethoden hebben hun beperkingen. Met chemische methoden is slechts een beperkt gedeelte van de middelen te meten: soms zijn de analysemethoden niet ver genoeg ontwikkeld (of te duur) of helemaal niet beschikbaar. Uiteraard is alleen boven de detectiegrens te meten. Verder is bij chemische analyses het moment van monsternamen van doorslaggevend belang voor de gevonden gehalten en zijn metingen slechts momentopnames. Daarnaast zijn er veel onzekerheden zoals de daadwerkelijke blootstelling van organismen, de duur van de blootstelling, de piekbelasting en de effecten van meerdere middelen tegelijkertijd (combinatietoxiciteit).

Biologische methoden

Om aan de bovengenoemde problemen tegemoet te komen kunnen bioassays worden ingezet als indicator voor de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen. Een effect in de bioassay kan in dit geval aanleiding vormen voor gerichte metingen. Het aantonen van een causale relatie tussen de effecten in de bioassay en het voorkomen van bestrijdingsmiddelen vormt hierbij één van de te beantwoorden vragen (zie ook: ZHEW, 1997 & 1998). Ook kunnen bioassays indicaties geven over combinatietoxiciteit (zie: Maas & Kamps, 1998). Daarnaast doet de gesignaleerde overschrijding van de normen vermoeden dat effecten op biota in de praktijk verwacht mogen worden.

De hiervoor genoemde punten geven aanleiding voor het zoeken naar methoden waar via reacties van biota de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen kan worden opgespoord. Zo'n methode met bioassays heeft bovendien als voordeel dat duidelijk is dat de aanwezigheid van een middel tot een zeker effect leidt.

Voorafgaand onderzoek

Door de STOWA is een project uitgevoerd naar praktisch toepasbare veldtoetsen voor de neven-effecten van bestrijdingsmiddelen. Hierbij zijn 10 toetsen geselecteerd, waaronder de kroostoets (STOWA, 1997). Als mogelijkheden voor een veldbioassay worden alleen de watervlooiëntoets

en de kroostoets genoemd. De watervlooiëntoets wordt al in de praktijk toegepast (zie voor een overzicht: de Jong *et al.* 2000). De mogelijkheden voor de kroostoets zijn nog slechts beperkt onderzocht. De watervlooiëntoets zal vooral effecten laten zien bij die middelen die werkzaam zijn tegen evertebraten: insecticiden en acariciden. Uiteraard zijn een aantal fungiciden en herbiciden ook toxisch voor watervlooien. Aangezien herbiciden gericht zijn op het bestrijden van onkruiden, zullen er echter eerder effecten op niet doelwit planten mogen worden verwacht dan op watervlooien. Daarnaast is het totale gebruik van herbiciden in Nederland veel hoger dan het gebruik aan insecticiden, zowel gemeten in aantal middelen (resp. 66 en 41) als in kilogrammen (resp. ca. 4000 ton en 400 ton actieve stof) (de Snoo & de Jong, 1999). Het voorafgaande vormt de aanleiding tot het nader uitwerken van de kroostoets.

Door het Centrum voor Milieukunde van de Universiteit Leiden (CML) wordt al vanaf 1986 onderzoek gedaan naar de neveneffecten van bestrijdingsmiddelen. Een gedeelte van dit onderzoek heeft betrekking op oppervlaktewater. Als één van de projecten zijn veldtoetsen voor de neveneffecten van bestrijdingsmiddelen ontwikkeld (De Jong & Bergema, 1994). Eén van de toetsen betrof een toets met kroos. Uit de experimenten met kroos bleek dat er bij blootstelling van bovenaf (drift) met diquat in bakjes en in enclosures in sloten een duidelijk effect werd gevonden bij een blootstelling van minder dan 1% van de velddosering. Dit is een realistisch driftpercentage, zodat voor deze stof effecten in de praktijk verwacht mogen worden. Er is echter nog geen ervaring opgedaan met andere herbiciden en andere blootstellingsroutes (met name via het water). Er zijn echter wel aanwijzingen dat kroos ook via deze route gevoelig is voor herbiciden (Blackburn & Weldon, 1965). Dit is een belangrijke voorwaarde, omdat een veldtoets niet alleen gevoelige moet zijn voor directe drift van bestrijdingsmiddelen, maar ook voor de aanwezigheid van middelen in het water zelf.

Doelstelling

Voorafgaand aan het daadwerkelijk ontwikkelen van de kroostoets is de volgende vraag gesteld:

- I. Is er behoefte aan een kroostoets bij de waterschappen en aan welke eisen moet een dergelijke toets voldoen om te worden ingezet.

Zoals in het voorafgaande betoogd waren er al verschillende aanwijzingen dat er behoefte aan een herbiciden bioassay bestond. Dit vormde de aanleiding tot het uitvoeren van het project. Tijdens de studie is deze vraag verder beantwoord.

Ten aanzien van de kroostoets zijn er nog twee duidelijke vragen:

- II. Is de kroostoets te gebruiken voor het signaleren van effecten van herbiciden in het oppervlaktewater, dus bij blootstelling via het water?
- III. Zijn met de kroostoets onder praktijkomstandigheden effecten van herbiciden aan te tonen?

Het doel van het onderzoek is het uitwerken van de kroostoets tot een instrument, geschikt om in de praktijk effecten in de sloot van het gebruik van herbiciden op landbouwpercelen aan te tonen. Meer specifiek is het doel het ontwikkelen, uittesten en standaardiseren van een veldtoets met klein kroos *Lemna minor* voor het aantonen door de waterkwaliteitbeheerders van de aanwezigheid en de effecten van herbiciden in oppervlaktewater. Onderdeel van het standaardiseren vormt tevens het aangeven van de bruikbaarheid van de toets (onder welke omstandigheden

wel en niet) en van de detectie-limiet.

Opzet rapport

In hoofdstuk twee van dit rapport wordt in het kort de gehanteerde werkwijze weergegeven. In hoofdstuk 3 worden de resultaten van de laboratoriumexperimenten behandeld, en wordt ingegaan op de literatuurgegevens over kroos en herbiciden. In hoofdstuk 4 wordt ingegaan op de toepasbaarheid van de toets in de praktijk. Daarbij wordt eerst de vraag naar de behoefte bij de waterschappen behandeld en vervolgens het praktijkonderzoek met de kroostoets. Het rapport wordt besloten met een hoofdstuk discussie, conclusies en aanbevelingen (Hoofdstuk 5).

2 WERKWIJZE

In dit hoofdstuk wordt voor de respectievelijke onderzoeksvragen aangegeven welke methoden zijn gehanteerd bij het beantwoorden van deze vragen.

2.1 Onderzoeksvraag I

- I. Is er behoefte aan een kroostoets bij de waterschappen en aan welke eisen moet een dergelijke toets voldoen om te worden ingezet.

Voor het beantwoorden van deze vraag is gebruik gemaakt van eerder verzamelde informatie door de STOWA, gesprekken met vertegenwoordigers van waterschappen in het kader van het VROM-project Veldbioassays en tijdens de Workshop "Het gebruik van bioassays in het waterkwaliteitsbeheer" op 11 mei 2000 in Apeldoorn. Daarnaast is ook de inbreng van de begeleidingscommissie-leden afkomstig uit de waterschappen verwerkt.

2.2 Onderzoeksvraag II

- II. Kan de kroostoets ook worden gebruikt voor het signaleren van effecten van herbiciden in het oppervlaktewater, dus bij blootstelling via het water?

Deze vraag wordt beantwoord met laboratoriumexperimenten. In deze experimenten worden concentratiereeksen van herbiciden gebruikt.

Voor het uitvoeren van de experimenten moeten eerst nog keuzen worden gemaakt voor wat betreft de toetssoort en de te onderzoeken herbiciden. Onderstaand worden deze keuzen beargumenteerd gemaakt.

Keuze toetsorganisme

De meest algemene drijvende kroossoorten in Nederland zijn: klein kroos *Lemna minor*, bultkroos *Lemna gibba* en veelwortelig kroos *Spirodela polyrhiza*. Klein kroos is hiervan de meest voorkomende. Wat betreft geschiktheid voor gebruik als toetsorganisme lijken geen principiële verschillen te bestaan tussen de drie genoemde soorten. Voor wat betreft verschillen in gevoeligheid voor herbiciden zijn er vrijwel geen literatuurgegevens beschikbaar waarbij de toxiciteit voor verschillende soorten kroos kan worden vergeleken. Uit een studie, waarbij de drie kroossoorten van bovenaf aan diquat werden blootgesteld, bleek veelwortelig kroos de meest gevoelige (de Jong & Bergema, 1995). Voor *Lemna gibba* bestaat reeds een Amerikaanse richtlijn voor het uitvoeren van standaard laboratoriumtoetsen (ASTME 1415-91). In Nederland is de meeste ervaring opgedaan met *Lemna minor*. Uit praktische overwegingen is er voor gekozen om de kroostoets te ontwikkelen met klein kroos *Lemna minor*. In Europa is een richtlijn voor *L. minor* in ontwikkeling.

Het kweken van kroos is goed mogelijk (Retzlaff, 1993). In Nederland is hiermee ervaring opgedaan bij verschillende instituten en met verschillende kroossoorten (mond.med. J. Janssen, KEMA, zie ook: Jenner & Janssen, 1993, Mond.med. Weltje en Wolterbeek, IRI)

Selectie middelen

Voor de selectie van middelen is de volgende procedure gehanteerd:

1. Op basis van de beschikbare gegevens (CBS, 1997, enquêtegegevens bestrijdingsmiddelen-gebruik 1995) zijn de meest gebruikte herbiciden geselecteerd. Hierbij is een combinatie gemaakt van de tien meest gebruikte herbiciden voor wat betreft het oppervlakte van gebruik en de tien meest gebruikte in kg totaal. Dit resulteerde in een lijst van in totaal 12 middelen (atrazin, bentazon, chloridazon, diquat, DNOC, glyfosaat, MCPA, mecoprop-p, metamitron, propachloor, prosulfocarb, pyridaat).
2. Op basis van de meetgegevens van de waterschappen zijn de middelen isoproturon en simazin toegevoegd. Het middel asulam is toegevoegd vanwege aansluiting bij later niet op dat moment uitgevoerd mesocosm-onderzoek bij Alterra, waar de blootstelling van een sloot in de bollenstreek zou worden nagebootst. Het resultaat is een lijst met 15 middelen.
3. Tot slot is nog gekeken van welke middelen op basis van laboratoriumgegevens de meeste effecten mogen worden verwacht (zie bijlage 3). Naar aanleiding hiervan zijn nog twee middelen toegevoegd, te weten paraquat en linuron. Door deze selectie is een lijst met 17 middelen ontstaan (zie bijlage 1).

Vervolgens zijn uit deze lijst de middelen gekozen waarmee de experimenten zijn uitgevoerd. Hierbij is een combinatie van de volgende criteria gebruikt: omvang van gebruik, te verwachten effecten op kroos, aangetroffen in oppervlaktewater en spreiding over werkingsmechanisme. Onderstaand wordt de verdere keuze toegelicht.

- a. In aansluiting op eerder onderzoek van het CML is gekozen voor **diquat**; dit werkt o.a. op de fotosynthese.
- b. Daarnaast is **glyfosaat** geselecteerd. Dit heeft een geheel ander werkingsmechanisme. Bovendien is de toxiciteit voor algen (vermoedelijk) gering, en kan op deze wijze worden getoetst of dit ook voor kroos geldt. Dit middel wordt veel gebruikt en het gebruik neemt mogelijk toe in genetisch gemodificeerde gewassen. Ook de waterschappen noemen dit middel als een probleemstof.
- c. Vanwege de aansluiting bij de mesocosmexperimenten van Alterra (zie 2) zijn **asulam** en **metamitron** gekozen. Metamitron is een fotosynthese-remmer. Asulam beïnvloedt de celdeling. Van asulam zijn onvoldoende gegevens bekend om vooraf de kans op effecten in te kunnen schatten. Van metamitron worden wel effecten op algen verwacht.
- d. Als vijfde middel is in principe voor atrazin gekozen. Deze fotosyntheseremmer geeft een groot risico voor algen te zien en wordt bovendien aangetroffen door de waterkwaliteits-beheerders. Omdat het gebruik van atrazin echter niet meer is toegestaan is ervoor gekozen om voor dit onderzoek een vergelijkbaar middel, **bentazon**, mee te nemen.
- e. Om de breedte van het onderzoek te vergroten zijn drie veelgebruikte middelen toegevoegd, te weten **simazin**, **chloridazon** en **MCPA**.
- f. Tot slot zijn **paraquat**, **isoproturon** en **linuron** toegevoegd, omdat hier op basis van literatuurgegevens effecten verwacht mochten worden.

De bestaande toxiciteitsgegevens over kroos hebben voornamelijk betrekking op *Lemna gibba*. Daarom zijn ter vergelijking enkele experimenten uitgevoerd met *Lemna minor* en *Lemna gibba*. Daarnaast zijn, voor de vergelijking van drijvend kroos met een ondergedoken soort ook enkele

oriënterende experimenten uitgevoerd met *Lemna trisulca*. In bijlage 2 worden de opzet en de resultaten van de laboratoriumexperimenten in detail beschreven.

Opzet laboratorium experimenten

Voor een statistisch betrouwbaar resultaat is er in principe voor gekozen om de toets per concentratie in vijfvoud uit te voeren. Daarnaast zijn enkele experimenten uitgevoerd met minder herhaling, maar met meer middelen, ten einde een kwalitatieve indruk te verkrijgen van de gevoeligheid van de toets voor de verschillende herbiciden. In de concentratiereeks zijn naast een blanco en een maximale concentratie (= de concentratie die mag worden verwacht bij een 100% blootstelling aan de velddosering) drie realistische concentraties (0,1; 1 en 5% van de velddosering) meegenomen. NB. Bij de eerste experimenten is nog 10% gehanteerd i.p.v. 5%; in verband met de te verwachten driftreductie is dit percentage later naar beneden bijgesteld. De dosis van 5% is de drift die door het CTB per 1 januari 2000 wordt gehanteerd voor een volveldsbespuiting met een landbouwspruit zonder driftreducerende maatregelen. Met driftreducerende maatregelen (bijv. spuitvrije zone, luchtondersteuning) kunnen driftreducties worden bereikt. Door de keuze van 1 en 0,1 procent wordt deze (lage) range bestreken. De drift van 1% is hierbij een "realistic worst case situatie" (Bouwman *et al.*, 1998) voor een aantal grote teelten na invoering van spuit en teeltvrije zone zoals beschreven in het Lozingenbesluit Open Teelt en Veehouderij.

De kweek en de proeven zijn uitgevoerd in leidingwater, waaraan korrels voedingsstoffen zijn toegevoegd (Blusana). De korrels geven nutriënten af over de tijd en zorgen dus voor een vrij constant nutriënten gehalte (zie bijlage 2). Voor wat betreft de dosering van de herbiciden is ervoor gekozen om een eenmalige dosering aan het begin van het experiment toe te dienen. Metingen van bestrijdingsmiddelen zijn verricht door TNO-CIVO en door Alterra.

Analyse

De effecten op de kroosgroei zijn bepaald door na 14 dagen de groei aan de hand van het aantal blaadjes en het drooggewicht te bepalen. Daarnaast is oriënterend gekeken of directe meting van de fotosynthese een alternatief zou bieden voor de meting van de kroosgroei. Er is gebruik gemaakt van een Planten Photosynthese Meter, MJHD versie (EARS).

Aan de hand van de experimenten is het in principe mogelijk dosis-effect relaties op te stellen, waarbij in ieder geval duidelijke indicaties worden verkregen van de effecten van de concentraties die in het veld verwacht mogen worden. Uit de verzamelde gegevens zijn vervolgens de EC_{50} ¹ waarden berekend, zodat de resultaten onderling en met literatuurgegevens vergeleken kunnen worden. De opzet is er echter niet a-piori op gericht om ook een betrouwbare EC_{50} waarde te traceren. Voor het nauwkeurig berekenen van de EC_{50} is het noodzakelijk dat er een aantal punten in de buurt van deze waarde worden onderzocht. In dit onderzoek ging het erom om te onderzoeken of er bij realistische veldconcentraties effecten verwacht mogen worden. Daarnaast is het mogelijk dat er ook bij de velddosering nog geen 100% effect optreedt, zodat ook de concentratie waarbij het maximale effect optreedt niet duidelijk is of dat er bij de lagere concentraties nog weinig effecten optreden, zodat onduidelijk is waar de EC_{50} waarde ligt. Het gaat er bij de laboratoriumexperimenten vooral om dat er een indruk wordt verkregen van de effecten van veelgebruikte middelen op klein kroos *L. minor* bij concentraties die ook in het veld verwacht mogen worden.

¹ EC_{50} = die concentratie waarbij er 50% van het maximale effect wordt gevonden.

Tot slot is een analyse gemaakt van de beschikbare databestanden voor wat betreft de effecten van herbiciden op kroos, op basis waarvan de geschiktheid van kroos als toetsorganisme nader kan worden gespecificeerd (zie bijlage 3).

2.3 Onderzoeksvraag III

III. Kunnen met de toets onder praktijkomstandigheden effecten van herbiciden worden aangetoond?

In het veld zijn mede in het kader van een project van VROM (zie bijlage 5) twee experimenten uitgevoerd. Naast het meten van de biologische effecten zijn hierbij tevens de gehalten aan bestrijdingsmiddelen gemeten. Voor de proefopzet wordt verwezen naar bijlage 5 en naar De Jong *et al.* (2000).

De veldexperimenten hadden tot doel de opgestelde richtlijn te toetsen en eventueel bij te stellen. Het doel was niet om effecten van bestrijdingsmiddelen aan te tonen. De experimenten zijn uitgevoerd in augustus en september; in deze periode is de piek van de (insecticiden en herbiciden) bespuitingen reeds achter de rug, zodat effecten ook niet a-priori verwacht mogen worden. Daarnaast maakt ook het geringe aantal experimenten, namelijk twee (zie onderstaand) de kans dat er daadwerkelijk effecten van bestrijdingsmiddelen worden aangetoond kleiner. Dit neemt niet weg dat er uiteraard wel onderzoek is gedaan in gebieden, waar potentieel een hoge belasting aan bestrijdingsmiddelen te verwachten is.

Er zijn twee veldexperimenten zijn uitgevoerd in het gebied van het Hoogheemraadschap van Rijnland. Bij dit Hoogheemraadschap bestaat reeds langer belangstelling voor ecotoxicologische toetsen (AquaSense, 1995). Recent is een aanvang gemaakt met het uitvoeren van bioassays voor bestrijdingsmiddelen (Wassenburg, 1999). Het eerste experiment is uitgevoerd in de Bollenstreek; een tweede experiment is uitgevoerd in de Haarlemmermeerpolder. De gebieden verschillen zowel in grondsoort als in landbouwkundig gebruik.

3 RESULTATEN LABORATORIUM EXPERIMENTEN

3.1 Blootstelling

Ter beantwoording van onderzoeksvraag II naar de blootstelling via het water is in het laboratorium een aantal experimenten met kroos en herbiciden uitgevoerd. De resultaten van deze experimenten staan samengevat weergegeven in tabel 3.1. Een uitgebreide beschrijving van de opzet en de resultaten staat in bijlage 2. De laboratoriumproeven zijn uitgevoerd in een bepaalde volgorde, waarbij effecten of het ontbreken daarvan in de ene proef aanleiding gaf tot de volgende. In bijlage 2 staat dit beschreven. Hier worden de resultaten samengevat weergegeven, en wordt vooral gekeken naar de betekenis voor de ontwikkeling van een veldtoets.

Tabel 3.1 Samengevatte resultaten van de laboratoriumexperimenten; 100% drift is gelijk aan de dosering op het bespoten perceel; + = effect gevonden, * = statistisch significant effect gevonden (**=P<0,05; ***=P<0,01); - = geen effect gevonden.

Middel	Parameter	Effect (0,1% drift)	Effect (1% drift)	Effect (5% drift)	Effect (100% drift)	EC ₅₀ (mg/l)	100% drift (mg/l)
Asulam	drooggew.	-	-	-	-	>1,660	0,800
	# blaadjes	-	-	-	-	>1,660	0,800
Bentazon ¹	drooggew.	-	-	-	-	>0,480	0,480
	# blaadjes	-	-	-	-	>0,480	0,480
Chloridazon ¹	drooggew.	-	-	-	-	>1,076	1,076
	# blaadjes	-	-	-	-	>1,076	1,076
Diquat	drooggew.	-	-	**	***	0,014-0,035	0,320
	# blaadjes	-	-	-	***	0,006-0,057	0,320
Glyfosaat ¹	drooggew.	-	-	-	-	>0,500	0,500
	# blaadjes	-	-	-	-	>0,500	0,500
Isoproturon	drooggew.	-	-	***	***	0,051	0,666
	# blaadjes	-	-	***	***	0,085	0,666
Linuron	drooggew.	-	-	***	***	0,014	0,375
	# blaadjes	-	-	***	***	0,055	0,375
MCPA	drooggew.	-	-	-	-	>0,400	0,500
	# blaadjes	-	-	-	-	>0,400	0,500
Metamitron	drooggew.	-	-	-	***	>0,913	0,910
	# blaadjes	-	-	-	***	ca. 0,913	0,910
Paraquat	drooggew.	-	-	***	***	0,046	0,333
	# blaadjes	-	-	***	***	0,052	0,333
Simazin ¹	drooggew.	-	-	-	+	0,080	0,330
	# blaadjes	-	-	-	+	0,055	0,330

¹ experiment met te weinig herhalingen om verschillen tussen behandelingen te kunnen toetsen.

Uit tabel 3.1 blijkt dat bij 5 van de 11 onderzochte middelen de EC₅₀ ligt boven de concentratie die mag worden verwacht als de volledig velddosering in de sloot terecht komt. Ook in een veldtoets wordt van deze stoffen dus geen effect verwacht. Bij metamitron en simazin worden alleen effecten gevonden bij deze hoogste dosering, een geringe drift van dit middel naar de sloot zal dus naar alle waarschijnlijkheid in een veldtoets met klein kroos niet kunnen worden aangetoond.

Er blijven 4 middelen over (diquat, isoproturon, linuron en paraquat) waarbij ook bij 5% van de velddosering een effect wordt gevonden. Een concentratie die ontstaat bij 1% drift kan echter niet meer significant worden aangetoond. Voor diquat geldt dat dit in het laboratorium wel effecten laat zien, maar het toevoegen van bodemmateriaal aan de proefopstelling deed dit effect vrijwel teniet (zie bijlage 2). Diquat bindt zeer sterk aan organisch materiaal, zodat in de veldsituatie zeer waarschijnlijk geen effecten zullen worden aangetroffen.

In het geval van glyfosaat bestond er twijfel over de opname via de wortel. Bij blootstelling via het water werd zelfs bij de hoogste dosering geen effect gevonden. Glyfosaat wordt echter vrijwel uitsluitend door het blad opgenomen (van Rijn *et al.*, 1995). Daarom is gekeken of kroos wel gevoelig is bij directe bespuiting van de kroosblaadjes van bovenaf. Hier werd echter alleen bij 10 x de velddosering een effect gevonden. Tot slot is ook gekeken naar het effect van glyfosaat op een ondergedoken waterplant *Lemna trisulca* waarbij opname dan wel door het blad plaats kan vinden. Hier blijkt dat glyfosaat meer effect heeft dan op de drijvende kroossoorten (zie tabel 3.2). Bij lagere concentraties zijn de effecten echter gering. Bij twee andere middelen (diquat en simazin) zijn de effecten op *Lemna trisulca* echter zeer vergelijkbaar met die op *Lemna minor*. Het uitvoeren van een kroostoets met *Lemna trisulca* zal de gevoeligheid van de toets dus naar alle verwachting niet bijzonder vergroten.

Het bepalen van de effecten met behulp van het meten van de fotosyntheseremming levert een gedifferentieerd beeld op (zie bijlage 2). Voor twee middelen, die direct op de fotosynthese werken (linuron en isoproturon), levert de methode een snel beeld van de aantasting van de fotosynthese, en voor één middel (linuron) lijkt de methode ook gevoeliger dan de meting van de groei. Voor middelen die niet direct op de fotosynthese werken (paraquat en diquat), is de methode minder gevoeliger dan een meting van de groei. Met MCPA wordt, net als bij de effecten op de groei, geen effect aangetoond.

Tot slot is voor enkele stoffen een vergelijking gemaakt tussen de toxiciteit voor *Lemna minor* en *Lemna gibba*, omdat vrijwel alle literatuurgegevens gebaseerd zijn op experimenten met *Lemna gibba* (zie tabel 3.2). Uit de EC₅₀ waarden blijkt dat de effecten zeer vergelijkbaar zijn en de beide soorten dus weinig verschillen in gevoeligheid laten zien.

Tabel 3.2 Vergelijking van de gevonden resultaten met literatuurgegevens (bronnen: zie bijlage 3).

Middel	<i>Lemna minor</i> EC ₅₀ (mg/l)	<i>Lemna gibba</i> EC ₅₀ (mg/l)	<i>Lemna trisulca</i> EC ₅₀ (mg/l)	Literatuur Kroos EC ₅₀ (mg/l)	Literatuur Alg EC ₅₀ (mg/l)
Asulam	>1,660			0,140	?
Bentazon	>0,480			1,033	279
Chloridazon	>1,076			4,876	?
Diquat	0,014-0,035	0,002	0,005	0,018	0,011
Glyfosaat	>0,500		0,140	2,000	11
Isoproturon	0,051	0,054		0,033	11
Linuron	0,014	0,016		0,027	1
MCPA	>0,400	>0,400		0,170	?
Metamitron	ca. 0,913			?	0,22
Paraquat	0,046	0,033		0,051	?
Simazin	0,055		0,065	0,140	0,64

In tabel 3.2 worden de resultaten van de uitgevoerde experimenten vergeleken met literatuurgegevens. Omdat er grote verschillen in opzet kunnen bestaan (duur, parameter) is in alle gevallen de laagste EC₅₀ waarde gekozen. Wat ten eerste opvalt is dat de in dit onderzoek gevonden waarden in het algemeen goed overeenkomen met de literatuurgegevens. Er zijn echter enkele uitzonderingen. In het geval van asulam en MCPA wordt een veel hogere EC₅₀ waarde gevonden dan uit de literatuur bekend is. Hiervoor kan op basis van de verzamelde gegevens geen verklaring worden gegeven. De omstandigheden tijdens deze toetsen weken niet af van de omstandigheden bij andere toetsen, waar wel een grote overeenkomst met de literatuurgegevens werd gevonden. In het geval van simazin wordt een lagere waarde gevonden. Opvallend is dat de EC₅₀ waarde voor *L. trisulca* in het geval van glyfosaat veel lager is dan de literatuurwaarde voor *L. gibba*.

De resultaten laten zien dat gegevens uit de literatuur in het algemeen ook met *L. minor* kunnen worden gereproduceerd. Er lijkt dus geen verschil te zijn tussen *L. minor* en *L. gibba*.

3.2 Gevoeligheid kroos

Voor wat betreft de gevoeligheid van de kroostoets is geconstateerd dat effecten van 5% drift (gesimuleerd in het lab) voor middelen die toxisch zijn voor kroos, significant kunnen worden aangetoond, maar lagere concentraties niet. In het veld kan 5% drift wel voorkomen, maar zullen deze percentages ten gevolge van het hierop gerichte beleid naar alle verwachting afnemen. De kans dat effecten kunnen worden aangetoond is daarmee reeds bij voorbaat gering.

Een vraag die hiermee samenhangt is of is aan te geven van welke herbiciden effecten op kroos verwacht mogen worden. Aangezien hiervoor is betoogd dat de literatuurgegevens een goede voorspeller zijn voor effecten op *L. minor* is in bijlage 3 een dataset opgesteld met 99 thans toegelaten herbiciden; voor deze herbiciden is opgezocht wat de maximaal voorgeschreven dosering is en vervolgens is berekend wat de concentratie in een standaard sloot van 30cm diepte zou zijn bij 5% drift. Deze concentratie is vervolgens vergeleken met in de literatuur gevonden toxiciteitsgegevens voor algen en voor kroos.

In tabel 3.3 worden de resultaten uit bijlage 3 samengevat. Als de berekende concentratie hoger is dan 0,1 x EC₅₀ of hoger dan de NOEC², wordt een middel toxisch genoemd.

Tabel 3.3 Samenvatting van de literatuurgegevens voor 99 herbiciden van de toxiciteit voor kroos en algen, vergeleken met de blootstelling aan herbiciden bij 5% drift.

	Aantal herbiciden gegevens beschikbaar	Aantal toxisch	Aantal niet toxisch
Algen	70	28	42
Kroos	33	18	15
Kroos en alg	19		

Uit tabel 3.3 valt af te leiden dat er van 66 van de 99 herbiciden geen toxiciteitsgegevens voor kroos beschikbaar zijn. Voor 18 middelen is de blootstelling (uitgaande van 5% drift) groter dan 0,1 van de EC₅₀ of overschrijdt deze de NOEC. Voor 15 middelen is op basis van deze gegevens geen effect te verwachten. Voor 9 middelen wordt volgens deze berekening de EC₅₀ overschre-

² NOEC = die concentratie waarbij geen effecten worden waargenomen.

den. Voor algen zijn veel meer data beschikbaar; hier blijkt echter dat er van meer dan de helft (42 van de 70) van de middelen waarvan gegevens zijn geen effecten in het veld zijn te verwachten bij 5% drift. Vergelijken we de gevoeligheid van kroos met die van algen, dan blijkt van de 19 middelen waarvan zowel voor kroos als voor algen gegevens beschikbaar zijn, in 15 gevallen kroos gevoeliger te zijn dan algen. Verhoudingsgewijs lijken er dus meer herbiciden toxisch voor kroos dan voor algen. Het is echter ook mogelijk dat er voor die middelen waarvan literatuurgegeven voor kroos bestaan een aanwijzingen bestonden voor het optreden van effecten en dit een vertekend beeld geeft.

Op basis van de literatuurgegevens lijkt kroos a-priori een geschikt toetsorganisme, immers: kroos is gevoeliger dan algen en is gevoelig voor meer dan de helft van de herbiciden waarvan gegevens beschikbaar zijn; dit is overigens in overeenstemming met de argumentatie waarom de kroostoets oorspronkelijk als kansrijk is geselecteerd. Anderzijds moet opgemerkt worden dat bijna de helft van de onderzochte herbiciden niet toxisch is voor kroos en veel meer dan de helft niet toxisch voor algen.

Wanneer de resultaten van de laboratoriumexperimenten in samenhang met de literatuurgegevens worden beschouwd dan blijkt dat er voor een aantal herbiciden duidelijke effecten kunnen worden aangetoond op 5% van de velddosering. Met de verplichte driftreducerende maatregelen zal de drift echter naar verwachting lager worden. In de laboratoriumproeven is het niet gelukt om bij lagere percentages dan 5% een effect statistisch significant aan te tonen.

4 KROOSTOETS IN PRAKTIJK

In dit hoofdstuk wordt eerst ingegaan op de behoefte aan een kroostoets bij de waterschappen § 4.1; vervolgens worden de randvoorwaarden en voorschriften voor het uitvoeren van de kroostoets in de praktijk behandeld (§ 4.2) en in § 4.3 wordt ten slotte verslag gedaan van de veldexperimenten.

4.1 Behoefte bij de Waterschappen

In het VROM-project (De Jong *et al.*, 2000) is een richtlijn opgesteld voor het uitvoeren van veldbioassays. Hierbij wordt ook de uitvoering van een herbicidentoets aanbevolen, waarbij de kroostoets als mogelijkheid wordt gegeven.

Uit gesprekken met verschillende medewerkers van waterschappen blijkt het volgende. Men is er zich zeker van bewust dat herbiciden een probleem kunnen vormen en dat een toets met watervlooiën deze middelengroep niet aan het licht zal brengen. Vanuit de waterschappen zelf zal niet a-priori voor een kroostoets worden gekozen: het is veeleer een probleem dat kroos te hard groeit, en een eventuele groeiremming van kroos op zich zal men eerder toejuichen. Als een kroostoets echter goed werkt en representatief is voor waterplanten, of een goedkope methode vormt om herbiciden aan te tonen, is men zeker geïnteresseerd. Voorwaarde voor het toepassen van een veldtoets is dat deze eenduidige resultaten oplevert. Een effect moet ook als een gevolg van het gebruik van herbiciden kunnen worden geïnterpreteerd.

In specifieke gevallen (Delfland) heeft men wel interesse in de toets, maar worden binnen het gebied nauwelijks herbiciden gebruikt, zodat toepassing van de toets niet zinvol lijkt. Binnen een waterschap als Rijnland, met een grote diversiteit aan teelten in haar gebied heeft men zeker interesse wanneer is aangetoond dat de toets werkt.

Een algemeen probleem bij het toepassen van bioassays door waterschappen is dat een wettelijk toetsings- en normstellingskader ontbreekt. Dit is er wel voor chemische metingen. Dit betekent dat men aarzelingen heeft om de uitkomsten van bioassays als basis voor het beleid te gebruiken, en daarmee aarzelingen om bioassays in te zetten. Resultaten van chemische metingen geven direct aan dat er normen worden overschreden, wat kan leiden tot maatregelen.

4.2 Randvoorwaarden voor uitvoering van de kroostoets

Er is een aantal factoren dat ervoor kan zorgen dat de effectparameters zodanig worden beïnvloed dat een effect van een bestrijdingsmiddel, althans bij de standaardopzet, niet meer kan worden gemeten.

Fysisch/chemische omstandigheden

Fysisch-chemische parameters (bijv. pH, temperatuur, zoutgehalte, zuurstof, nutriënten) hebben invloed op de effectparameters. Onderstaand wordt in tabel 4.1 weergegeven binnen welke grenzen deze parameters zich moeten bevinden om de bioassay onder de in deze richtlijn beschreven voorwaarden uit te kunnen voeren.

Tabel 4.1 Omstandigheden waaronder de kroostoets zinvol kan worden uitgevoerd (bron: STOWA, 1992a, 1997b).

factor	Toepasbaarheid kroostoets
temperatuur (periode)	15-30°C (juni-september)
waterdiepte	> 20 cm
pH	4-10
N	1,1-430 mg/l
Fosfaat	0,1-360 mg/l
K	20-400 mg/l
Cl ⁻	<2 g/l
Geleidbaarheid	<1700 µS/mm
sloottype	zandsloten veensloten kleislotten licht-brakke sloten zure sloten (pH>4) brakke sloten (Cl<2 g/l)

Voor wat betreft de sloottypen, zoals onderscheiden door de STOWA (STOWA, 1993a, 1993b) blijkt uit de tabel dat de kroostoets in alle typen kan worden uitgevoerd (binnen de aangegeven randvoorwaarden).

Er zijn geen aanwijzingen dat de functie van de sloot voor de waterhuishouding (meestal samenhangend met de afmetingen) (sloot, tocht, vaart, hoofdvaart, leiding) van invloed is op de toepasbaarheid van de toets. Voor wat betreft de stroming moeten er een aantal opmerkingen worden gemaakt. Ten eerste komt kroos normaal gesproken niet in stromende wateren voor; het spoelt namelijk weg. Er zijn echter vooralsnog geen aanwijzingen dat er grote verschillen in gevoeligheid voor bestrijdingsmiddelen bestaan tussen kroos en in stromend water voorkomende organismen. Daarom kunnen deze bioassays toch representatief zijn voor ter plekke voorkomende organismen. Een probleem bij stromend water is dat er verdunning op kan treden als er van bovenstrooms schoner water wordt aangevoerd. Het is daarom de vraag in hoeverre de bioassays gevoelig genoeg zijn om effecten aan te tonen. Dit probleem speelt echter evenzeer bij chemische metingen. In hoeverre de kroostoets uitgevoerd kan worden in stromend water is onbekend.

Keuze monsterpunten

Voor de keuze van de monsterpunten wordt in het protocol (bijlage 4) een opzet gegeven. Dit geldt echter vooral als een onbelast referentiegebied in de omgeving kan worden gevonden. In de praktijk zal het echter regelmatig voorkomen dat er niet een duidelijk referentiegebied kan worden aangewezen. In dit geval moet er gezocht worden naar watergangen, die vergelijkbaar zijn met de blootgestelde watergangen voor wat betreft de bovengenoemde aspecten, maar die niet blootgesteld worden aan bestrijdingsmiddelen. Aanbevolen wordt om minstens 5 referentiepunten in beschouwing te nemen.

Voor wat betreft de keuze van de blootgestelde punten zijn er vanuit het waterkwaliteitsbeheer goede redenen om bij de in- en uitlaatpunten te meten. Het is echter zeer de vraag of hier de hoogste (piek)-belastingen optreden; weliswaar komt theoretisch alle water langs deze punten, hier staat tegenover dat er verdunning optreedt. Daarom wordt aanbevolen om naast deze punten

ook enkele meetpunten in de kavelsloten te kiezen, waar de grootste kans op het optreden van piekbelastingen bestaat. Mede ingegeven door praktische mogelijkheden wordt aanbevolen om per experiment 15 punten in het blootgestelde gebied in beschouwing te nemen. Uiteraard wordt dit aantal beïnvloed door de doelstelling van het onderzoek.

Protocollen

Voor de concrete uitvoering van de bioassays wordt verwezen naar het protocol, zoals beschreven in bijlage 4. Voor de opzet van de protocollen is gekeken naar de opbouw van internationaal gehanteerde protocollen, waaraan specifieke onderdelen zijn toegevoegd.

De volgende onderdelen worden onderscheiden:

- testsoort
- uitvoering
- selectie monsterpunten
- aanvullende informatie
- metingen
- bewerking en weergave resultaten
- verslaglegging
- geldigheid.

In bijlage 4 is ook een schatting gemaakt van de kosten van het uitvoeren van de bioassays. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen eenmalige kosten (f 12.000,-) voor het opstarten van de proeven en de kosten (f 9.000,-) bij herhaling van de bioassays. Hierbij zijn ook de kosten voor arbeid betrokken.

Overleving en groei in de referentie

Met bioassays met kroos is in het veld nog relatief weinig ervaring opgedaan. Dit betekent dat de groeisnelheid in referentiesituaties niet goed bekend is. Wel is uit literatuurgegevens af te leiden dat de groeisnelheid in de zomermaanden (mei-augustus) minimaal 0,1 per dag moet zijn (STOWA, 1992a).

Buiten deze periode moet een correctie voor de temperatuur worden aangebracht:

$$g = 0,10 \times (0,05(t - 25) + 1)$$

waarin g = de groeisnelheid en t = de temperatuur in °C.

Wanneer de groeisnelheid in de referenties groter of gelijk is aan de resulterende waarde is de toets ook in deze periode geldig. De effecten in de blootgestelde bioassays kunnen vervolgens worden uitgedrukt als percentage groeiremming ten opzichte van de referentie. De grens voor het al dan niet vaststellen van een effect wordt gelegd bij een groeiremming van 10% of groter.

Als de groeisnelheid in de blootgestelde bioassays kleiner is dan die in de referentie, wordt dit in principe als een effect van bestrijdingsmiddelen gekenmerkt. Vervolgens wordt een getrapte procedure gevolgd: vindt men een effect op één of enkele monsterpunten, dan vormt dit aanleiding om dit punt in de tijd te volgen, maar nog niet direct een aanleiding om tot metingen over te gaan. Vindt men echter op meer dan 30% van de blootgestelde punten een effect, of op één punt op meerdere tijdstippen, dan vormt dit aanleiding om nader onderzoek te verrichten,

bijvoorbeeld in de vorm van metingen (zie De Jong *et al.*, 2000).

Als de groei in de referentie meer dan 10% onder de berekende maximale groeisnelheid ligt is de toets in principe ongeldig. Dit wil echter nog niet zeggen dat grote effecten in de blootgestelde bioassays niet indicatief kunnen zijn voor effecten van bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld: 50% groeiremming in de referenties, 100% in de blootgestelde bioassays). Als dit het geval is, vormt dit aanleiding om de toets te herhalen.

4.3 Veldexperimenten

De uitgevoerde veldexperimenten waren er vooral op gericht om een beeld te verkrijgen van de praktische uitvoerbaarheid van de toets. In het eerste experiment bleek dat er zoveel kroos vanuit de sloot in de bakjes terecht kwam, dat de hoeveelheid aangetroffen kroos geen correlatie had met eventuele effecten.

De groei bleef gemiddeld onder de 0,1 (nl. 0,04/dag). Ook als de correctie voor de temperatuur wordt toegepast (er is een gemiddelde temperatuur van 18°C aangenomen), is de gemiddelde groei in de referenties (0,065) nog te laag. Gezien het vermoeden dat er grote hoeveelheden kroos in en uit de potjes is gegaan, ligt de oorzaak hiervan waarschijnlijk in de proefopstelling. Volgens de procedure kan de toets dus slechts indicaties opleveren. Op twee monsterpunten is de groei 10% lager dan de groei in de referenties. Op de monsterpunten zijn watermonsters geanalyseerd op een pakket aan bestrijdingsmiddelen. Op de genoemde 2 monsterpunten is geen verhoogd gehalte aan herbiciden gevonden.

In het tweede experiment waren de opstellingen sterk verbeterd. Hierdoor bestond er veel minder beïnvloeding door kroos van buitenaf. Helaas verdwenen in dit experiment relatief veel opstellingen door vandalisme. De gemiddelde groei in de referentie was slechts 0,03, waarmee de toets niet geldig is. Het late tijdstip in het seizoen is hiervan waarschijnlijk de oorzaak. Er is een aantal blootgestelde punten waar de groei meer dan 10% lager is dan in de referenties. Uit de bestrijdingsmiddelen bepalingen blijkt geen duidelijke correlatie tussen de aanwezigheid van herbiciden en de verlaagde groeisnelheid.

Wat opvalt is de grote spreiding in kroosgroei tussen de monsterpunten. Dit geldt zowel binnen de onbelaste als de (potentieel) belaste punten. Het is niet erg waarschijnlijk dat er op het moment dat de toets werd uitgevoerd nog veel herbiciden werden gebruikt. De gevonden spreiding is dus hoogstwaarschijnlijk niet veroorzaakt door herbiciden, maar door andere factoren. In het tweede experiment kan de oorzaak hiervan niet meer in een fout bij de proefopstelling worden gezocht. Bij een dergelijke spreiding moet een effect van een herbicide zeer duidelijk zijn, wil het worden teruggevonden.

Voor een uitgebreid verslag van de veldexperimenten wordt verwezen naar bijlage 4.

5 CONCLUSIES, DISCUSSIE & AANBEVELINGEN

5.1 Conclusies

In algemene zin wordt geconcludeerd dat de kroostoets niet geschikt lijkt voor algemeen gebruik in het dagelijks waterkwaliteitsbeheer. Onderstaand wordt deze conclusie, aan de hand van de onderzoeksvragen gespecificeerd.

- I. Is er behoefte aan een kroostoets bij de waterschappen en aan welke eisen moet een dergelijke toets voldoen om te worden ingezet.

Als een kroostoets goed uitvoerbaar is, niet te duur en vooral goed interpreteerbare resultaten oplevert bestaat er belangstelling bij een aantal waterschappen om een kroostoets te gebruiken.

- II. Kan de kroostoets ook worden gebruikt voor het signaleren van effecten van herbiciden in het oppervlaktewater, dus bij blootstelling via het water?

Zowel uit de literatuur als uit de uitgevoerde experimenten blijkt dat een aantal herbiciden in het water tot groeiremming van klein kroos *Lemna minor* aanleiding geeft. Met de kroostoets zijn effecten van herbiciden te signaleren.

De methode waarbij de fotosynthese remming wordt gemeten kan een waardevolle aanvulling geven op de groeiemeting, met name waar het fotosynthese remmers betreft. Bij één van de vijf onderzochte middelen werd een effect aangetoond bij een concentratie die ook in de veldsituatie verwacht kan worden. Voor de andere middelen is dit niet het geval.

Uit de laboratoriumexperimenten blijkt verder dat er geen grote verschillen in gevoeligheid bestaan tussen *Lemna minor* en *Lemna gibba*. Ook laboratoriumexperimenten met *Lemna trisulca* zijn goed uitvoerbaar, maar de effecten lijken op basis van enkele oriënterende experimenten niet aanzienlijk te verschillen van de drijvende kroossoorten.

- III. Kunnen met de toets onder praktijkomstandigheden effecten van herbiciden worden aangetoond?

Uit laboratoriumproeven blijkt dat slechts een deel van de herbiciden effecten op kroos teweeg brengt, althans in concentraties gelijk of lager aan concentraties die op zouden treden wanneer de maximum velddosering in het oppervlaktewater terecht zou komen. Effecten bij 5% van de velddosering kunnen in het laboratorium worden aangetoond. Effecten bij lagere gehalten zijn niet significant verschillend van de onbehandelde opstellingen. Het is dus onwaarschijnlijk dat effecten bij minder dan 5% drift in het veld aangetoond kunnen worden. Daarnaast blijkt dat middelen die zich snel aan organisch materiaal binden, niet lang genoeg in het oppervlaktewater aanwezig zijn om tot effecten op de kroosgroei te kunnen leiden. Uit de veldproeven blijkt dat er een relatief grote spreiding in de kroosgroei optreedt. Het is daarmee onwaarschijnlijk dat effecten van 5% drift in het veld statistisch significant kunnen worden aangetoond. Aangezien 5% drift op dit moment als maximum voor een aantal belangrijke teelten wordt verondersteld, is het dus onwaarschijnlijk dat er met de kroostoets in de huidige opzet effecten van normale drift van herbiciden kunnen worden aangetoond. Met een groter aantal herhalingen is dit wellicht wel mogelijk. In de praktijk wordt dat echter een onuitvoerbaar opzet.

5.2 Discussie

Uit de resultaten blijkt dat de kroostoets weliswaar praktisch eenvoudig uitvoerbaar is, maar in het laboratorium niet gevoelig genoeg is om de in de praktijk verwachte gehalten aan te tonen. Tijdens de laboratoriumproeven is niet vastgehouden aan de protocollen voor de kroostoets zoals die door de ASTM (1991) of de OECD (1999) zijn ontwikkeld. In deze toetsen zijn de groeiomstandigheden optimaal en wordt een gemiddelde groeisnelheid per dag van ca. 0,2 gevonden. In de experimenten binnen dit onderzoek waren de omstandigheden suboptimaal waardoor de gemiddelde groeisnelheid 0,1 per dag bedroeg. Hiervoor is bewust gekozen omdat ook onder veldomstandigheden een maximale groeisnelheid van 0,1 wordt gevonden. Dit betekent dat de uitgevoerde experimenten relevant zijn voor de veldsituatie, maar mogelijk ongevoeliger dan de toetsen die volgens de standaardprotocollen zijn uitgevoerd. De gevonden EC_{50} waarden wijzen hier overigens niet op.

Een andere mogelijkheid is dat groei als effectparameter veel meer verstoringgevoelig is dan overleving. In het geval van toetsen met watervlooien wordt er na één week gekeken of de watervlooien overleven en worden verschillen in overleving als effect genoteerd. Hierbij is het zeer wel denkbaar (en in praktijk waarneembaar) dat er zich verschillen in conditie tussen de watervlooien op de verschillende monsterpunten voordoen. Zolang deze verschillen niet leiden tot het overlijden van watervlooien spelen deze echter bij het bepalen van de effectparameter (sterfte) geen rol. In het geval van kroos bepalen al dit soort invloeden mede de effectparameter (groei). In theorie is het mogelijk om de kroosgroei te modelleren met behulp van parameters als nutriënten temperatuur, licht etc. Omdat een aantal van deze parameters grote schommelingen vertonen, ook zeer lokaal, zou er dan ook lokaal en continu gemeten moeten worden. In de praktijk is dit niet haalbaar. Het is wel denkbaar dat een drijvende soort als *L. minor* gevoeliger is voor schommelingen in licht en temperatuur dan een ondergedoken soort. Daarom zou verkend kunnen worden of de variatie in groei bij ondergedoken soorten geringer is.

Het gebruik van een fluorescentiemeter laat zien dat er in het laboratorium snel effecten kunnen worden aangetoond van sommige middelen. Soms is de methode gevoeliger dan de groeiometing. De methode kan echter niet het meten van de groei vervangen, getuige de effecten van middelen die niet direct op de fotosynthese werken. Bovendien kan een effect op de fotosynthese reversibel zijn (Snel *et al.*, 1998), zodat de methode wellicht minder bruikbaar is voor lange termijn monitoring. De toepasbaarheid in het veld dient nog nader te worden onderzocht.

5.3 Aanbevelingen

De veldexperimenten laten zien dat de toets in praktische zin eenvoudig uitvoerbaar is, maar dat in de gekozen opzet de spreiding tussen de monsterpunten te groot is om effecten van in de praktijk te verwachten concentraties herbiciden aan te kunnen tonen.

Aanbevolen wordt om te onderzoeken of er andere aquatische plantensoorten zijn die gevoeliger zijn voor herbiciden dan kroos, en voor een breder scala aan herbiciden. Ook de praktische uitvoerbaarheid van een toets met zo'n plantensoort moet echter direct in beschouwing worden genomen, wil een toets een rol kunnen gaan spelen bij de waterschappen.

LITERATUUR

- Aartrijk, J. van, P. Groenendijk, J.J.T.I. Boesten, O.F. Schoumans & R. Gerritsen, 1995. Emissies van bestrijdingsmiddelen en nutriënten in de bloembollenteelt. Samenvatting. DLO-rapport 387.6, Wageningen.
- ASTM E 1415-91, 1991. Standard guide for conducting static toxicity tests with *Lemna gibba* G3. American Society for Testing and Materials.
- Aquasense, 1995. Ecotoxicologische waardering van oppervlaktewater; Vergelijking van testkits voor ecotoxicologische monitoring van oppervlaktewater in het Hoogheemraadschap van Rijnland. AquaSense afstudeerrapport 95.0705, HHvR, Leiden.
- Blackburn, R.D. & L.W. Weldon, 1965. The sensitivity of duckweeds (*Lemnaceae*) and *Azolla* to diquat and paraquat. *Weeds* 13: 147-149.
- Bouwman, G.M., P.C. Leendertse, N. Middelkoop & G.A. Pak, 1998. Schoner slootwater II. CLM rapport 370, CLM, Utrecht.
- CBS, 1997. Gewasbescherming in de land- en tuinbouw, 1995. CBS, Voorburg/Heerlen.
- CBS, 1998. CBS-Landbouwdatabank 1980-1998. CD-ROM. CBS, Voorburg/Heerlen.
- CIW, 1999. Bestrijdingsmiddelenrapportage (1999). Het voorkomen van bestrijdingsmiddelen in het Nederlandse oppervlaktewater in de periode 1992 t/m 1996. Werkgroep V van Commissie Integraal Waterbeheer.
- Crommentuijn, T., D.F. Kalf, M.D. Polder, R. Posthumus & E.J. van de Plassche, 1997. Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for pesticides. RIVM report 601501002. RIVM, Bilthoven.
- Grossman, K., R. Berghaus & G. Retzlaf, 1992. Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research. Comparison with screens using algae, germinating seeds and whole plants. *Pestic. Sci.* 35: 283-289.
- HHvR, 1993. Gebiedsgericht onderzoek naar de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen en meststoffen in het oppervlaktewater in tuinbouwgebieden. Hoogheemraadschap van Rijnland, Leiden.
- HHvR, 1996. Cijfers en Werken, jaaroverzicht 1994. Hoogheemraadschap van Rijnland, Leiden.
- Jenner, H.A. & J.P.M. Janssen-Mommen, 1993. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 3-11.
- Jong, F.M.W. de & W.F. Bergema, 1994. Field bioassays for side-effects of pesticides. CML report 112.
- Jong, F.M.W. de, Deneer, J.W. & W.L.M. Tamis, 2000. Veldbioassays. Ontwikkeling van een richtlijn voor veldbioassays met watervlooien en waterplanten voor het aantonen van bestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater. CML report 150, Leiden, Alterra rapport 061, Wageningen.
- Lahr, J. P.J. van den Brink & T.C.M. Brock, 1998. Ecologische risico's van bestrijdingsmiddelen in zoetwater ecosystemen, deel 1: herbiciden. SC-DLO, STOWA rapport 98-30, STOWA, Utrecht.
- Linders, J.B.H.J., J.W. Jansma, B.J.W.G. Mensink & K. Otermann, 1994. Pesticides: Benefaction or Pandora's box? RIVM report 679191914. RIVM, Bilthoven. 204 pp.
- Murphy, J. & J.P. Riley, 1958. A single solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 37: 9.
- Murphy, J. & J.P. Riley, 1962. A modified single solution method for the determination of soluble phosphate in natural waters. *Analytica chim. Acta* 27: 31.

- OECD, 1999. OECD guidelines for the testing of chemicals, proposal for a new guideline. *Lemna* growth sp. inhibition test. OECD draft document, december 1999.
- Oomen, P.A., H. Marsman, P.F.J. Oostelbos, M.E. Schoeman-Weerdesteijn & R. Wanningen (eds.), 1999. Gewasbeschermingsgids. Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen. 764 pp.
- Rijn, J.P. van, N.M. van Straalen & J. Willems, 1995. Handboek Bestrijdingsmiddelen; gebruik & milieu-effecten. VU Uitgeverij, Amsterdam.
- Retzlaff, G., 1993. Growth rate determination of *Lemna* by video scan of the leaf surface area. In: P. Böger & G. Sandmann (eds.). Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds. CRC Press, Florida.
- Snel, J.F.H., Vos, J.H., Gylstra, R. & T.C.M. Brock, 1998. Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquatic Ecology* 32: 133-123.
- STOWA, 1997a. Biomonitoringtechniek voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 1: inventarisatie en selectie van geschikte technieken. STOWA rapport 97-08, STOWA, Utrecht.
- STOWA, 1997b. Biomonitoringtechniek voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen. Deel 2: Keuzesysteem en praktijktoetsing. STOWA rapport 97-27, STOWA, Utrecht.
- Vlies, A.W. van der, S.A. Oldenkamp & H. Onstwedder, 1978. Enkele notities met betrekking tot de conservering van afvalwatermonsters: in het bijzonder door koelen en invriezen. *H₂O* (II): 14.

BIJLAGEN

BIJLAGE 1 Selectie herbiciden

Bijlage 1 Selectie herbiciden

Bronnen: Linders et al, 1994, Van Rijn et al, 1995, Crommentuijn et al., 1997.

Actieve stoffen	Chem. groep	Werking	Water-slib DT50(dgn)	log K _{ow}	Opname	Toxiciteit algem mg/l (96 uur)	mg/l	MTR-waater	Gemeten conc.	Teelt
asulam	carbamataat	remt celdeling	> 1 jr	2,6	w,b	0,015-0,0015 (8 d)	0,0029	0,0006		bolle mei maïs mei-juni mei-juni
atrazin	triazine	remt energieleverw. => verst. fs.	1017		w,b	279	0,064	0,00038		divers mei-juni
benazon	thiadiazoolverb.	remt elntp => verst. fs.	?		w,b	25,7	0,064			divers mei-juni
chlordazon	pyridazonverb.	remt elntp => verst. fs.	144		w	0,73 (120 u)	0,073			bic/bollen jan-mei
diquat dibromide	pyridineverb.	remt fs. (bov.gr => loofdoding)	>30	-4,6	bovengronds	0,011	0,0068			aardappel aug-sept
DNOC	dinitroalkylfenol	remt elntp cellen	35	2,39	w,b	3,2	0,021			aardappel jul-aug
glyfosaat	org. fosforverb.	remt az-prod.	<3->1277		b,s	11-64		aangeeftoffen		divers april-mei
isoproturon	ureumverb.	remt fs. bij blad- en stengelcontact? 34-124 d	89-239		blad,bodem	0,0032 (72 u)	0,00032	>MTR		granen jan-april
linuron	ureumverb.	remt elntp => verst. fs.	89-239		w,b	1,00				divers mei
MCPA	fenoxazijnzuur	auxine-imitatie (doodgroei)	35		w,b	56	0,0017	0,00027		divers mei
mecprop-p	fenoxypropionzuur	auxine-imitatie (doodgroei)	12 tot 44		w,b	220	0,0039			granen april-mei
metamitron	triazinon	verst. fs.	19	0,83	w,b	0,22		0,01		bolle/biet mei
paraquat	dipyridilium verb.	remt fs. Bij bladcontact			b					divers mei
propachloor	amilde	remt celdeling	150*	1,41	b,(w)	0,021	0,0013			maïs/divers april-mei
prosulfocarb	thiocarbamaat	remt celdeling in groeipunten	4,65		w,b	0,113				aardappel/maïs april-mei
pyridaat	pyridazineverb.	remt fs. bij blad- en stengelcontact? <1	>3		b,s	48				maïs/larwe mei-juni
simazin	triazine	remt fs. A	14-77		b	0,64	0,00014	0,083		bolle april-juni

* in water DT 50 2-7 d

BIJLAGE 2 Resultaten laboratoriumexperimenten

Bijlage 2 Resultaten laboratoriumexperimenten

In deze bijlage worden de resultaten van de laboratoriumexperimenten behandeld. Eerst wordt de kweekmethode beschreven; vervolgens worden de uitgevoerde experimenten in chronologische volgorde behandeld. Voorafgaande aan het eerste experiment met herbiciden worden de proefomstandigheden beschreven, inclusief metingen van het nutriëntengehalte. Bij de volgende experimenten worden dan alleen afwijkende omstandigheden genoemd.

Kweekmethode

Klein kroos *Lemna minor* is verkregen bij het IRI; het betreft een stam die al jarenlang in Nederland wordt gebruikt voor Laboratorium experimenten. Bultkroos *Lemna gibba* is verkregen bij BASF; het betreft de stam die in de standaard toxiciteittoetsen wordt gebruikt. Puntkroos *Lemna trisulca* is uit een sloot in de buurt van het laboratorium gehaald.

De kweek heeft plaatsgevonden in glazen bakken van 50x15x20 cm (lxbxh), gevuld met 5 liter leidingwater. Om het risico te spreiden zijn drie bakken ingezet. Als groeimedium is gebruik gemaakt van een commercieel verkrijgbare voeding (Blusana voeding voor hydrocultuur, verkrijgbaar in tuincentra), in de vorm van korrels. Voordeel hiervan is, naast de eenvoudige beschikbaarheid, dat deze korrels gedurende een langere periode door nalevering voor een vrij constant, hoog, nutriëntengehalte zorgen. De dosering hiervan bedraagt 0,5 g/l. De kweekbakken werden doorlucht.

Bij de kweek is gebruik gemaakt van verlichting d.m.v. twee tl-buizen van 35 watt elk op 70 cm boven de bakken, met een licht-donker regime van 16 uur licht en 8 uur donker. De temperatuur van de kweekruimte varieerde normaal gesproken tussen 22 en 25 °C, maar uitschieter naar 20 en 30 °C kwamen voor. De kweekbakken zijn elke drie weken schoongemaakt en het medium is elke drie weken ververs.

Methode laboratoriumexperimenten

De gang van zaken bij de laboratoriumexperiment was als volgt:

Er werden glazen potten met een inhoud van ca. 600 ml gebruikt, gevuld met 0,5 l leidingwater. Aan het water werd 0,25 g van het eerder genoemde korrelvormige substraat toegevoegd. In elke pot werden vervolgens 10 kroosplantjes bestaande uit 2 blaadjes toegevoegd.

De te testen concentraties zijn berekend op basis van drift naar een standaardsloot van 30 cm diepte. Alleen bij het eerste experiment is nog uitgegaan van 25 cm; de inzichten over een standaardsloot zijn inmiddels bijgesteld. Bij de te testen concentraties zijn in ieder geval ook onbelaste opstellingen meegenomen en opstellingen met een concentratie die overeenkomt met het toedienen van de veld dosering (100%). Het aantal herhalingen en concentraties verschilde per experiment. Het kroos werd na 14 dagen geoogst, waarbij het aantal blaadjes en het drooggewicht werden bepaald. Bij sommige experimenten werd ook na 1 week gekeken.

De experimenten vonden plaats bij ca. 22-25 °C (waarbij soms gedurende kortere perioden van enkele uren uitschieters naar 20 of 30 °C voorkwamen). De belichting bestond uit t.l. licht, 36 watt, 2 x 2900 lumen, op 70 cm boven de potten. Op het niveau van de potten gaf dit een lichtopbrengst van ca. 1800 lx. Er werd een licht-donker regime van resp. 16 en 8 uur aangehouden. Algen groei trad slechts zeer beperkt op.

Nutriënten gehalten

Opzet

Om inzicht te krijgen in het verloop van de nutriëntconcentraties tijdens een kroostoets zijn de concentraties fosfaat en nitraat gemeten bij verschillende hoeveelheden toegevoegde plantenvoeding (Blusana) en is bij een constante hoeveelheid plantenvoeding het concentratieverloop in de tijd gemeten in potjes met en zonder kroos. Ter vergelijking zijn ook fosfaat- en nitraatconcentraties in leidingwater en slootwater bepaald. Alle monsters zijn in duplo genomen.

Voor de concentratiereeksmetingen werden glazen potten ($d = 7,5$ cm) gevuld met 300 ml leidingwater. Hieraan werd 0,00; 0,05; 0,15; 0,30; 0,50; 1,20 of 2,00 g plantenvoeding toegevoegd. Iedere concentratie werd in tweevoud gemaakt. Na een incubatie bij kamertemperatuur van vijf dagen werden watermonsters verzameld. Per concentratie werd het monster in de verhouding 1 : 1 gepooled.

Watermonsters werden genomen na twintig minuten, een uur, een dag, na 7 dagen en na 17 dagen. Bij de potten waarvan het water na twintig minuten of na een uur bemonsterd werd, is geen kroos toegevoegd, omdat de invloed hiervan in zo korte tijd verwaarloosbaar geacht werd. Tabel B1 geeft een overzicht van de monsters met en zonder en kroos.

Tabel B1 Overzicht van de monsters met en zonder kroos bij de nutriëntmetingen.

Monstername		
Tijdstip	met	Zonder
0,3 uur	-	+
1 uur	-	+
7 dagen	+	+
17 dagen	+	-

De watermonsters werden bewaard bij een temperatuur van 4°C. Monsters van de tijdreeksmetingen werden in duplo genomen. Per monster werd 150 ml water verzameld. Wanneer analyse meer dan een dag na de monstername plaats vond, werd het monster bij -20°C bewaard (Van der Vlies *et al.*, 1978). De concentraties fosfaat en nitraat zijn spectrofotometrisch bepaald. De nitraatconcentratie is indirect bepaald. Na volledige reductie met titaan(III)chloride van de in het monster aanwezige nitraationen tot NH_4^+ -ionen werd de concentratie ammonium bepaald. Vervolgens werd de endogene ammoniumconcentratie gemeten. Het eerst gemeten gehalte werd hiervoor gecorrigeerd. De metingen zijn uitgevoerd in het laboratorium van de afdeling Milieubiologie. Het bleek niet mogelijk met de gebruikte methode de nitraatgehaltes nauwkeurig te bepalen. De berekende gehalten ammonium waren dikwijls kleiner dan de gehalten ammonium en gereduceerd nitraat, wat een negatieve concentratie nitraat zou betekenen. Hierdoor is het alleen mogelijk de gehalten ammonium en fosfaat te bespreken.

Analyse-methode

Fosfaat

De bepaling is uitgevoerd volgens een protocol gebaseerd op het werk van Murphy *et al.* (1958, 1962). Aan 30 ml monster werd in een 50 ml polypropyleen centrifugebuis 5 ml van een oplossing van 9,6 g antimoonheptamolybdaat $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ en 0,2 g kaliumantimoon(III)oxide $(\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_{6,0,5}\text{H}_2\text{O})$ in 1 liter 2 M zwavelzuur toegevoegd. Hierbij werd 1 ml ascorbinezuuroplossing (4%, w/v; Merck) gevoegd, waarna het totale volume met de

miwater op 50 ml werd gebracht. Er werd, alvorens 15 minuten te incuberen, goed gemengd. Met een spectrofotometer werd in kunststof 1 ml cuvetten bij een golflengte van 882 nm de absorptie gemeten. Er werd een ijkreeks meegenomen van 5 KH_2PO_4 -oplossingen (p.a., Merck) met concentraties van 0,0 tot 16,1 μM tijdens de meting. Wanneer de gemeten absorptie niet in het bereik van de ijkreeks viel, werd de meting herhaald met een kleinere hoeveelheid monster (bijvoorbeeld 10 ml).

Ammonium

Aan 15 ml monster werd in een 50 ml polypropyleen centrifugebuis onder mengen 2,5 ml 40% (w/v) natriumsalicylaatoplossing (Merck), 0,63 ml 8M NaOH-oplossing en 1 ml natriumprusside $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ met dichloorisocyaan (beide 0,1%, w/v) toegevoegd, waarna het totale volume met demiwater op 25 ml werd gebracht. Na mengen werd een uur geïncubeerd. Met een spectrofotometer werd in kunststof 1 ml cuvetten bij een golflengte van 650 nm de absorptie gemeten. Er werd een ijkreeks meegenomen van 6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oplossingen met concentraties van 0,0 tot 35,7 μM tijdens de meting. Wanneer de gemeten absorptie niet in het bereik van de ijkreeks viel, werd de meting herhaald met 5 ml monster. De absorptie van de bij ieder type meting meegenomen blanco (demiwater i.p.v. monster) werd van alle absorpties afgetrokken. Hierbij werd gecorrigeerd voor de hoeveelheid gebruikt monstermateriaal.

Resultaten nutriënt-analyses

De ammonium- en fosfaatconcentraties in leiding- en slootwater zijn weergegeven in tabel B2. Zoals verwacht heeft slootwater duidelijk hogere gehalten fosfaat en ammonium dan leidingwater.

Tabel B2 Fosfaat- en ammoniumgehalten in water uit verschillende bronnen.

Monster ¹	Fosfaat ($\mu\text{g P/l}$)	Ammonium ($\mu\text{g N/l}$)
Leidingwater	0,071	0,001
Slootwater	0,87	0,02

1: Alle gehalten zijn gecorrigeerd voor demiwater.

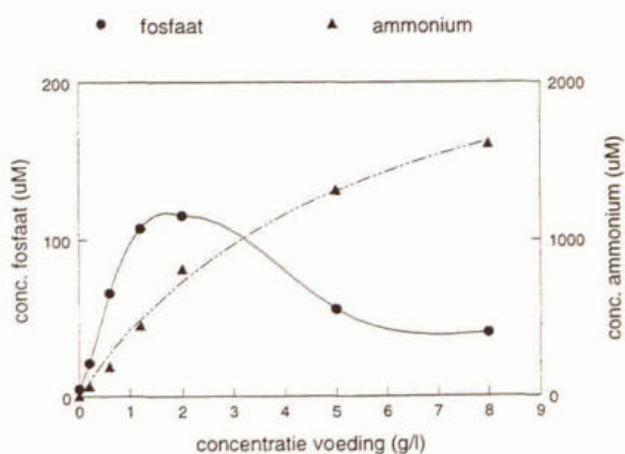
De tijdmetingen met de plantenvoedingskorrels Blusana in tabel B3 laat zien dat het fosfaatgehalte in de tijd toeneemt.

Tabel B3 Concentraties fosfaat en ammonium gevolgd in de tijd tijdens een kroostoets; data weergegeven als groepsgemiddelde \pm STD; - = geen meting.

Tijdstip	Zonder kroos	Met kroos
<i>Fosfaat ($\mu\text{g P/l}$)</i>		
0,3 uur	0,010 \pm 0,001	-
1 uur	0,015 \pm 0,000	-
7 dagen	0,25 \pm 0,1	0,25 \pm 0,04
17 dagen	-	0,22 \pm 0,02
<i>Ammonium ($\mu\text{g N/l}$)</i>		
0,3 uur	0,031 \pm 0,004	-
1 uur	0,062 \pm 0,004	-
7 dagen	0,16 \pm 0,05	0,18 \pm 0,00
17 dagen	-	0,067 \pm 0,025

Waarschijnlijk lost het middel Blusana op tot een evenwichtssituatie is bereikt. Het bereiken van deze situatie duurt gelet op de metingen, meer dan een dag. Naar schatting zal het ongeveer een dag duren voor een concentratie gelijk aan die in de natuurlijke situatie (slootwater) bij deze dosis korrels is bereikt. In aanwezigheid van kroos treedt tussen zeven en zeventien dagen een kleine afname van het fosfaatgehalte op. Dit wordt waarschijnlijk door de evenwichtsinstelling in het oplossen van de voedingskorrels bepaald aangezien uit vergelijking na zeven dagen geen beïnvloeding van de gehalten door de aanwezigheid van kroos blijkt. Het verloop van de concentratie ammonium vertoont ongeveer hetzelfde beeld.

In figuur B1 zijn de concentraties fosfaat en ammonium na incubatie van vijf dagen van verschillende hoeveelheden voedingskorrels in leidingwater geschetst. De fosfaatconcentratie na vijf dagen is maximaal bij een dosis van 2 g/l. De concentratie in het water is dan ongeveer 115 μM (36 E-8 g P/l). Bij grotere dosering is de concentratie in het water lager. De bij de kroostoets gebruikte hoeveelheid Blusana (0,5 g/l) levert na vijf dagen een concentratie van ongeveer 66 μM (20 E-8 g P/l). Dit is ruim twee maal zo hoog als de concentratie in slootwater, maar lager dan het maximum. Het maximum van de curve wordt voor ammonium bij de gebruikte hoeveelheden Blusana niet bereikt. Ook deze oploscurve is echter niet lineair. De bij de kroostoets gebruikte hoeveelheid voedingskorrels geeft na vijf dagen een concentratie van 192 μM (59 E-8 g P/l). Dit is ruim honderd maal de in slootwater gemeten hoeveelheid.



Figuur B1 Gehaltes fosfaat en ammonium in leidingwater vijf dagen na toevoeging van een hoeveelheid van het plantenvoedingsmiddel Blusana; bij de kroostoets is 0,5 g/l gebruikt.

Experimenten met herbiciden

Er zijn experimenten uitgevoerd met de volgende 11 herbiciden: Asulam, Bentazon, Chlorigazon, Diquat, Glyfosaat, Isoproturon, Linuron, MCPA, Metamitron, Paraquat en Simazin. Deze experimenten worden per middel in die volgorde behandeld waarin ze zijn uitgevoerd. In het hoofdrapport wordt een en ander gebundeld en wordt aangegeven wat de betekenis voor de ontwikkeling van een veldtoets is. Waar mogelijk (voldoende herhalingen) zijn de verschillen tussen de concentraties en de blanco getoetst met behulp van een eenzijdige T-toets. EC_{50} waarden zijn geschat door een rechte lijn te veronderstellen tussen de twee punten onder en boven het 50% effect (bij uitzetten tegen het logaritme van de dosis). Door deze

methode wordt een onnauwkeurigheid geïntroduceerd. De experimenten waren echter niet opgezet om een EC_{50} waarde te berekenen: de concentraties bevonden zich met name in het lage gebied. Het berekenen van de EC_{50} is dan ook niet meer dan een benadering, die een mogelijkheid geeft om de experimenten met elkaar en literatuurgegevens te vergelijken.

Diquat

In het laboratorium zijn verschillende experimenten uitgevoerd met diquat-dibromide. Dit middel wordt vnl. gebruikt voor het doodspuiten van aardappelloof en is ook eerder bij het CML in een kroosexperiment gebruikt (de Jong & Bergema, 1995), waarbij het kroos van bovenaf, dus via de lucht en het blad, werd blootgesteld. Het eerste experiment had met name tot doel om te achterhalen of een middel, waarvan bekend is dat het bij blootstelling via het blad grote effecten heeft, deze effecten ook te zien geeft bij blootstelling via de wortel. Bovendien moest ervaring worden opgedaan met dit type laboratoriumexperimenten. In de eerste twee experimenten was de eigen krooskweek nog niet voldoende op gang gekomen en is gebruik gemaakt van kroos uit een sloot in de buurt van het laboratorium.

Eerste experiment diquat

In het eerste experiment zijn vier concentraties toegepast: de concentratie die zou ontstaan wanneer de maximale velddosering direct in een 25 cm diepe sloot zou worden verspoten; 10, 1 en 0,1 % hiervan; daarnaast werden onbehandelde opstellingen meegenomen. Hierbij is uitgegaan van een maximale velddosering van 5l Reglone/ha; volgens de verpakking bevat deze formulering 200g/l; navraag bij de fabrikant leerde dat het daadwerkelijke gehalte 192g/l bedroeg. Omgerekend betekent dit dat de bioassays een startconcentratie bevatten van resp. 0, 0,38 $\mu\text{g/l}$, 3,84 $\mu\text{g/l}$, 38,4 $\mu\text{g/l}$ en 384 $\mu\text{g/l}$. Per behandeling werden 10 glazen potten ingezet; 5 potten werden na 1 week geoogst, de overige 5 na 14 dagen.

Tweede experiment diquat

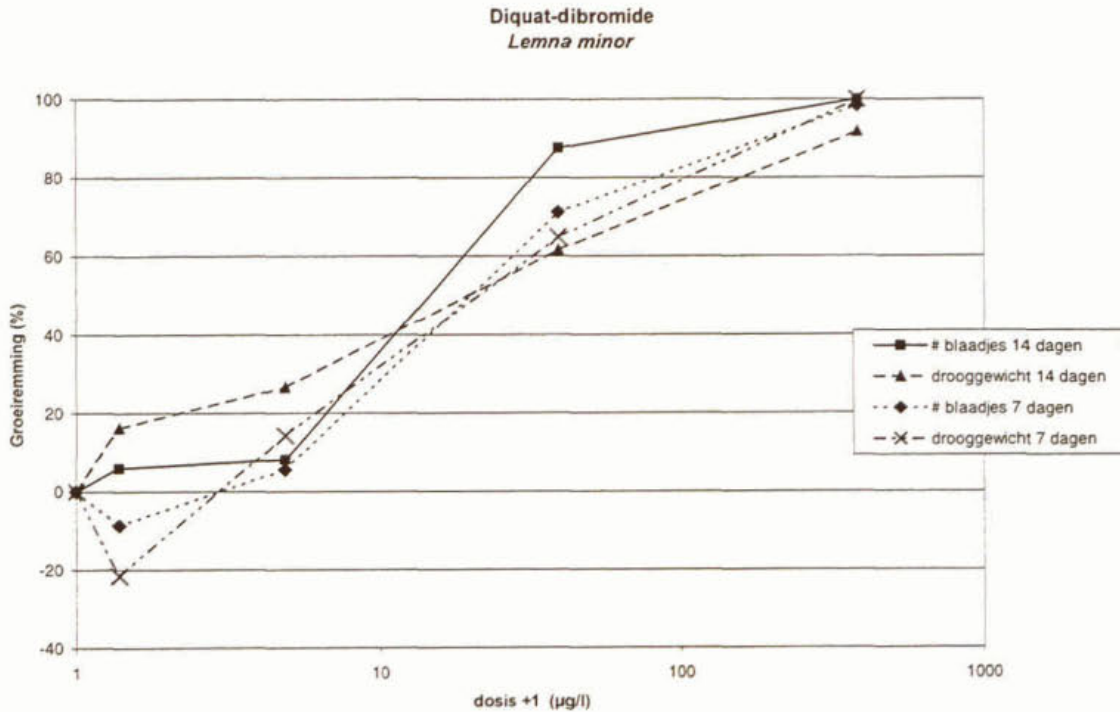
In het tweede experiment is uitgegaan van een slootdiepte van 30 cm; dit is de nieuwe standaard (mond.med. Brock, Alterra). Daarnaast is een blootstelling van 5% van de velddosering toegevoegd. Omgerekend komt de concentratiereeks nu neer op: 0, 0,32 $\mu\text{g/l}$, 3,2 $\mu\text{g/l}$, 16 $\mu\text{g/l}$, 32 $\mu\text{g/l}$ en 320 $\mu\text{g/l}$. In dit experiment werden per concentratie 5 potten genomen en werd, naar aanleiding van de resultaten van het eerste experiment de oogst na één week achterwege gelaten. Wel werden bij dit experiment per concentratie 5 potten met bodemmateriaal toegevoegd, die overigens dezelfde behandeling kregen. Reden hiervoor was het gegeven dat diquat zich sterk bindt aan organisch materiaal, en er wellicht met bodemmateriaal een volledig andere uitkomst verwacht mocht worden.

Aangezien het slechts voorbereidende experimenten betrof, waarbij het er vooral om ging om te bezien of er "kinderziektes" optraden, de toets op deze manier kan worden uitgevoerd, en er ook werd gezocht naar de belangrijkste effectparameters, is er in deze experiment voor gekozen om nog geen metingen te verrichten.

Als effect parameters zijn bepaald: de graad van verkleuring, het aantal blaadjes en het drooggewicht. Meting van het natgewicht bleek slecht mogelijk omdat bij verwijdering van het aanhangende water de indruk bestond dat ook direct vocht aan de kroosplantjes werd onttrokken.

Resultaten

De resultaten van de experimenten met diquat staan grafiek B2 en B3 weergegeven.

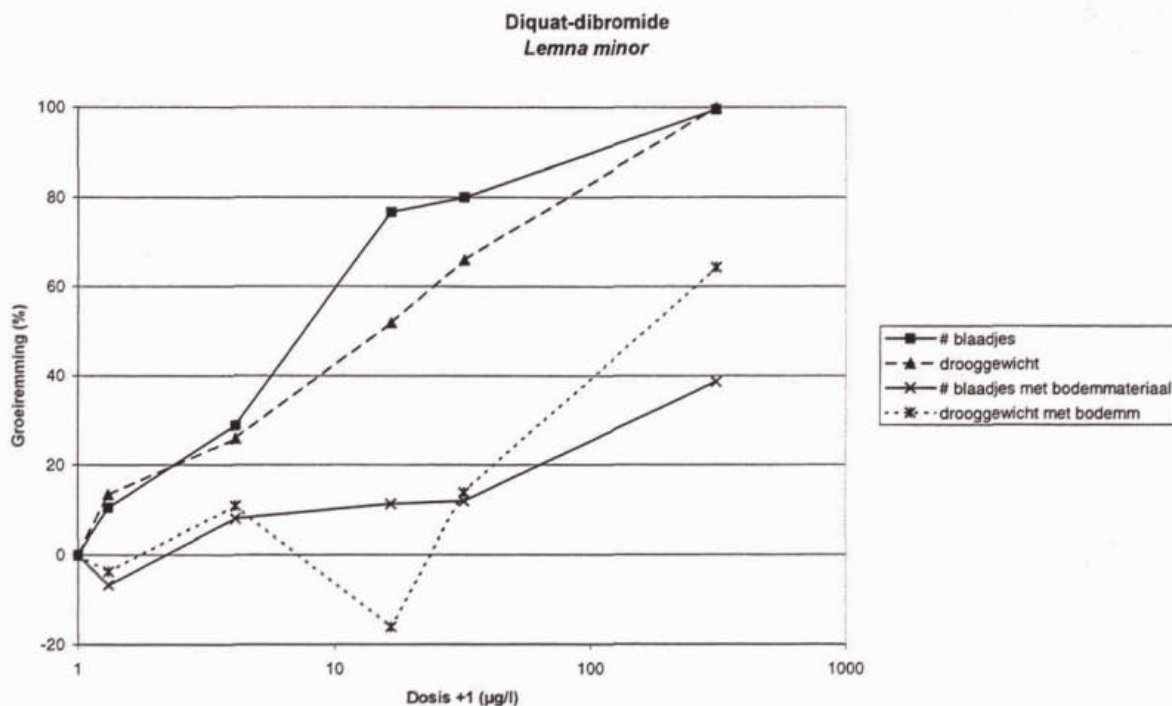


Figuur B2 Laboratoriumexperiment met diquat; kroos afkomstig uit een sloot; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie is 0,12; de effecten in de hoogste twee concentraties (10 en 100%) verschillen significant van de blanco; bij 1% is dit alleen het drooggewicht na 14 dagen.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes 7 dagen	19
Aantal blaadjes 14 dagen	14
Drooggewicht 7 dagen	20
Drooggewicht 14 dagen	19

Uit figuur B2 en B3 blijkt dat er in de remming van de groei gemeten in drooggewicht een grote overeenkomst tussen het eerste en het tweede experiment bestaat. Opvallend is dat dit verschil groter is als naar het aantal blaadjes wordt gekeken; blijkbaar is het drooggewicht een stabielere maat. Besloten is om beide parameters te bepalen. In dit eerste experiment is ook gekeken of de verkleuring van de bladeren en het oppervlakte van het kroos als effectparameter bepaald kunnen worden. Voor wat betreft de verkleuring blijkt dat, omdat een classificatie noodzakelijk is, hierdoor de nauwkeurigheid zoveel lager wordt dat deze maat niet zinvol lijkt. Voor wat betreft het oppervlakte zijn er technische problemen (fotografie en contrast) die deze maat praktisch ongeschikt maken.

De concentraties waarbij effecten zijn gevonden (tot 1% van de velddosering), zijn niet onrealistisch in de huidige landbouwpraktijk. Een depositie van 1% is ook na het invoeren van driftreducerende maatregelen realistisch. De EC₅₀ ligt in de buurt van de 5% drift. De gevonden waarde komt overigens zeer goed overeen met de literatuur-waarde van 18 µg/l (zie bijlage 3).



Figuur B3 Laboratoriumexperiment met diquat; kroos afkomstig uit een sloot; effecten bepaald na 13 dagen; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie: 0,11 d.g., 0,11 # blaadjes; de effecten bij 5, 10 en 100% zonder bodemmateriaal verschillen significant van de blanco.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes zonder bodemmateriaal	6
Drooggewicht zonder bodemmateriaal	14
Aantal blaadjes met bodemmateriaal	162
Drooggewicht met bodemmateriaal	>320

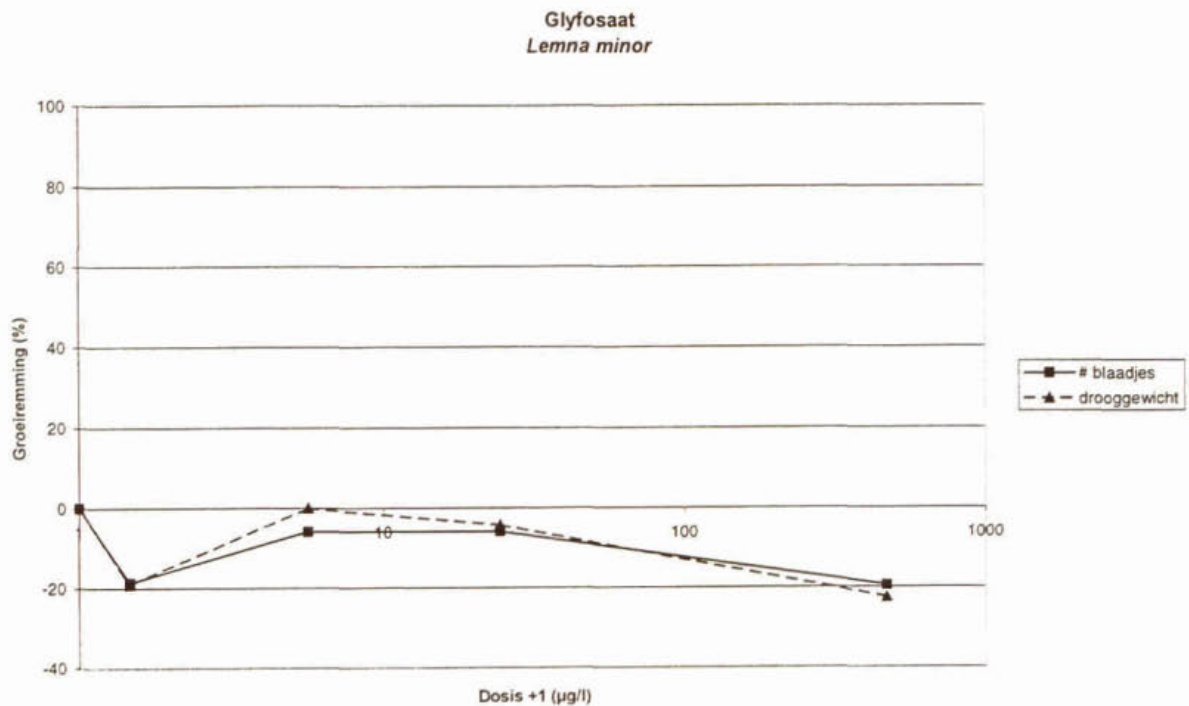
Uit figuur B3 blijkt echter dat het toevoegen van bodemmateriaal een grote invloed heeft. Ook uit literatuur was reeds bekend dat diquat zich sterk hecht aan organisch materiaal (zie bijlage 3). Met bodemmateriaal wordt er alleen in de hoogst blootgestelde bioassays een significant effect gevonden. In de praktijk wordt het middel dan ook zelden aangetroffen in de waterkolom. Bij blootstelling van bovenaf in een enclosure in een sloot zijn wel vergelijkbare effecten gevonden (De Jong & Bergema, 1994).

Glyfosaat

Glyfosaat is als tweede middel geselecteerd omdat dit door de waterkwaliteitsbeheerders in de begeleidingscommissie als een probleemstof is genoemd. Bovendien is het een breedwerkend middel, dat wordt gebruikt om vegetaties dood te spuiten, zodat ook op kroos effecten mogen worden verwacht.

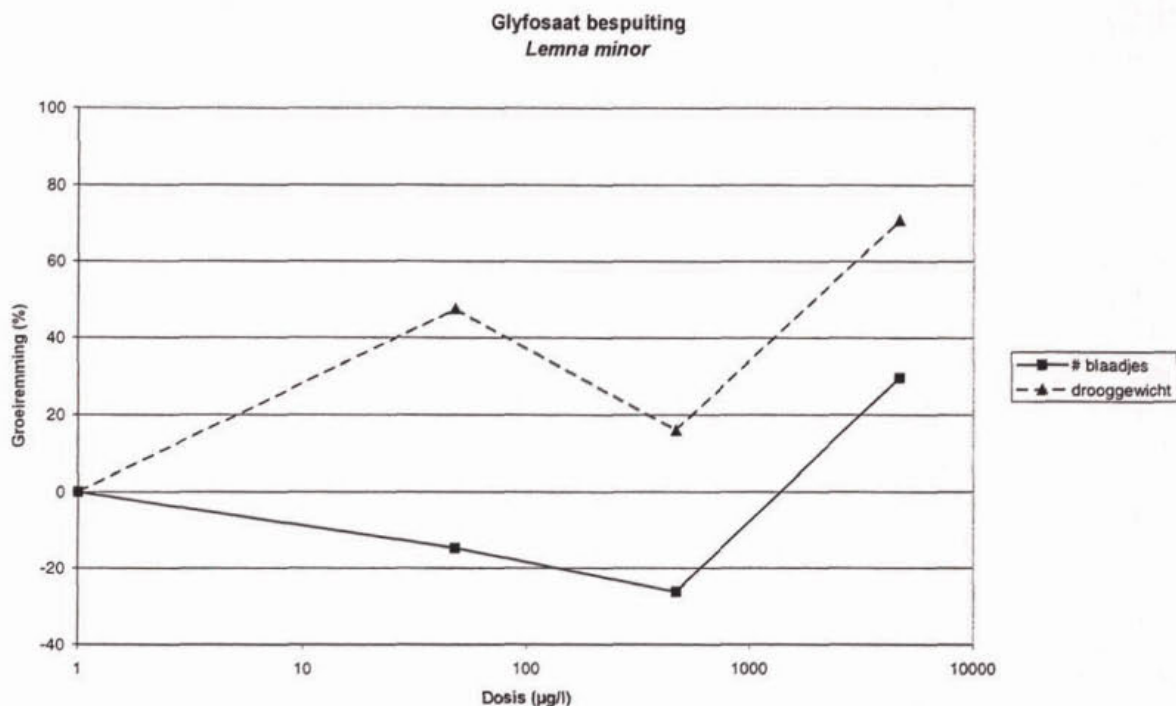
Er is uitgegaan van een gemiddeld hoge dosering roundup van 4 l/ha (360 g/l glyfosaat). Er is een concentratiereeks gemaakt gebaseerd op een blootstelling van de sloot van 0, 0,1%, 1%, 5% en 100% en in 5-voud uitgevoerd. Volgens de berekening was de toediening in de 100% concentratie 468 µg/l. Ter controle is de concentratie ook (door TNO-CIVO) bepaald. De concentratie bleek 500 µg/l. Dit geeft aan dat er iets hoger is gedoseerd dan de bedoeling was.

Dit kan zowel veroorzaakt zijn door een fout bij het verdunnen; ook is het mogelijk dat er een afwijking in het handelsproduct aanwezig was. Aangezien er zelfs bij de hoogste concentratie geen effect werd gevonden (zie figuur B4), is de afwijking niet van belang.



Figuur B4 Laboratoriumexperiment met glyfosaat; kroos afkomstig uit eigen kweek; effecten bepaald na 14 dagen; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie is 0,09; glyfosaat geeft geen significante groeiremming te zien; $EC_{50} > 500 \mu\text{g/l}$.

Uit de resultaten van het experiment blijkt duidelijk dat glyfosaat via het water geen effect heeft op de kroosgroei. De meest aannemelijke verklaring voor het ontbreken van een effect is dat glyfosaat voornamelijk door het blad wordt opgenomen (via de huidmondjes). Aangezien bij kroos de huidmondjes aan de bovenzijde zitten is het goed denkbaar dat er geen interne blootstelling heeft plaatsgevonden. Om deze hypothese te testen is vervolgens een experiment uitgevoerd waarbij het kroos van bovenaf is bespoten. Het experiment is in duplo uitgevoerd, en de toegediende concentraties zijn 0, 10, 100 en 1000% van de veld dosering. Ook bij blootstelling van bovenaf lijkt het erop dat klein kroos niet erg gevoelig is voor glyfosaat (figuur B5). Pas bij 10 x de veld dosering is er een duidelijk effect op zowel het drooggewicht als het aantal blaadjes.



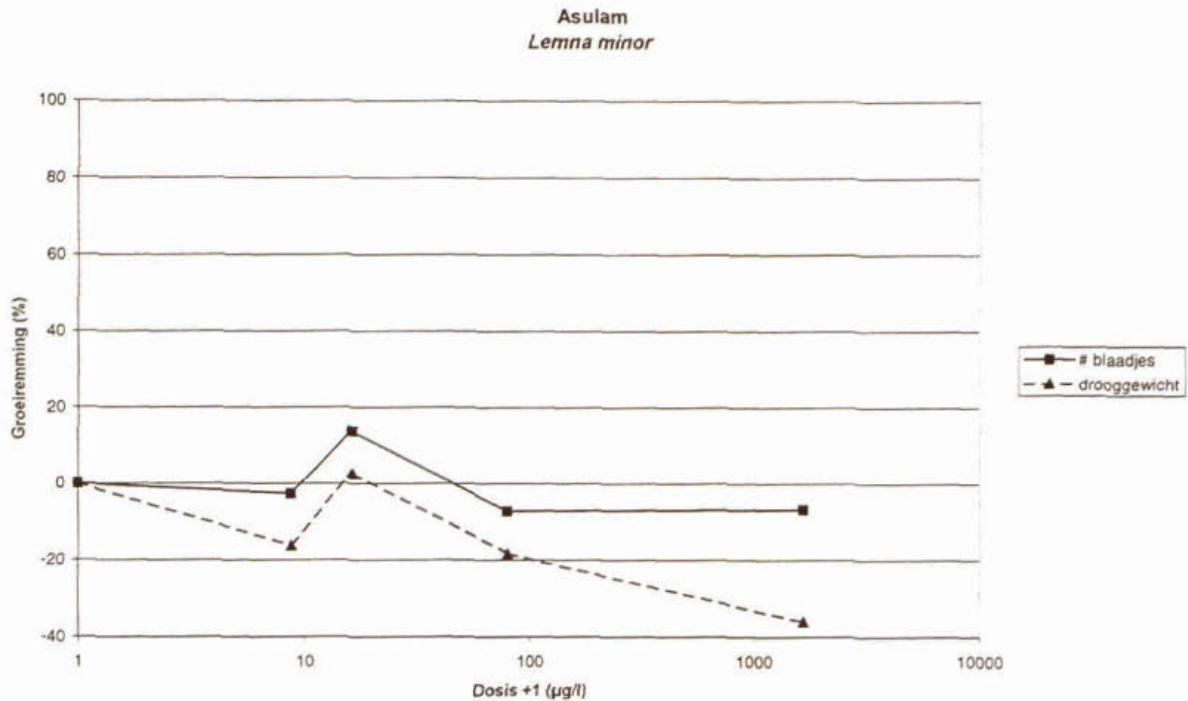
Figuur B5 Laboratoriumexperiment met glyfosaat bij blootstelling van bovenaf; kroos afkomstig uit eigen kweek; effecten bepaald na 14 dagen; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie is 0,08 d.g.

Uit de beschikbare gegevens kon verder niet worden afgeleid wat de oorzaak is van de ongevoeligheid van kroos in deze laboratoriumexperimenten. Uit bijlage 3 blijkt dat in de literatuur een EC_{50} voor kroos gevonden van 2 mg/l. Deze concentratie wordt in de sloot ongeveer bereikt bij 10x de velddosering. De hier gevonden resultaten zijn dus wel in overeenstemming met de literatuurgegevens.

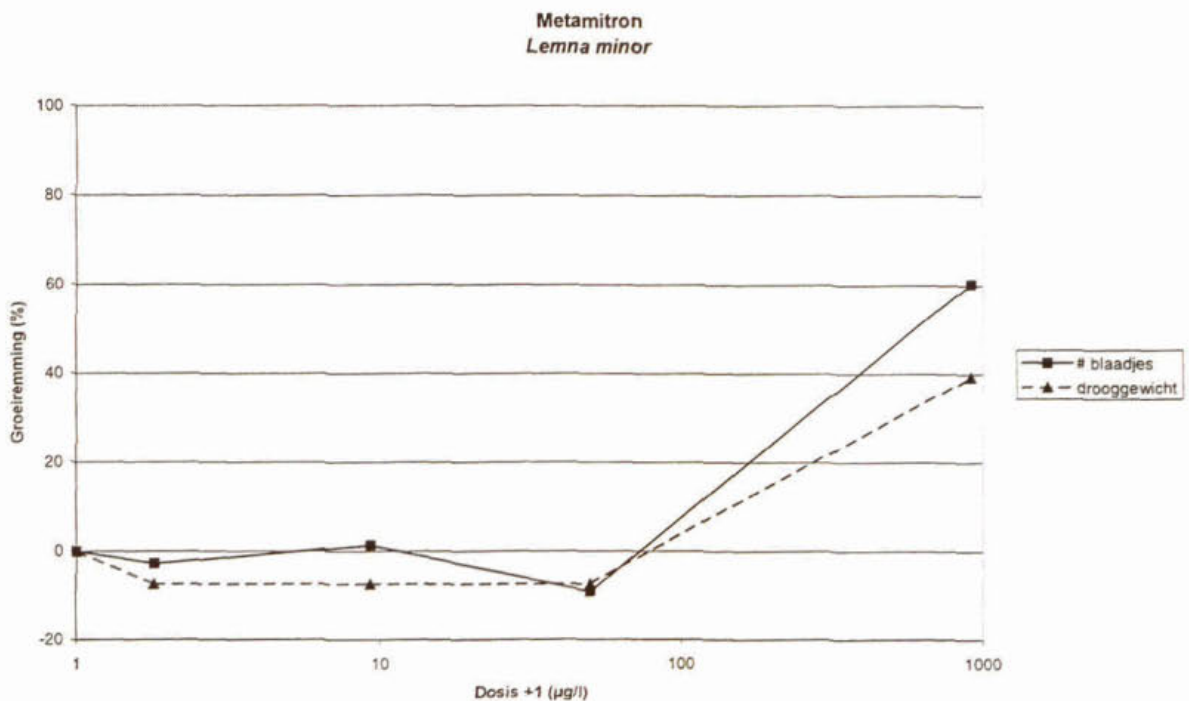
Asulam en met amitron

Na de eerste verkennende experimenten zijn vervolgens twee uitgebreide experimenten uitgevoerd met asulam en met amitron. Dit zijn twee herbiciden die in de bollenteelt veel worden gebruikt. Oorspronkelijke reden om deze stoffen te kiezen was de deelname aan een experiment bij Alterra. Uiteindelijk is aan die experimenten niet deelgenomen.

In figuur B6 staan de resultaten van het experiment met asulam weergegeven. Uit de figuur blijkt dat asulam geen effecten op de kroosgroei te zien geeft, bij gehalten die in de praktijk verwacht kunnen worden. De meetresultaten (zie tabel B4) laten zien dat de gemeten dosering twee maal zo hoog is als de berekende. Blijkbaar is hier een doseringsfout gemaakt. In dit geval betekent dit echter des te meer dat er geen effecten van dit middel verwacht hoeven te worden, temeer dat ook na 7 dagen het middel nog aanwezig is; vanwege verdamping van water is de concentratie zelfs iets hoger geworden.



Figuur B6 Laboratoriumexperiment met asulam; kroos afkomstig uit eigen kweek; effecten bepaald na 14 dagen; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie is 0,08; er treedt geen significante groeiremming op; $EC_{50} > 1660 \mu\text{g/l}$.



Figuur B7 Laboratoriumexperiment met metamitron; kroos afkomstig uit eigen kweek; effecten bepaald na 14 dagen; gemiddelde groeisnelheid per dag in de referentie: 0,08; de effecten bij de hoogste dosering zijn significant; de EC_{50} ligt rond de hoogste dosering ($EC_{50} = \text{ca. } 913 \mu\text{g/l}$).

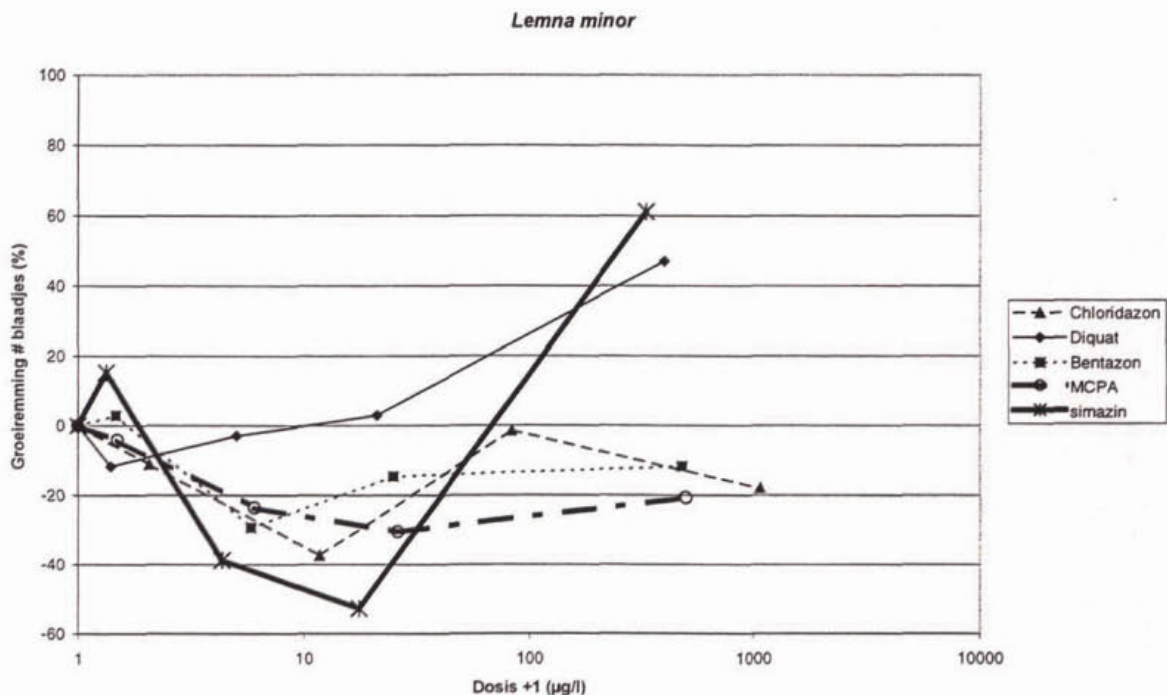
In figuur B7 staan de resultaten van het experiment met metamitron uitgezet. Hieruit blijkt dat alleen bij de velddosering een effect wordt gevonden. Uit de metingen van het middel (tabel B5) blijkt dat de berekende waarden goed overeenkomen met de gemeten waarden, en dat het middel ook na 7 dagen nog in de oplossing aanwezig is.

Tabel B4 Berekende en gemeten waarden voor de gehalten asulam en metamitron.

Dosering	Asulam (mg/l)			Metamitron		
	Berekend	Gemeten bij aanvang	Gemeten na 7 dagen	Berekend	Gemeten bij aanvang	Gemeten na 7 dagen
100%	0,80	1,66	1,87	0,91	0,913	0,854
5%	0,040	0,078	0,086	0,0455	0,049	0,047
1%	0,0080	0,015	0,0161	0,0091	0,0083	0,0089
0,1%	0,0008	0,077	0,0028	0,00091	0,0008	0,0009

Experiment met verschillende middelen.

De voorafgaande resultaten laten zien dat klein kroos in het laboratorium niet erg gevoelig is voor een aantal veelgebruikte middelen. Om nu te bezien of deze trend algemeen is, is een aantal toetsen uitgevoerd met verschillende veelgebruikte middelen. De resultaten van deze experimenten met simazin, MCPA, bentazon en chloridazon staan weergegeven in figuur B8. In de figuur is alleen de groei op basis van het aantal blaadjes weergegeven; de figuur met het drooggewicht is volledig vergelijkbaar. Ter vergelijking is ook diquat weer meegenomen. De experimenten zijn slechts in duplo uitgevoerd, omdat het ging om een indruk van de effecten van verschillende herbiciden.



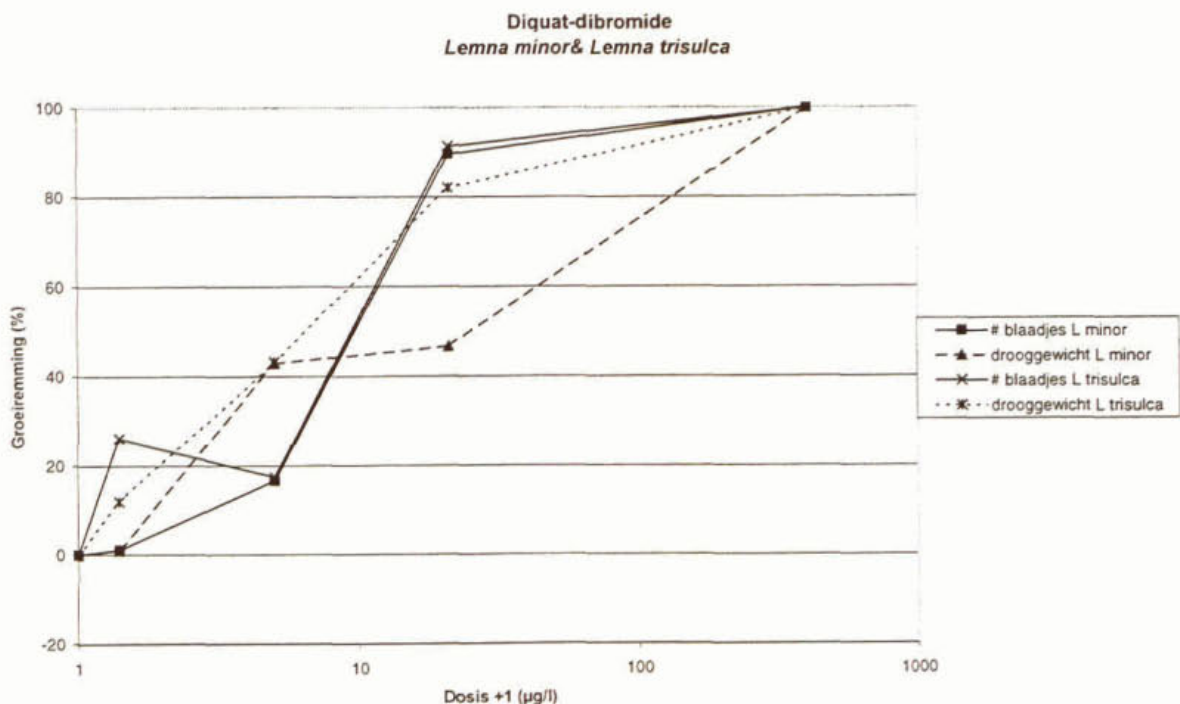
Figuur B8 Laboratoriumexperiment met een aantal herbiciden; kroos afkomstig uit eigen kweek; aantal blaadjes bepaald na 14 dagen.

Bij de resultaten moet worden opgemerkt dat groei in de referentie relatief laag uitkomt. Vanwege het oriënterende karakter van dit experiment is echter geen meting van het aanvangsgewicht uitgevoerd, zodat niet bepaald kan worden of de groei in de referentie daadwerkelijk gering is. De cijfers van diquat duiden hier wel op; in principe wordt hier weer een duidelijk verband gevonden, alleen is de groei in de blanco relatief gezien te laag.

Ondanks het bovenstaande blijkt uit de resultaten dat er, met uitzondering van de velddoseering met diquat en simazin, geen duidelijke effecten konden worden aangetoond. De resultaten van deze toets roepen veel vragen op omtrent de oorzaken van het niet aantreffen van een effect. Een van de waarschijnlijkste hypothesen is dat er via de wortel van het kroos nauwelijks blootstelling plaatsvindt. Teneinde deze hypothese te toetsen is een experiment uitgevoerd waarbij ook *Lemna trisulca*, een volledig ondergedoken kroossoort is meegenomen.

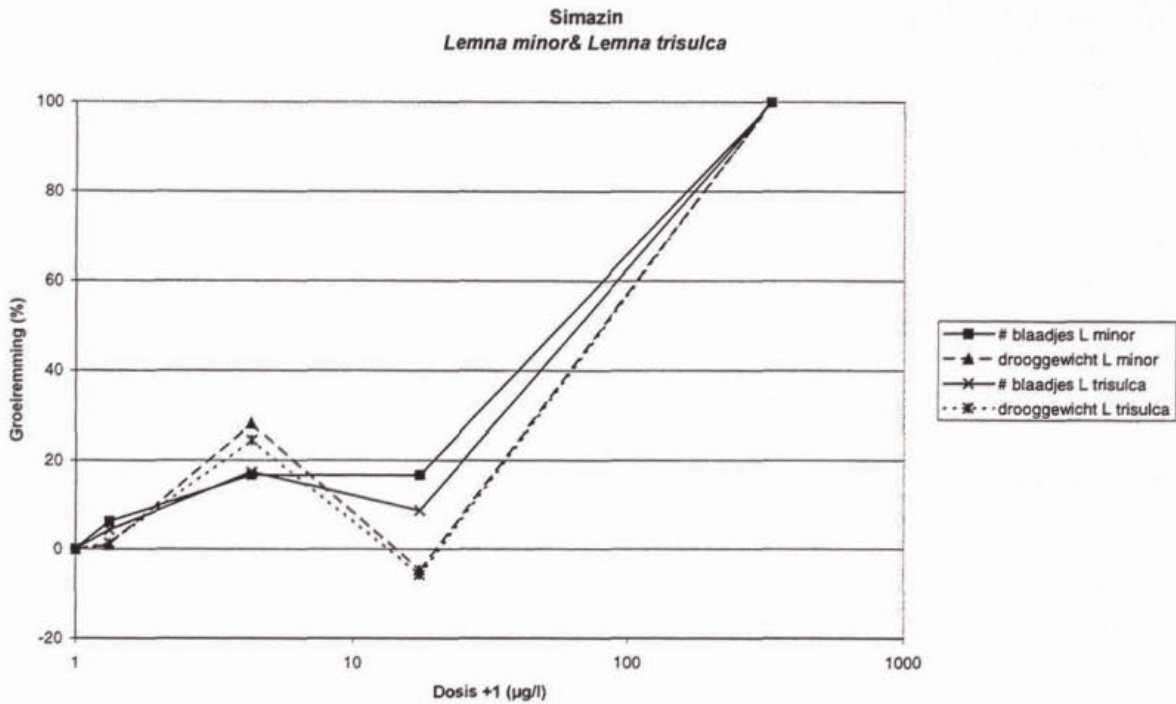
Experiment met *Lemna trisulca*

De experimenten met *Lemna trisulca* hadden tot doel om te onderzoeken of er via een andere blootstellingsroute wellicht wel effecten zouden worden gevonden. De resultaten staan weergegeven in de figuren B9 t/m B11. Vanwege het oriënterende karakter is de toets slechts in enkelvoud uitgevoerd, zodat de verschillen tussen de behandelingen niet zinvol statistisch konden worden getoetst.



Figuur B9 Laboratoriumexperiment met diquat en *L. minor* en *L. trisulca*; effect bepaald na 14 dagen.

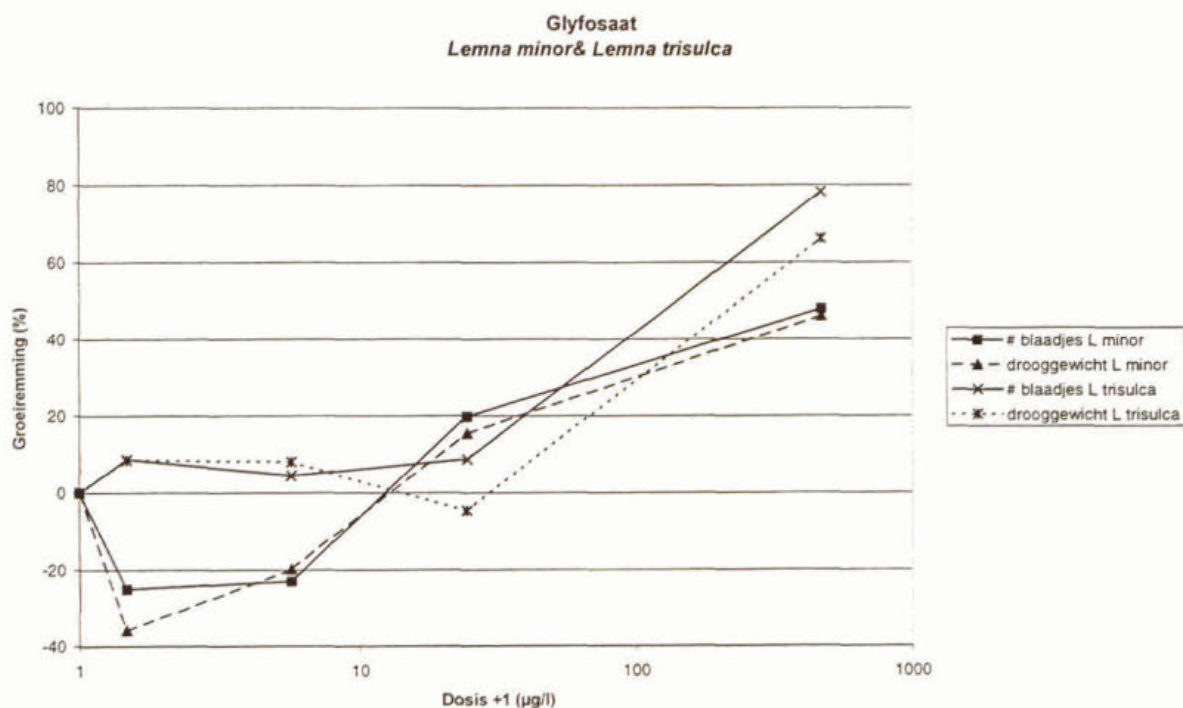
Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	8
Drooggewicht <i>L. minor</i>	23
Aantal blaadjes <i>L. trisulca</i>	8
Drooggewicht <i>L. trisulca</i>	5



Figuur B10 Laboratoriumexperiment met simazin en *L. minor* en *L. trisulca*; effect bepaald na 14 dagen.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	55
Drooggewicht <i>L. minor</i>	80
Aantal blaadjes <i>L. trisulca</i>	65
Drooggewicht <i>L. trisulca</i>	81

Uit de resultaten van deze experimenten blijkt dat de gevoeligheid van de beide soorten elkaar weinig ontlopen. In het geval van glyfosaat reageert *Lemna trisulca* in de hoogste concentratie iets gevoeliger dan *Lemna minor*, wat verklaard zou kunnen worden doordat dit middel voornamelijk via het blad wordt opgenomen. Ook nu heeft glyfosaat bij lagere gehalten echter geen effect op de groei. Geconcludeerd wordt dat de verschillen gering zijn en het niet of wel aantreffen van een effect niet te verklaren valt uit het verschil tussen een ondergedoken soort en een drijvende kroossoort. Overigens blijkt wel dat experimenten met *Lemna trisulca* in het laboratorium eenvoudig uitvoerbaar zijn.



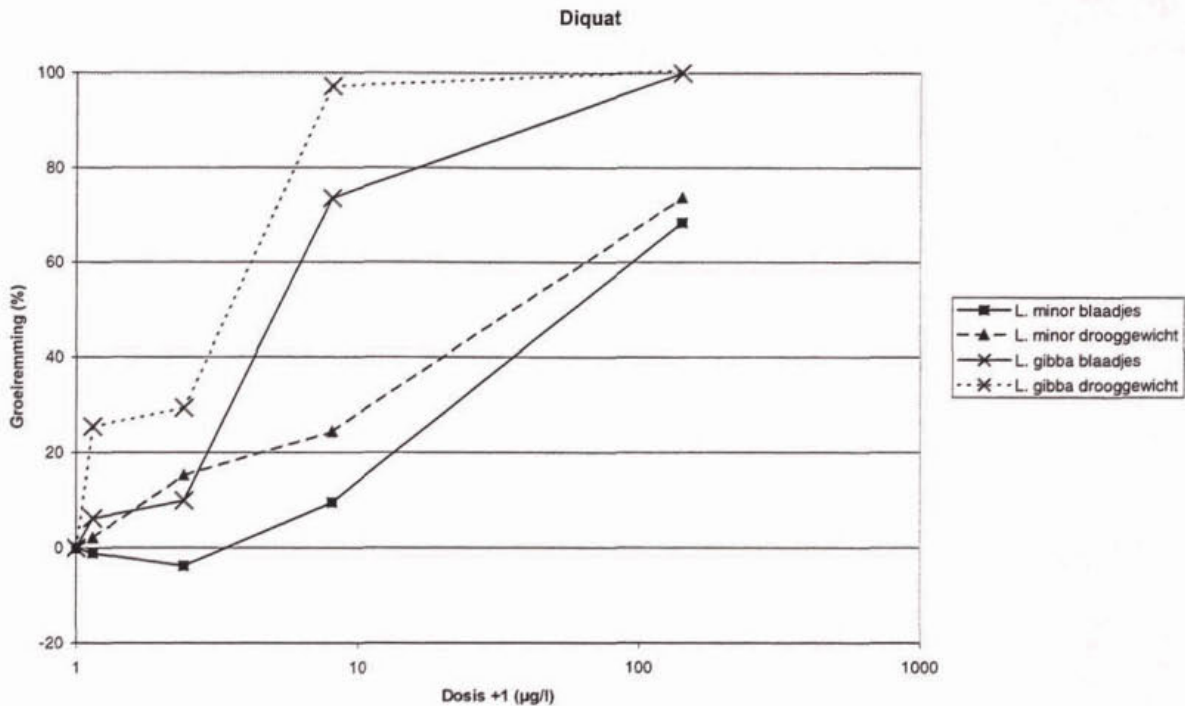
Figuur B11 Laboratoriumexperiment met glyfosaat en *L. minor* en *L. trisulca*; effect bepaald na 14 dagen.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. trisulca</i>	140
Drooggewicht <i>L. trisulca</i>	237

Vergelijking *Lemna minor* en *Lemna gibba*.

Naar aanleiding van de voorafgaande resultaten kon niet direct worden geconcludeerd dat de kroostoets kansrijk is. Als al in het laboratorium, onder relatief gecontroleerde omstandigheden, geen effecten kunnen worden aangetoond van veelgebruikte middelen, valt a-priori zeker niet te verwachten dat dit in het veld wel het geval zal zijn. Dit is echter enigszins in tegenspraak met het gebruik van *Lemna gibba* in laboratoriumtoetsen. De laatste mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat de gevoeligheid van *L. minor* sterk af zou wijken van die van *L. gibba*. Daarom zijn nog vijf experimenten uitgevoerd, waarbij een vergelijking tussen deze soorten is gemaakt. Als "standaard" is hierbij diquat meegenomen. Daarnaast zijn drie middelen gekozen waarvan op basis van literatuurgegevens (zie bijlage 3) effecten verwacht zouden mogen worden (te weten: isoproturon, linuron en paraquat) en één middel met een lagere toxiciteit (MCPA). De toxiciteitsgegevens zijn gebaseerd op gegeven van *L. gibba*.

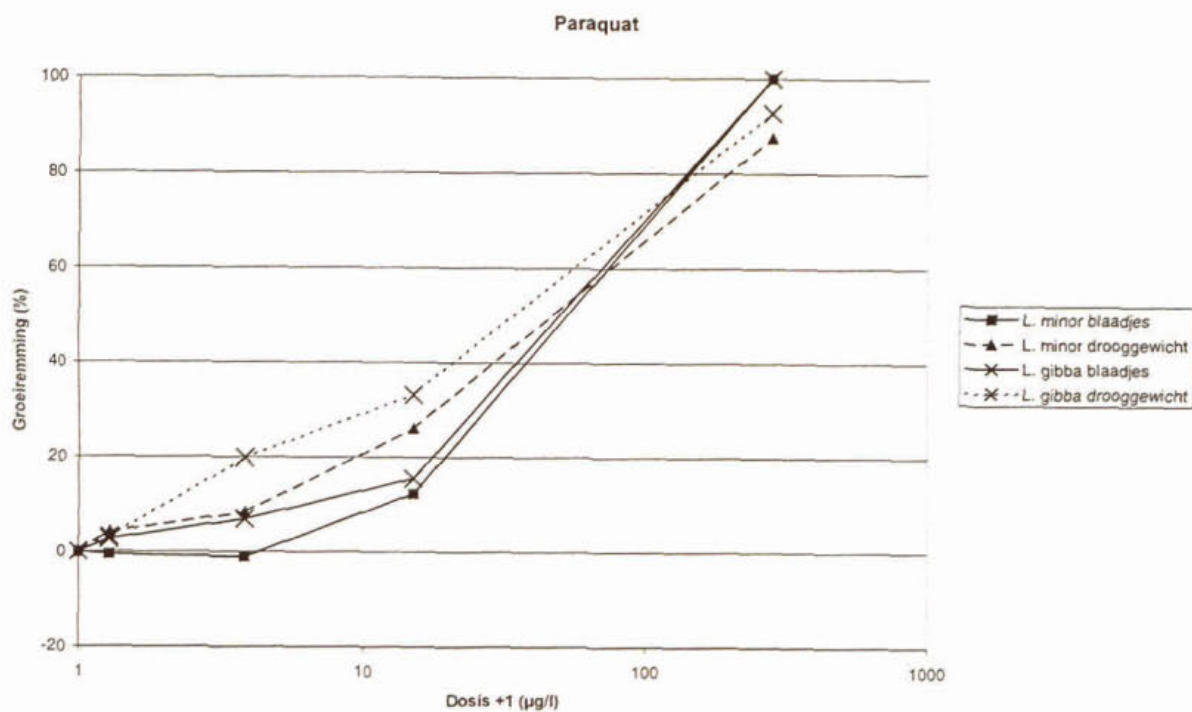
De resultaten van deze experimenten worden gegeven in de figuren B12 t/m B16. In alle experimenten was het kroos afkomstig uit eigen kweek en werden de effecten na 14 dagen waargenomen. In deze experimenten is ook het gehalte van het middel bepaald in de hoogste dosering, waarbij een monster is genomen op het moment van inzetten en na 8 dagen.



Figuur B12 Laboratoriumexperiment met diquat; groeisnelheid referentie: *L. minor* 0,1 en *L. gibba* 0,09 bij; *L. gibba* worden bij alle concentraties significant van de blanco; bij *L. minor* alleen bij de hoogste concentratie en bij 5% bij het drooggewicht.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	57
Drooggewicht <i>L. minor</i>	35
Aantal blaadjes <i>L. gibba</i>	4
Drooggewicht <i>L. gibba</i>	2

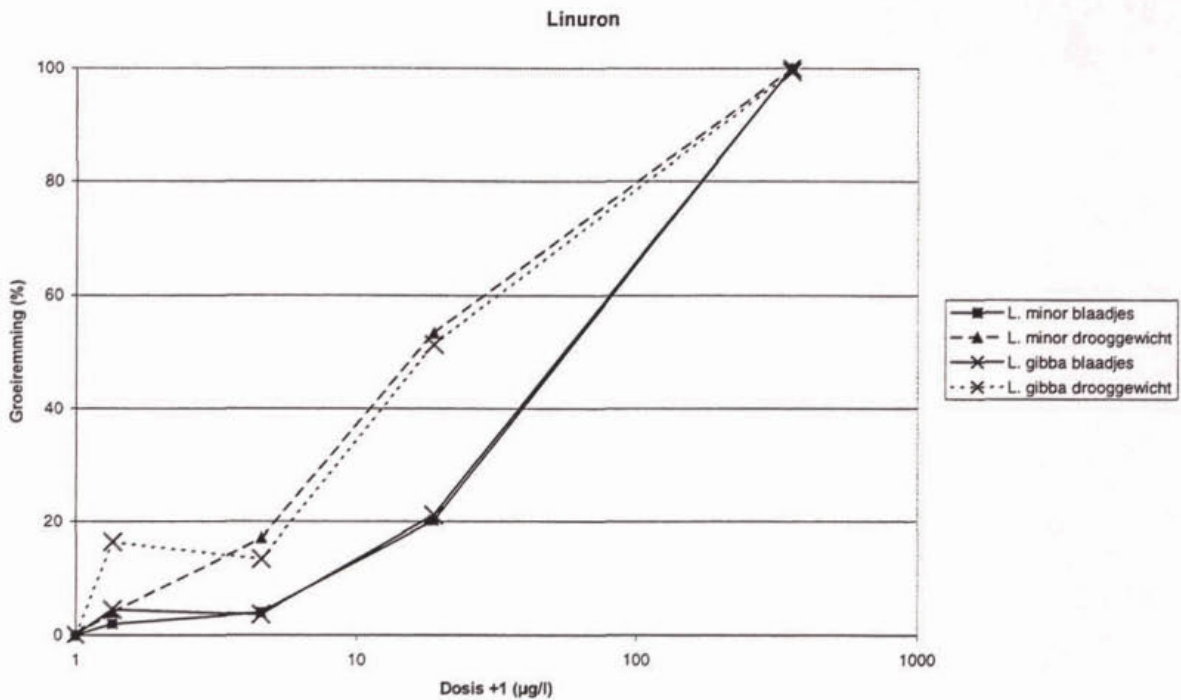
Uit de meting van diquat blijkt dat er slechts ongeveer de helft (141 µg/l) is gedoseerd van de hoeveelheid die was berekend (333 µg/l). De oorzaak hiervan is niet aan te geven. Er kan gedacht aan een verdunningsfout, ook kan het gehalte in de stokoplossing gedaald zijn. De grafiek en de EC₅₀ waarden zijn gebaseerd op de gemeten waarden. Na een week is er nog slecht 12 µg/l diquat aanwezig. Dit is in overeenstemming met de eerdere experimenten, waaruit blijkt dat diquat zich sterk bindt aan organisch materiaal.



Figuur B13 Laboratoriumexperiment met paraquat; groeiselheid referentie: *L. minor* 0,10, *L. gibba* 0,11; bij de twee hoogste concentratie (100% en 5% velddosering) zijn alle effecten significant verschillend van de blanco.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	52
Drooggewicht <i>L. minor</i>	46
Aantal blaadjes <i>L. gibba</i>	48
Drooggewicht <i>L. gibba</i>	33

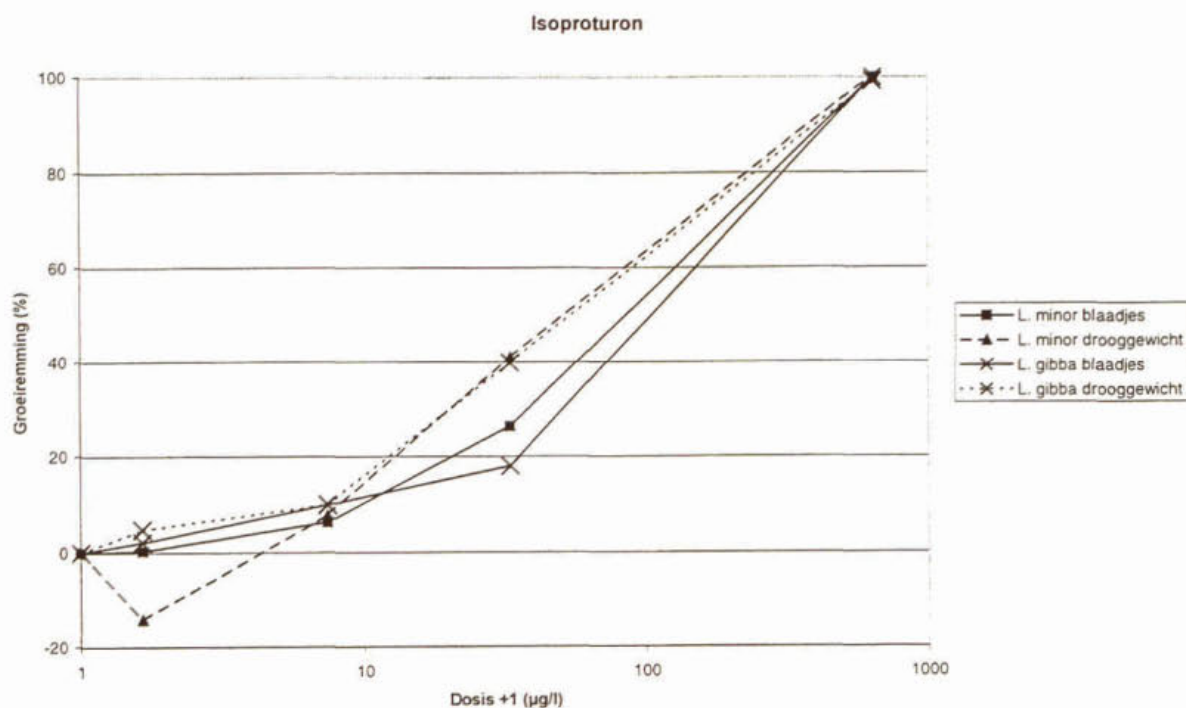
Ook in het geval van paraquat is er minder toegediend dan berekend (280 µg/l in plaats van 333 µg/l). Na 8 dagen is de hoeveelheid paraquat duidelijk afgenomen tot 74 µg/l. Ook paraquat bindt goed aan organisch materiaal, zodat dit een mogelijke verklaring vormt.



Figuur B14 Laboratoriumexperiment met linuron; groeisnelheid referentie: *L. minor* 0,13, *L. gibba* 0,10; bij de twee hoogste concentratie (100% en 5% velddosering) zijn alle effecten significant verschillend van de blanco.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	55
Drooggewicht <i>L. minor</i>	14
Aantal blaadjes <i>L. gibba</i>	54
Drooggewicht <i>L. gibba</i>	16

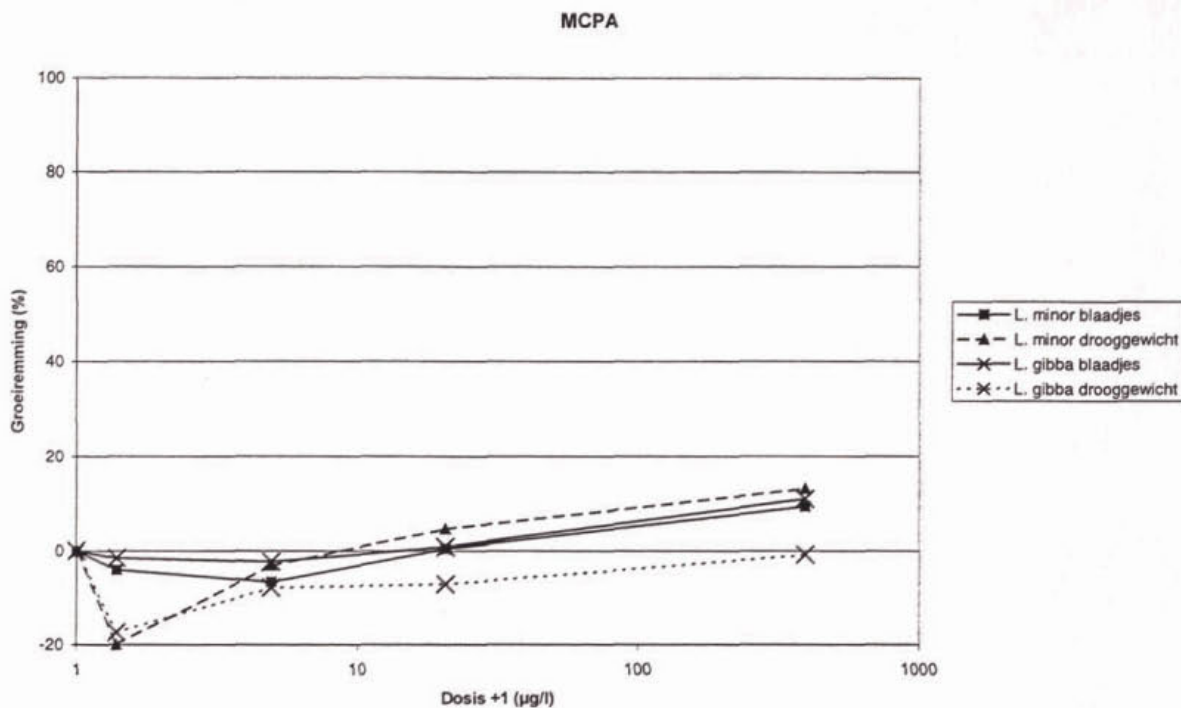
In het geval van linuron komen de berekende en de gemeten hoeveelheid redelijk overeen (resp. 375 en 355 µg/l). Voor de bepaling na 8 dagen is per abuis de 5% concentratie geanalyseerd. Ook hier komen de berekende en de gemeten waarden (resp. 17 en 14 µg/l) goed overeen, zodat er kennelijk weinig afbraak of binding heeft plaatsgevonden. Dit komt overeen met de verwachting op basis van de stoffeigenschappen.



Figuur B15 Laboratoriumexperiment met isoproturon; groeisnelheid referentie: *L. minor* 0,13, *L. gibba* 0,11; bij de twee hoogste concentratie (100% en 5% velddose-ring) zijn alle effecten significant verschillend van de blanco; bij 1% verschilt alleen het aantal blaadjes bij *L. gibba* significant van de blanco.

Parameter	EC ₅₀ µg/l
Aantal blaadjes <i>L. minor</i>	85
Drooggewicht <i>L. minor</i>	51
Aantal blaadjes <i>L. gibba</i>	104
Drooggewicht <i>L. gibba</i>	54

Ook bij isoproturon komen de berekende en de gemeten hoeveelheid goed overeen (resp. 666 en 641 µg/l). Na 8 dagen heeft er nauwelijks enige afbraak plaatsgevonden (gehalte 622 µg/l). Ook hier was dit de verwachting op basis van de stoffeigenschaften.



Figuur B16 Laboratoriumexperiment met MCPA; groeisnelheid referentie: *L. minor* 0,13, *L. gibba* 0,12; geen significante groeiremming t.ov. onbehandeld; $EC_{50} > 400 \mu\text{g/l}$.

In het geval van MCPA is er te weinig gedoseerd (392 $\mu\text{g/l}$ i.p.v. 500 $\mu\text{g/l}$). Na 8 dagen is het gehalte gedaald tot 196 $\mu\text{g/l}$. Er wordt echter ook bij de hoogste dosering geen significant effect aangetroffen.

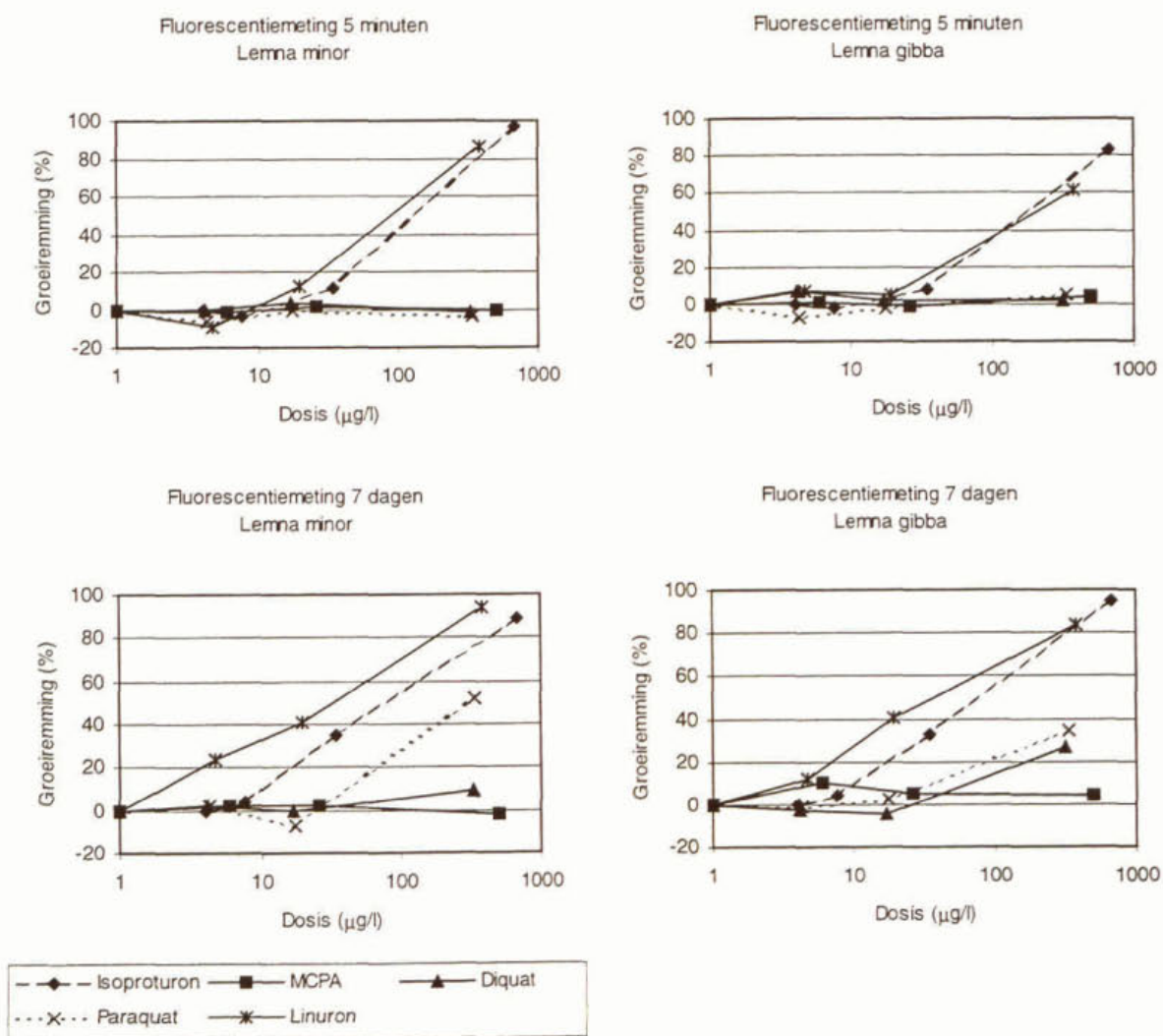
Uit de resultaten van de laatste vijf experimenten blijkt dat de verschillen in effect van bestrijdingsmiddelen in de onderzochte range tussen *Lemna minor* en *Lemna gibba* zeer gering zijn. De verschillen tussen soorten lijken dus geen invloed te hebben. Op de betekenis van deze resultaten voor de ontwikkeling van een veldtoets wordt in hoofdstuk 3 uitgebreid ingegaan.

Meting van de fotosyntheseremming

Veel bestrijdingsmiddelen werken door middel van een verstoring van de fotosynthese. Daarom is uitgeprobeerd of directe meting van de fotosynthese een alternatief zou bieden voor de meting van de kroesgroei. Er is gebruik gemaakt van een Planten Photosynthese Metter, MJHD versie (EARS). De opzet is hierbij gelijk aan de voorafgaande proeven. Er is een eenmalige dosering, die in principe in de potten aanwezig blijft. Aangezien het hier ging om een eerste screening van de bruikbaarheid van de methode, zijn er slechts twee herhalingen gehanteerd, en is een statistische analyse van de resultaten niet aan de orde. De resultaten staan weergegeven in figuur B17.

Uit figuur 17 blijkt dat er bij twee middelen (Linuron en Isoproturon) die direct op de fotosynthese werken in de hoogste dosering reeds na 5 minuten een groot effect meetbaar is. Dit effect wordt ook na één week nog gevonden. Ook in lagere doseringen wordt een effect gevonden, bij Linuron ook bij de concentratie die mag worden verwacht bij 1% drift. In dit geval lijkt deze methode gevoeliger dan het bepalen van de groei. Opvallend is dat er visueel nauwelijks een onderscheid is tussen de behandelde en de onbehandelde opstellingen. In het

geval van MCPA wordt geen effect aangetroffen. Dit is in overeenstemming met de groeimetingen (Fig. B16). Bij diquat en paraquat wordt nauwelijks en pas na zeven dagen een effect gemeten, terwijl er wel een duidelijk zichtbare aantasting is, en ook de groeimeting (fig. B12 en B13) een duidelijk effect liet zien. Voor metingen direct in het veld is de methode ongeschikt, de hoeveelheid licht buiten maakt het niet mogelijk een gevoelige meting uit te voeren. Wanneer kroosbakjes aan het donker worden geadapteerd vorm deze methode voor bepaalde middelen wellicht een alternatief. Voor andere middelen, die niet direct op de fotosynthese werken, is de methode weinig gevoelig.



Figuur B17 Laboratoriumexperimenten met vijf herbiciden waarbij na 5 minuten en 7 dagen de fotosynthese remming met behulp van een fluorescentiemeter is bepaald.

Er zou nog moeten worden onderzocht of er ook effecten kunnen worden aangetoond van een eenmalige piekbelasting, waarbij een middel maar kort in het oppervlaktewater aanwezig is. Als ook dan na enkele dagen nog een effect meetbaar zou zijn, is de methode wellicht ook voor de veldsituatie van betekenis, omdat dan eenvoudig een piekbelasting zou kunnen worden aangetoond.

BIJLAGE 3 Samenvatting literatuurgegevens herbiciden

Bijlage 3 Samenvatting literatuurgegevens herbiciden
Bronnen: STOWA, 1997b, Lahr *et al.*, 1998, EPA database.

Herbiciden 1999	Dosis kg/ha	Blootstel- ling mg/l	Toxiciteit algen (96 uur)		Toxiciteit kroos		Potentieel effect algen		Potentieel effect kroos		Effect kroos/ effect alg
			EC50 mg/l	NOEC mg/l	EC50 mg/l	NOEC mg/l	blts/EC50	blst/NOEC	blts/EC50	blst/NOEC	
acлонifen	3	0,050	0,03	0,00			1,72	15,63			
amidosulfuron	0,04	0,001									
amitrol	6	0,100	1,30	1,00			0,08	0,10			
asulam	3	0,050			0,14	0,07			0,36	0,71	
atrazin	5	0,083		0,00	0,04	0,01		55,56	2,25	8,33	
benazolin	0,53	0,009									
bentazon	1,44	0,024	279,00	25,70	1,03	1,53	0,00	0,00	0,02	0,02	270,09
bifenox	1,12	0,019	130,00	0,00			0,00	5,83			
boraaat 10%	2	0,033									
bromoxynil 250g/l	2	0,033			0,22	0,08			0,15	0,43	
broomfenoxim	2,25	0,038	2,30	0,80			0,02	0,05			
buminafos	10	0,167	1,40	0,32			0,12	0,52			
carbaryl	1,5	0,025		0,01				2,50			
carbeetamide	2,1	0,035	210,00	0,14			0,00	0,25			
chloorbromuron	1,5	0,025	0,02				1,47				
chloormequat	2,43	0,041									
chloorprofam	2,4	0,040	3,30	0,32	0,75		0,01	0,13	0,05		4,41
chloorthal-dimethyl		0,000									
chloortoluron	2,5	0,042		0,01	0,01			4,17	4,63		
chloridazon	3,2	0,053		0,73	4,88			0,07	0,01		
clodinafop-propargyl	0,16	0,003	62,00	62,00			0,00	0,00			
clopyralid	1,5	0,025			89,00				0,00		
cloquintoceet-mexyl	0,04	0,001	0,40	0,01			0,00	0,07			
cycloxydim	0,6	0,010	32,00	11,00			0,00	0,00			
2,4-D	3	0,050	25,00	0,22	7,52		0,00	0,23	0,01		3,33
daminozide	3,84	0,064	5,20	1,00			0,01	0,06			
desmedifam	0,04	0,001	1,05	0,05	0,33	0,33	0,00	0,01	0,00	0,00	3,18
desmetryn	0,375	0,006									
dicamba	0,2	0,003		25,00	3,25	0,20		0,00	0,00	0,02	
dichlobenil	24	0,400	10,00	18,00			0,04	0,02			
dichloorprop-p	3	0,050	220,00	180,00			0,00	0,00			
diflufenican	0,25	0,004	10,00	10,00			0,00	0,00			
dinoterb	1,8	0,030	7,40	1,00			0,00	0,03			
diquat dibromide	1	0,017	0,01	0,01	0,02	0,01	1,52	2,45	0,93	1,52	0,61
diuron	2,8	0,047		0,01	0,04	0,00		9,33	1,14	20,29	
DNOC	7	0,117		3,20	0,11			0,04	1,07		
EPTC	7,5	0,125	1,40	0,50			0,09	0,25			
ethefon	3,2	0,053			1,60	0,10			0,03	0,53	
ethofumesaat	2	0,033									
fenchlorazool-ethyl	0,047	0,001	0,41				0,00				
fenmedifam	1,2	0,020	1,40				0,01				
fenoxaprop-p-ethyl	0,77	0,013	0,50	0,32			0,03	0,04			
ferrosulfaat	400	6,667									
fluazifop-P-butyl	0,75	0,013	46,80	0,30			0,00	0,04			
fluorglycofen-ethyl	0,15	0,003									
fluroxypyr	0,3	0,005	100,00	56,00			0,00	0,00			
glufosinaat-ammonium	1	0,017		100,00				0,00			
glyfosaat	2,16	0,036	11,00	1,00	2,00	16,91	0,00	0,04	0,02	0,00	5,50
glyfosaat-trimesium	5	0,083	11,00				0,01				

Herbiciden 1999 Actieve stoffen	Dosis kg/ha	Blootstel- ling mg/l	Toxiciteit algen (96 uur)		Toxiciteit kroos		Potentieel effect algen		Potentieel effect kroos		Effect kroos/ effect alg
			EC50	NOEC	EC50	NOEC	blts/EC50	blst/NOEC	blts/EC50	blst/NOEC	
			mg/l	mg/l	mg/l	mg/l					
haloxyfop-p-methyl	0,13	0,002	107,00	10,00			0,00	0,00			
imazamethabenz-methyl	1,5	0,025	127,00	50,00			0,00	0,00			
ioxynil	0,8	0,013	10,00				0,00				
isoproturon	2,25	0,038	11,00	0,00	0,03		0,00	11,72	1,14		333,33
isoxaflutool		0,000									
lenacil	2	0,033	0,01	0,01			2,38	3,33			
linuron	1,5	0,025	1,00	0,01	0,03	0,01	0,03	2,50	0,93	2,59	37,04
maleine hydrazide	2,25	0,038	72,00	20,00	114,00	23,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63
MCPA	3,2	0,053		56,00	0,17	0,05		0,00	0,31	1,07	
mecoprop-p	1,8	0,030	220,00	56,00			0,00	0,00			
metamitron	4,2	0,070	0,22	0,10			0,32	0,70			
metam-natrium	750	12,500									
metazachloor	1,5	0,025	1,63	0,34			0,02	0,07			
methabenzthiazuron	3,5	0,058	0,04	0,02	0,03		1,39	3,24	2,01		1,45
metobromuron	2	0,033	0,26	0,10			0,13	0,33			
metolachloor	2,5	0,042	0,07	0,03			0,62	1,34			
metoxuron	2,4	0,040	0,06	0,02			0,63	2,35			
metribuzin	1,05	0,018	0,00		0,16	0,04	7,95		0,11	0,44	0,01
metsulfuron-methyl	0,04	0,001	100,00	6,25	0,04	0,00	0,00	0,00	0,02	4,17	2777,78
monocarbamide-diHSO4	190	3,167									
monolinuron	1,5	0,025	0,00				25,00				
n,n- diallyldichlooracetamide	1,23	0,021									
organische vetzuren		0,000									
paclobutrazol	2	0,033									
paraquat-dichloride	5	0,083			0,05	0,01			1,63	5,95	
pendimethalin	2	0,033	0,06	0,01	0,01	0,01	0,61	5,56	2,67	5,95	4,40
profam (IPC)	6	0,100	26,00	0,03			0,00	3,13			
prometryn	1,27	0,021	0,02		0,01	0,00	1,06		1,79	5,29	1,69
propachloor	4,55	0,076	0,02	0,02			3,61	5,06			
propaquizafop	0,75	0,013	2,10	2,10			0,01	0,01			
propyzamide	2,5	0,042	5,50	2,00			0,01	0,02			
prosofocarb	4	0,067	0,11	0,00			0,59	66,67			
pyridaat	1	0,017		48,00					0,00		
quinmerac	0,72	0,012	48,50	20,00			0,00	0,00			
quizalofop-P-ethyl	0,47	0,008	3,20	1,00	0,08	0,08	0,00	0,01	0,09	0,09	38,65
rimsulfuron	0,04	0,001	1,60	0,63	0,01	0,00	0,00	0,00	0,06	7,41	137,93
sethoxydim	0,76	0,013									
simazin	1,5	0,025	0,64	0,10	0,14	0,05	0,04	0,25	0,18	0,50	4,57
sulcotrion		0,000									
terbutryn	2	0,033	0,00	0,00			9,80	36,63			
terbutylazin	0,45	0,008	0,02		0,02	0,00	0,39		0,47	3,57	1,19
thiabendazool	3	0,050									
thifensulfuron		0,000									
tri-allaat	1,6	0,027	0,12	0,03	10,00		0,22	0,83	0,00		0,01
triclopyr	0,4	0,007			0,88	0,16			0,01	0,04	
trisulfuron-methyl	0,03	0,001			0,00	0,00			0,18	0,39	
vetzuren methylesters		0,000									
zilverthiosulfaat		0,000									

BIJLAGE 4 Richtlijn voor het uitvoeren van de veldbioassay met kroos

Bijlage 4 Richtlijn voor het uitvoeren van de veldbioassay met kroos

Testsoort

Klein kroos *Lemna minor*. Gebruik de krooslijn van het Interfacultair Reactor Instituut te Delft, thans ook op het CML aanwezig. Kroos is eenvoudig in het lab zelf te kweken (zie bijlage 4.1).

Uitvoering

De bioassay opstelling bestaat uit twee zacht doorzichtig kunststof bakjes zonder bodem (\varnothing 11 cm, één bakje met een hoogte van 15 cm). De twee bakjes worden in elkaar gezet met ertussen kunststof gaas met een maaswijdte van 1 mm. In de bijbehorende deksels wordt een gat gemaakt; ook hieronder wordt gaas geklemd. In een plank watervast multiplex (dikte 9 mm, 35 x 35 cm) worden twee gaten gemaakt (diameter ca. 9,5 cm). De bakjes worden in deze gaten gestopt. In de planken wordt ook een gat geboord, waardoor een stok kan worden gestoken, die in de slootbodem komt en de opstelling op zijn plaats houdt; bij te diepe watergangen kan de opstelling ook via een draad aan de kant worden verankerd.

Per monsterpunt wordt één opstelling met 2 bakjes ingezet. De bakjes worden bij aanvang van de proef gevuld met 20 kroosblaadjes (10 kroosplantjes bestaande uit 2 blaadjes). Dit vullen gebeurt in het laboratorium met een spateltje of een entnaald. Pas op dat de wortels niet beschadigd raken. De bakjes worden vervolgens met deksel in een bak met een laag water gezet en worden zo vervoerd; vermijdt bij het vervoer extreme temperaturen. Bij aanvang wordt het gewicht bepaald door in het lab van 5 x 20 kroosblaadjes het drooggewicht te bepalen op de dag van inzetten. Na 14 dagen worden de bakjes opgehaald en worden op het lab het aantal blaadjes en het drooggewicht bepaald. De opgehaalde bakjes worden in een bak water vervoerd; het is erg belangrijk dat de kroosplantjes vochtig blijven, aangezien ze snel indrogen, wat met name het tellen zeer bemoeilijkt.

Selectie monsterpunten

Als ruimtelijke eenheid wordt een waterhuishoudkundige eenheid gekozen (i.h.a. een polder). Per polder worden 10 monsterpunten in de hoofdwatgangen gekozen (inclusief het inlaatpunt en het uitlaatpunt). Daarnaast worden 5 monsterpunten in de kavelsloten gekozen. Aan de hand van een kaart en de waterbewegingen kan met behulp van bij de waterschappen aanwezige kennis een gradiënt van blootstelling worden verondersteld vanaf het inlaatpunt, via de kavelsloten, naar de hoofdwatgangen en naar het uitlaatpunt. In deze wateren worden de monsterpunten vervolgens gekozen. Verder is er een aantal soms triviale praktische zaken die hier worden opgesomd: de monsterpunten mogen niet beschaduwd zijn; de monsterpunten moeten goed bereikbaar zijn; niet zichtbaar of niet bereikbaar vanaf de openbare weg, en er moet medewerking van de aanliggende bedrijven zijn. Hierdoor neemt de kans op verstoring sterk af.

Als referentiegebied wordt een gebied gekozen wat zoveel mogelijk gelijk is aan het onderzoeksgebied, maar waarin geen bestrijdingsmiddelen worden gebruikt. In dit gebied worden 5 punten gekozen, bij voorkeur ook verdeeld over de bovengenoemde watertypen. Als referentiegebied kan bijv. worden gedacht aan een park, een graslandgebied, watgangen in meer bewoonde gebieden etc. Als het niet mogelijk is om een vergelijkbaar gebied buiten de polder te vinden moeten niet blootgestelde watgangen binnen de polder worden

geselecteerd. Aan de hand van kaarten van de waterstromingen moet dan worden vastgesteld dat geen hydrologische blootstelling met bestrijdingsmiddelen plaatsvindt.

Aanvullende informatie

Voor wat betreft de kavelsloten is het voor de interpretatie achteraf noodzakelijk dat bekend is of en welke bespuitingen hebben plaatsgevonden in of vlak voorafgaand aan de proefperiode.

Verder moeten voor alle monsterpunten de volgende factoren worden gemeten: temperatuur, waterdiepte, slootbreedte, zuurstof, pH, N, P, K, Cl⁻, Geleidbaarheid, Saliniteit, bedekking met drijvende waterplanten, doorzicht en overige opvallende kenmerken van de sloot.

Metingen

Na 2 weken worden de bakjes opgehaald; het aantal blaadjes wordt geteld en het drooggewicht wordt per bakje bepaald na 8 uur drogen bij 80°C.

Bewerking en weergave resultaten

Uit het verschil tussen het eind- en het begingewicht kan vervolgens de groeisnelheid worden bepaald m.b.v. de volgende formule:

$g = \frac{\ln dg_t - \ln dg_0}{t}$ waarbij dg_t het drooggewicht (of het aantal blaadjes) aan het einde van de proef is, en dg_0 die aan het begin. t = de tijd gemeten in aantal dagen en $\ln(g)$ is de groeisnelheid.

Een effect op een belast monsterpunt kan vervolgens worden uitgedrukt als % groeiremming vergeleken met de groei in de onbelaste monsterpunten. Middels de formule:

$$\text{groeiremming (\%)} = 100(g_R - g_B)/g_R$$

Waarin g_R = de gemiddelde groeisnelheid in de referentie
 g_B = de groeisnelheid in de blootgestelde opstelling

Zet de uitkomsten in een tabel.

Verslaglegging

Van de toets wordt een beknopt verslag gemaakt. Hierin worden in ieder geval de monsterpunten weergegeven, tijdstip en duur en de resultaten, ook van de fysisch chemische bepalingen.

Geldigheid

Monsterpunten waar duidelijk verstoring heeft plaatsgevonden worden niet meegenomen. Ook monsterpunten waar fysisch chemische parameters niet binnen de onderstaande grenzen liggen worden niet meegenomen.

In de periode mei-augustus moet de berekende groeisnelheid per dag minimaal 0,1 bedragen. Buiten deze periode moet een correctie voor de temperatuur worden aangebracht:

$$g = 0,10 \times (0,05(t - 25) + 1)$$

waarin g = de groeisnelheid
en t is de temperatuur in °C

Wanneer de groeisnelheid in de referenties groter of gelijk is aan de resulterende waarde is de toets ook in deze periode geldig.

Tabel B4.1 Omstandigheden waaronder de kroostoets wel of niet zinvol kan worden uitgevoerd (bron: STOWA, 1992a, 1997b).

factor	Toepasbaarheid kroostoets
temperatuur (periode)	15-30°C (juni-september)
waterdiepte	> 20 cm
pH	4-10
N	1,1-430 mg/l
Fosfaat	0,1-360 mg/l
K	20-400 mg/l
Cl ⁻	<2 g/l
Geleidbaarheid	<1700 µS/mm
sloottype	zandsloten veensloten kleislotten licht-brakke sloten zure sloten (pH>4) brakke sloten (Cl<2 g/l)

Kosten

Kosten bij eenmalige uitvoering:

Materiaal:

Kweek: f 500,-

Bioassays: f 1000,-

Totaal materiaal: f 1.500,-

Tijdsbesteding:

Selecteren monsterpunten: 5 dagen

Kweek: 1 dag

Uitvoeren bioassays: 5 dagen

Uitwerken en verslaglegging: 2 dagen +

Tijdsbesteding totaal: 13 dagen

Salariskosten (f 1000,-/dag) f 13.000,- +

Kosten bij eenmalige uitvoering totaal: f 14.500,-

Kosten voor herhaalde experimenten

Tijdsbesteding:		
Kweek:	1 dag	
Uitvoeren bioassays:	<u>5 dagen</u> +	
Tijdsbesteding totaal	6 dagen	
Salariskosten (f 1000,-/dag)		f <u>6.000,-</u> +
Kosten herhaalde experimenten totaal:		f 6.000,-

Kosten voor metingen: p.m. afhankelijk van het meetprogramma.

Bijlage 4.1 Kweekmethode klein kroos *Lemna minor*

De kweek vindt plaats in glazen bakken van 50x15x20 cm (lxbxh) en worden gevuld met 5 liter leidingwater. Om het risico te spreiden worden drie bakken ingezet. Als groeimedium wordt gebruik gemaakt van een commercieel verkrijgbare voeding (Blusana voeding voor hydrocultuur, verkrijgbaar in tuincentra), in de vorm van korrels. De dosering hiervan bedraagt 0,5 g/l. De kweekbakken worden doorlucht.

Bij de kweek wordt gebruik gemaakt van verlichting d.m.v. twee tl-buizen van 35 watt elk op 70 cm boven de bakken, met een licht-donker regime van 16 uur licht en 8 uur donker. De temperatuur van de kweekruimte is ca. 22 °C.

De kweekbakken worden elke drie weken schoongemaakt en het medium ververs.

BIJLAGE 5 Veldexperimenten

Bijlage 5 Veldexperimenten

In deze bijlage worden de werkwijze en de resultaten van twee veldexperimenten besproken. Deze experimenten zijn uitgevoerd in het kader van een VROM-project over de toepassing van bioassays bij het waterkwaliteitsbeheer. Van deze studie wordt uitgebreid verslag gedaan in de Jong *et al.* (2000). Het doel van de experimenten was vooral het toetsen van de praktische toepasbaarheid van de kroostoets en de watervlooiendoets. Voor dit rapport worden de gegevens voor de kroostoets weergegeven.

B5.1 Werkwijze

Algemeen

Mede ingegeven door praktische overwegingen zijn twee locaties in de omgeving van Leiden, binnen het gebied van het Hoogheemraadschap van Rijnland gekozen, waar naar verwachting veel bestrijdingsmiddelen worden gebruikt. De gebieden verschillen aanzienlijk wat betreft grondsoort en gewassen, en daarmee ook in bestrijdingsmiddelengebruik.

Gebiedsbeschrijving

Bollenteelt

Het eerste experiment vond plaats in de Hoogeveense polder, nabij Lisse (zie voor kaartje en beschrijving monsterpunten bijlage 5.1.A), van 24 augustus 1999 tot 7 september. Als referentie werd de Lageveense polder gekozen, deze ligt aan de overzijde van de Haarlemmertrekvaart; in deze polder vindt veeteelt plaats, en de polder is gedeeltelijk in handen van het Zuid-Hollands Landschap. Hierdoor zijn er een aantal extensief beheerde graslanden, en zijn er veel percelen met bossen.

In de Hoogeveense polder worden voornamelijk bloembollen geteeld (zie tabel B5.1), waarbij het roulatie-schema zich concentreert rond de tulp. Het gebied is relatief complex vanwege de vele kleinere velden met tal van kleinere teelten. Op het moment van uitvoering van het experiment lagen veel velden braak of was er een groenbemester ingezaaid. Op enkele velden vond nog een bespuiting plaats met herbiciden tegen onkruiden. Daarnaast waren er tal van kleinere percelen waar diverse soorten bloemen werden geteeld, die op het moment van het experiment werden geoogst. Op kleine schaal vond ook nog teelt onder glas plaats.

Tabel B5.1 Overzicht van de gewassen die in 1998 in de gemeente Noordwijkerhout zijn geteeld, Bron: CBS, 1998.

Gewas	Areaal (ha)	Areaal (%)
Tulp	374	33
Hyacint	290	25
Narcis	229	20
Overige bloemkwekerijgew.	87	8
Gladiool	64	6
Overige bolgewassen	62	5
Sierteelt o.g.	21	2
Overige snijboemen o.g.	12	1
Totaal	1139	100

Een praktisch voordeel van de vele kleine velden en de grondsoort (zand) was de goede berijdbaar en bereikbaarheid van de diverse watergangen.

In de betreffende periode wordt er in de bollenstreek nog nauwelijks gespoten; in een aantal gevallen wordt opkomend onkruid doodgespoten (met glyfosaat, paraquat dichloride of MCPA/2,4 D).

Akkerbouw

Het tweede experiment vond plaats in de Haarlemmermeerpolder, nabij Nieuw-Vennep, van 14 t/m 28 september 1999 (zie bijlage 5.1.B). De Haarlemmermeerpolder is een relatief eenvormig gebied, met grootschalige percelen waarop met name aardappelen, tarwe, suikerbieten en graszaad in roulatie worden verbouwd (zie tabel B5.2).

Tabel B5.2 Overzicht van de belangrijkste gewassen die in 1998 in de gemeente Haarlemmermeer zijn geteeld, Bron: CBS, 1998.

Gewas	Areaal (ha)	Areaal (%)
Wintertarwe	3212	37
Consumptie aardappelen	2060	24
Suikerbieten	1998	23
Graszaad	602	7
Zomergerst	180	2
Zaaiuien	158	2
Bloekwekerijgewassen	152	2
Snijmais	123	1
Pootaardappelen	121	1
Glas:		
Potplanten	48	
Rozen o.g.	43	}1
Substraat bloemen	38	
Totaal	8735	100

Besputtingen die hier plaatsvinden zijn het doodspuiten van het aardappelloof en eventueel besputtingen tegen luis, als er een warme, droge periode optreedt. Tot de oogst wordt er nog zeer regelmatig gespoten met fungiciden.

Keuze monsterpunten

Uitgangspunten

De opzet was om 5 referentiepunten te kiezen, waarmee dan tevens een beeld verkregen wordt van de spreiding van de effectparameters in een onbelaste situatie. Vervolgens werden in principe 15 punten in het te onderzoeken gebied geplaatst. Deze punten bevatten in ieder geval de uitlaat- en inlaatpunten. Verder wordt een aantal punten gekozen in de hoofdwatgangen en zo mogelijk ook een aantal punten in de kavelsloten naast de meest kritische gewassen.

Praktijk

In het geval van de bollenstreek kon er een belendend referentie gebied worden gevonden. Hier zijn 5 monsterpunten gekozen, bij de inlaat en de uitlaat, in twee hoofdwatgangen en in één kleinere sloot. In het te onderzoeken gebied zijn 14 monsterpunten geplaatst; op de betreffende dag werden parallel watervlooiën ingezet en was dit aantal maximaal haalbaar op

één dag. De monsterpunten werden gekozen van het inlaatpunt tot het uitlaatpunt, en in 2 kavelsloten (zie bijlage 5.1.A).

In de Haarlemmermeerpolder bleek het niet mogelijk om een gebied te vinden, dat enigszins vergelijkbaar was, maar niet blootgesteld aan bestrijdingsmiddelen. Daarom zijn hier drie punten gekozen bij de inlaat van de Haarlemmermeerpolder uit de Kaag, en één punt in een park in Hoofddorp, ten einde toch een indruk te krijgen van de effecten in niet met bestrijdingsmiddelen belaste watergangen. In de polder zelf zijn vervolgens 14 punten uitgezet, één punt bij de uitlaat van de Haarlemmermeerpolder als geheel, en 13 punten in één peilvak tussen Nieuw-Vennep en Aalsmeer, waarbij punten zijn gekozen van de inlaat punten tot de uitlaatgemalen, en ook 3 punten in kavelsloten.

Bioassay methode

Voor de bioassays is gebruik gemaakt van de methode, zoals beschreven in het protocol (zie bijlage 4). Bij de bioassay is er bij het eerste experiment gebruik gemaakt van bakjes, die van boven open waren en waar onderin gaas was geplakt. In de praktijk bleek er hier veel kroos van buiten in de potjes te komen, zowel door het gaas, langs het gaas (de betreffende kunststof was slecht te lijmen) als bovenlangs door wind of grotere dieren (kikkers? vogels?). In het tweede experiment is het protocol aangepast tot die zoals thans in de richtlijn beschreven; door de verbeterde opstelling gebruikt; hierbij was het bovengenoemde probleem veel geringer; alleen *Lemna minuscula* werd nog aangetroffen, waarschijnlijk omdat dit door het 1 mm gaas heen kon. Dit kroos is echter gemakkelijk te onderscheiden van klein kroos, zodat dit bij het terugtellen van het kroos apart kan worden gehouden. Een kleinere maaswijdte van het gaas lijkt, in verband met de blootstelling, niet gewenst. Een praktisch probleem van de kroosopstelling was dat in een enkel geval in sloten met veel kroos het kroos uit de sloot op de bakjes terecht kwam, waardoor de lichtval werd beïnvloed. Dit probleem kan worden opgelost door hogere bakjes te kiezen. Ook dit heeft geleid tot een aanpassing van het protocol.

Metingen

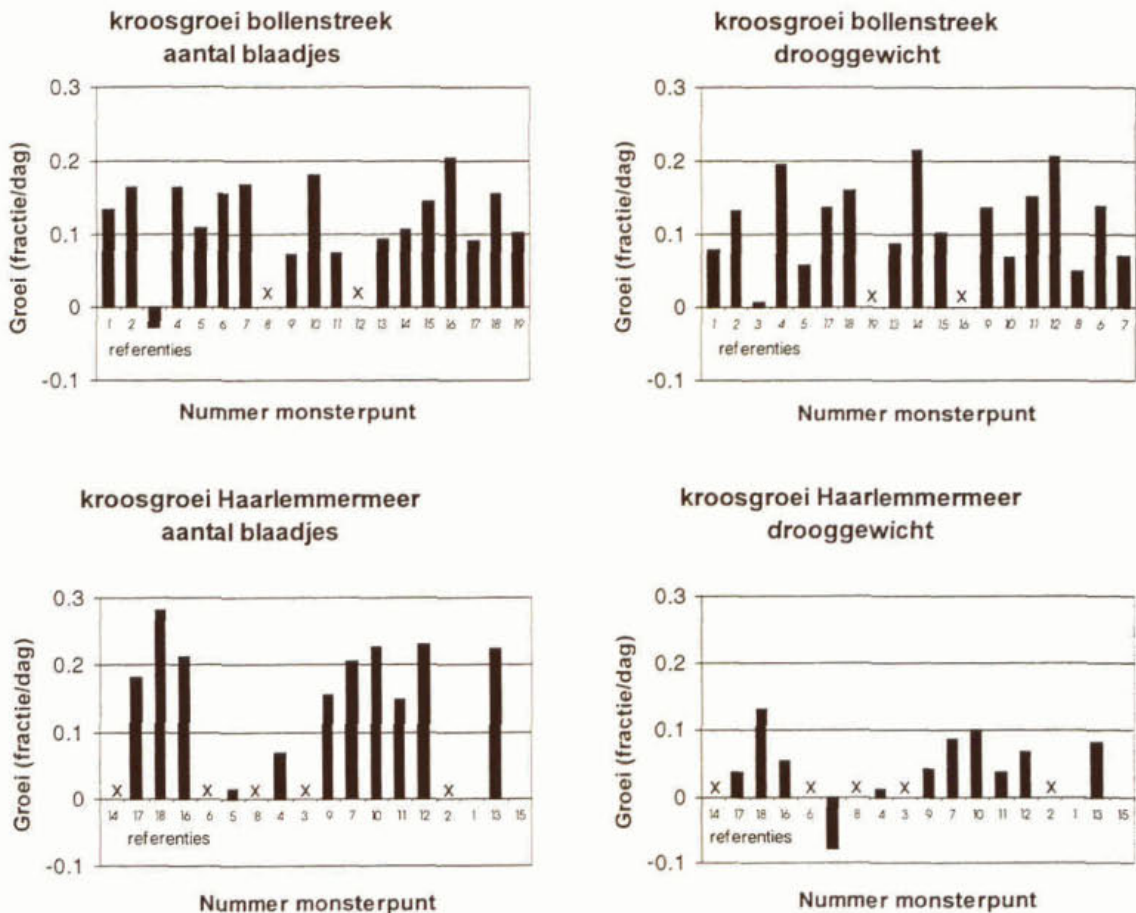
Op alle meetpunten is tegelijkertijd bij het inzetten van de bioassays een watermonster doorgemeten op 60 bestrijdingsmiddelen die met behulp van GC-MS zijn aan te tonen (zie bijlage 5.2). Naast de bovengenoemde zijn ook fysisch-chemische metingen verricht (zie bijlage 5.3).

B5.2 Resultaten

Een belangrijk doel van de experimenten was het toetsen van de praktische uitvoerbaarheid en het traceren van praktische problemen. Enkele aspecten voor wat betreft de bioassay methode zijn hierboven genoemd en verwerkt in de protocollen. Een ander belangrijk aspect is het uitvallen van monsterpunten. Bij het eerste experiment lagen die monsterpunten niet langs de openbare weg. Slechts een enkel monsterpunt was hier door een ingreep van buiten onbruikbaar: het betrof hier vooral de goed zichtbare opstelling van de kroostoets, die in enkele gevallen onder water of op de kant was getrokken. Bij het tweede experiment lagen veel monsterpunten langs de openbare weg. Het gevolg hiervan was dat ook veel opstellingen waren vernield, of zelfs geheel verdwenen. Een bijkomend probleem was hier dat vanwege de kans op slootschonen of verwijderen van kroos de opstellingen opvallend waren geplaatst om de kans op verloren gaan door schonen te verkleinen; dit maakt de opstellingen echter extra

opvallend en daarmee vatbaar voor vandalisme. In bijlage 5.4 staan de resultaten van de metingen weergegeven. In figuur B5.1 zijn de resultaten samengevat.

De monsterpunten zijn in de figuur in volgorde van veronderstelde gradiënt afgebeeld, te beginnen met de onbelaste punten, dan de inlaatpunten etc. Uit de figuur blijkt niet dat er een gradiënt in effect wordt gevonden. Op de y-as staat de groeisnelheid op basis van het aantal blaadjes weergegeven in de linkerfiguren en in de rechterfiguren de groeisnelheid op basis van het drooggewicht.

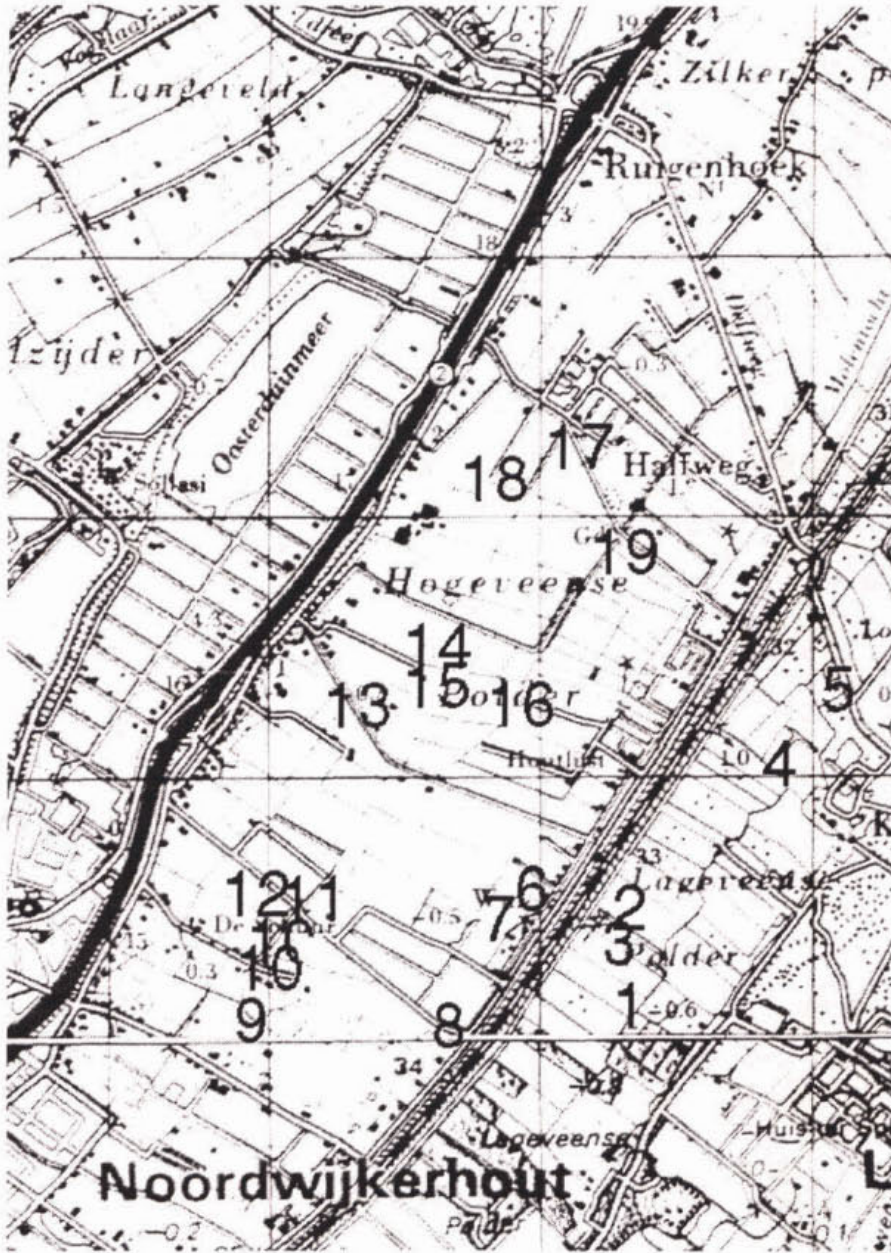


Figuur B5.1 Samengevatte resultaten van de beide veldexperimenten

Uit figuur B5.1 valt op dat er een grote spreiding in de groei van kroos optreedt in de onbelaste situaties. Dit maakt het vergelijken van de referentie met de blootgestelde situatie weinig zinvol; wanneer er verschillen worden getoetst dan blijken deze (zoals verwacht) niet significant.

In het eerste experiment in de bollenstreek werd gebruik gemaakt van nog in ontwikkeling zijnde opstellingen. Hierdoor kon er teveel kroos van buiten de bakjes in de bioassays terecht komen en zijn de resultaten niet te interpreteren. Bij het tweede experiment was dit probleem verholpen. Hier worden verschillen aangetroffen tussen de punten. Een relatie met de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen ligt, mede gezien de lage concentraties, niet voor de hand. Het vergelijken van de kroosgroei met de referentie is weinig zinvol, gezien de spreiding in de referentie.

Bijlage 5.1A Monsterpunten bollengebied.



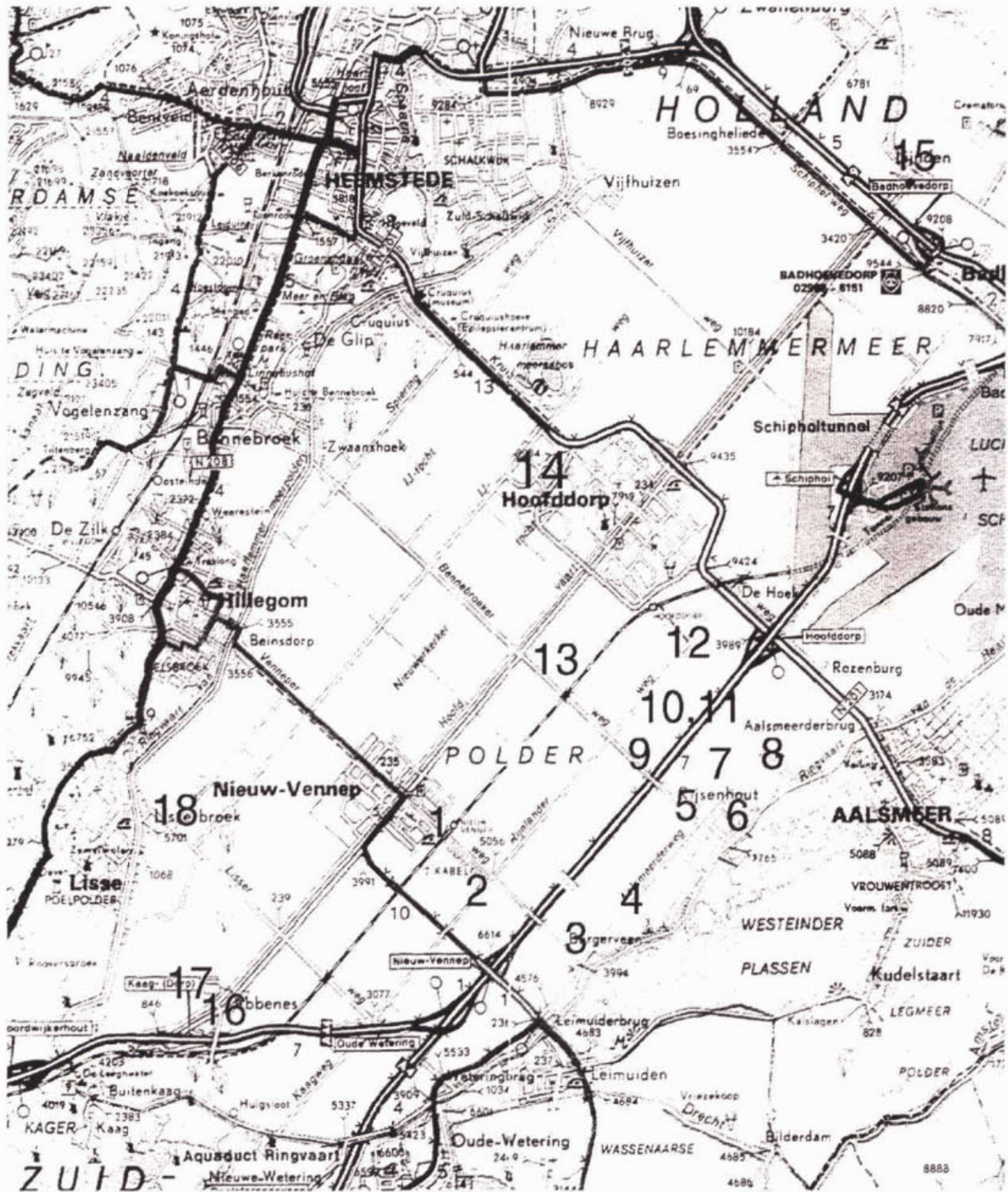
Beschrijving monsterpunten bollengebied.

De diepte geldt steeds op de plaats waar de bioassays werden ingezet.

1 t/m 5: Lageveense Polder. Ondergrond veen op zand. Afwisselend reservaat, weilanden en bossen.

- 1: Bij inlaat van polder; sloot ca. 4 m breed, 30 cm diep. Tussen weilanden.
- 2: Punt bij oude Molen, niet meer in gebruik als uitlaatpunt. Breedte: ca. 4 m. Diepte ca. 250 cm. Tussen schraal grasland.
- 3: Geïsoleerde, zeer voedsel arme watergang, met natuurlijk zomer/winterpeil. ca. 2 m breed, 25 cm diep. Zeer helder. Tussen schraal grasland
- 4: Hoofdwatgang: breedte 5 m. 30 cm diep. Zeer veel kroos. tussen weilanden.
- 5: Bij (automatisch) gemaal: breedte: 5 m. Diepte 40 cm. In bossage.
- 6 t/m 19: Hogeveense polder. Ondergrond zand. Bollenpolder.
- 6: Bij Molen. Brede molensloot (7 m), diepte ca. 50 cm. via dit punt watert de helft van de polder af; molen wordt met de hand aan en uitgezet.
- 7: Bij Molen. Zie bij 6; via dit punt watert de andere helft van de polder af.
- 8: Hoofdwatgang naar de molen. 7 m breed. > 50 cm diep. Onder boom.
- 9: Afvoerende watergang, tussen braakliggende bollenpercelen. 6 m breed, 25 cm diep, veel kroos.
- 10: Hoofdwatgang; 7 m breed; 50 cm diep.
- 11: Hoofdwatgang. 5 m breed. < 20 cm diep.
- 12: Perceelsloot. 4 m, 20 cm diep. sloot vol kroos.
- 13: Hoofdwatgang, 5 m breed, 30 cm diep. Veel watergentiaan; "olie" laagje op water.
- 14: Hoofdwatgang, 4 m breed, 20 cm diep. Veel kroos.
- 15: Kavelsloot. 2 m breed, 20 cm diep.
- 16: Hoofdwatgang, 6 m breed, 30 cm diep. veel watergentiaan.
- 17: Inlaatpunt. 6 m breed. 25 cm diep. Veel kroos.
- 18: Kavelsloot. Net geschoond. troebel. 2 m breed. 20 cm diep.
- 19: Hoofdwatgang. 6 m breed. 40 cm diep.

Bijlage 5.1.B Monsterpunten Haarlemmermeerpolder.



Beschrijving monsterpunten Haarlemmermeerpolder.

Alle monsterpunten liggen binnen de Haarlemmermeerpolder. De ondergrond is hier zeeklei.
Punt 1 t/m 13 liggen allemaal binnen één peilvak.

- 1: Bij gemaal van peilvak. 8 m breed. 50 cm diep. Veel kroos.
- 2: In hoofdwatgang naar gemaal. 8 m breed. 60 cm diep. Veel kroos.
- 3: Hoofdwatgang. 3 m breed. 30 cm diep. veel kroos.
- 4: Hoofdwatgang. Bij kas. 6 m breed. 40 cm diep.
- 5: Hoofdwatgang. 4 m breed. 30 cm diep, veel kroos. Langs bossage.
- 6: Bij inlaat tussen bebouwing. 6 m breed. 40 cm diep. Stroming.
- 7: Perceelsloot tussen aardappelen en tarwe. 1 m breed, 15 cm diep.
- 8: Hoofdwatgang van inlaat. 5 m breed. 40 cm diep. Veel kroos.
- 9: Hoofdwatgang. Naast snelweg. 6 m breed. 50 cm diep.
- 10: Perceelsloot, tussen Aardappelen en bieten. 1,5 m breed. 20 cm diep.
- 11: Perceelsloot, naast bieten. 2 m breed. 20 cm diep. Veel kroos.
- 12: Hoofdwatgang. 8 m breed. > 50 cm diep.
- 13: Hoofdwatgang, bij gemaal. 6 m breed., 50 cm diep; rietbegroeiing.
- 14: Brede watgang in park in hoofddorp. 6 m breed, 50 cm diep.
- 15: Bij gemaal Lijnden: uitlaatgemaal voor gehele Haarlemmermeerpolder. Hoofdvaart, 9 m breed, 60 cm diep.
- 16: Bij gemaal Leeghwater. Inlaatpunt Haarlemmermeerpolder uit Kaag; reserve uitlaat gemaal. Niet in functie tijdens experiment. Hoofdvaart 9 m breed, 60 cm diep.
- 17: Aanvoersloot, kaagwater. 1 m breed, 15 cm diep. Veel gras.
- 19: Aanvoersloot in Lisserbroek; punt in inlaatconstructie.

Bijlage 5.2 Onderzochte bestrijdingsmiddelen.

atrazin	lindaan
azinfos-methyl	metalaxyl
bitertanol	metamitron
bupirimaat	metazachloor
carbaryl	metolachloor
carbofuran	metribuzin
chloorfenvinfos	mevinfos
chloorprofam	parathion (ethyl)
chloorpyrifos	parathion-methyl
chloridazon	pirimicarb
cyanazin	pirimifos-methyl
desethylatrazin	procymidon
desisopropylatrazin	prometryn
desmedifam	propachloor
desmetryn	propiconazool
diazinon	propoxur
dichlobenil	propyzamide
dichloorvos	prosulfocarb
diethyltoluamide	pyrazofos
dimethoaat	pyrimethanil
dimethomorf	simazin
dodemorf	terbutryn
ethofumesaat	terbutylazin
ethoprofos	THPI
fenpropimorf	tolclofos-methyl
flutolanil	tri-allaat
fosalon	triadimenol
furalaxyl	vinchlozolin
iprodion	
kresoxim-methyl	

Bijlage 5.3 Onderzochte fysisch chemische parameters

De volgende fysisch chemische parameters zijn door het Hoogheemraadschap van Rijnland bepaald.

Zuurtegraad
Stikstof Keldahl
Ammonium-N
Nitraat-N + Nitriet-N
Stikstof totaal
Fosfaat P-Ortho
Fosfaat P-totaal
Chloride
Sulfaat
Geleidingsvermogen
Waterstofcarbonaat
Calcium

Bijlage 5.4.A Resultaten veldproef bollenstreek

Monster punt	Kroos 14 dagen		gew mg	gem gewicht
	blaadjes #	Gem 14 dagen		
1	125	130	13,8	16,35
	135		18,9	
2	150	200	24,5	33,75
	250		43	
3	13	13,5	5	5,95
	14		6,9	
4	200	200	85,4	82,65
	200		79,9	
5	175	92	18	12,1
	9		6,2	
6	300	175	64,2	37
	50		9,8	
7	80	82,5	12,9	14,4
	85		15,9	
8	60	72,5	9,2	10,85
	85		12,5	
9	100	75	63,3	36,25
	50		9,2	
10	125	87,5	19,5	13,9
	50		8,3	
11	150	150	42,6	44,35
	150		46,1	
12	500	350	136,4	97,75
	200		59,1	
13	50	55	18,2	18,1
	60		18	
14	300	250	133,9	109,85
	200		85,8	
15	15	57,5	14,8	22,85
	100		30,9	
16 xxx				
xxx				
17	150	175	21,3	35,9
	200		50,5	
18	200	212,5	49,9	49,6
	225		49,3	
19 xxx				
xxx				

Bijlage 5.4.B Resultaten veldproef Haarlemmermeer; xxx = bakjes weg, vernield of anderszins onbruikbaar.

Kroos 14 dagen				
Monster punt	Blaadjes #	Gem Blaadjes	Gewicht mg	Gem gewicht
1	xxx			
	xxx			
2	xxx			
	xxx			
3	xxx			
	xxx			
4	0	7,5	0	1,65
	15		3,3	
5	5	6	1,2	0,95
	2		0,7	
6	xxx			
	xxx			
7	100	50	19	9,5
	0		0	
8	xxx			
	xxx			
9	40	25	6,1	5,2
	10		4,3	
10	75	67,5	14	11,5
	60		9,1	
11	30	22,5	7,1	4,8
	15		2,6	
12	20	72,5	3,2	7,4
	125		11,6	
13	30	65	5,7	8,9
	100		12,2	
14	xxx			
	xxx			
15	xxx			
	xxx			
16	90	55	7,8	5,95
	50		5	
	30		4	
	50		7	
17	20	36,25	4,4	4,875
	120		12,5	
	0		0	
	5		2,6	
18	150	150	18	18
	xxx			

Bijlage 5.6 Gemeten fysisch/chemische parameters

Bollenstreek

pH	N-kjeldahl	ammonium nitraat-N+		fosfaat		Chloride	Sulfaat	geleid- baarheid	waterstof- carbonaat	N-totaal	Calcium	
		-N	nitriet-N	P-ortho	P-totaal							
1	7,95	3,6	2	0,10	3,00	3,2	102	52	0,830	325	3,7	92
2	8,70	2,0	<0,2	0,07	2,80	3,1	118	50	0,760	255	2,1	71
3	7,65	2,8	<0,2	<0,05	0,20	0,4	63	46	0,520	205	2,9	65
4	7,90	3,0	1	0,48	2,60	2,6	87	41	0,690	270	3,5	76
5	7,85	3,0	0,87	0,50	2,40	2,4	86	42	0,680	260	3,5	74
6	8,20	5,1	2,2	0,62	5,60	6,0	76	37	0,910	470	5,7	125
7	8,20	5,6	2,5	0,64	5,00	6,0	76	36	0,920	475	6,2	125
8	8,10	6,0	3,7	0,26	6,10	6,6	82	30	0,920	480	6,3	125
9	9,35	2,2	<0,2	<0,05	0,63	0,9	121	48	0,710	230	2,3	61
10	8,40	5,6	2,6	0,10	4,60	6,0	85	31	0,850	430	5,7	105
11	8,00	5,7	3,8	0,07	6,80	8,0	81	31	0,910	475	5,8	115
12	7,95	5,6	4,4	0,09	6,20	6,6	78	38	0,920	480	5,7	120
13	7,95	2,8	0,86	0,61	4,90	5,3	59	35	0,820	445	3,4	115
14	7,95	4,0	0,9	0,06	7,80	9,7	65	37	0,900	490	4,1	115
15	8,15	4,0	1,3	0,05	7,00	9,0	61	29	0,930	550	4,1	130
16	7,95	6,3	3,7	0,10	7,60	8,7	75	28	1,070	620	6,4	145
17	8,00	2,8	0,99	0,35	3,80	4,2	74	31	0,770	370	3,2	97
18	7,85	11,0	8,7	0,05	6,80	8,4	68	22	1,050	640	11,0	145
19	8,15	7,3	4,9	0,16	6,40	7,6	70	26	0,960	570	7,5	135

Haarlemmermeerpolder

pH	N-kjeldahl	ammonium ammoniak		nitraat-N+		fosfaat		Chloride	Sulfaat	geleid- baarheid	waterstof- carbonaat	N-totaal
		-N	-N (bereken)	nitriet-N	P-ortho	P-totaal						
1	7,95	1,8	0,25	<0,010	0,06	0,96	1,10	290	149	1,550	390	1,9
2	7,70	2,0	0,76	0,020	0,53	0,10	0,16	610	93	2,360	370	2,5
3	7,70	2,8	1,00	0,020	0,17	0,49	1,20	134	92	0,950	310	3,0
4	7,70	4,6	1,90	0,040	0,50	0,31	0,74	133	73	0,980	370	5,1
5	7,55	3,5	1,80	0,030	0,08	0,51	0,70	123	96	0,920	300	3,6
6	8,15	2,4	0,25	0,020	0,08	0,18	0,30	125	120	0,860	230	2,5
7	7,50	6,9	5,70	0,080	<0,05	<0,05	0,36	227	29	1,690	840	7,0
8	7,55	2,3	1,00	0,020	0,43	0,42	0,56	123	112	0,910	270	2,7
9	7,85	1,8	0,44	0,010	0,07	0,98	1,10	190	103	1,130	325	1,9
10	7,40	2,7	0,25	<0,010	<0,05	1,10	1,30	151	114	1,020	315	2,8
11	7,45	1,9	0,21	<0,010	<0,05	1,20	1,30	155	110	1,030	310	2,0
12	7,85	2,0	0,37	0,010	0,77	0,57	0,80	160	108	1,080	345	2,8
13	7,65	2,4	1,10	0,020	0,44	0,13	0,36	670	123	2,560	395	2,8
14	8,20	2,6	0,64	0,040	0,09	1,10	1,70	670	102	2,650	500	2,7
15	7,90	2,4	0,73	0,030	0,88	0,55	0,78	545	114	2,200	365	3,3
16	8,45	3,1	<0,2	0,020	0,08	0,37	0,56	172	91	0,990	280	3,2
17	8,20	2,7	<0,2	0,010	0,39	0,46	0,84	136	90	0,890	265	3,1
18	7,95	1,7	0,23	<0,010	0,27	0,48	0,54	137	91	0,900	260	2,0

