

Van
J.Jol
Datum
16-12-2003
Onderwerp
chronische test slijkgarnalen
Doorkiesnummer
0113-377002

Bijlage 1
Nummer
RIKZ/OS/2003.845X
Project
WK*bioassay*ontwikkeling

De ontwikkeling van een chronische test met slijkgarnalen

1 Inleiding

Om de kwaliteit van zoute baggerspecie te beoordelen wordt tot nu toe onder andere gebruik gemaakt van acute bioassays met slijkgarnalen. Bij deze bioassays (die uitgebreid worden beschreven in de nota RIKZ/99/012 hoofdstuk SPECIE-01) worden slijkgarnalen blootgesteld aan het te testen sediment. Na 10 dagen wordt de test uitgethaald en de sterfte wordt vastgesteld. Het eindpunt van deze test is dus de sterfte. Eventuele effecten op de voortplanting worden met deze test volledig gemist.

Om deze reden worden een aantal parameters aan de huidige bioassay toegevoegd. Waardoor een chronische test ontstaat waarin juveniele slijkgarnalen op testsediment worden ingezet. Dankzij aangepaste testomstandigheden kunnen deze na 7 weken gereproduceerd hebben. Het belangrijkste eindpunt van deze test is dan het aantal nakomelingen per overlevend vrouwtje. Andere eindpunten zijn de groei van de oorspronkelijk ingezette dieren en het aantal overlevenden daarvan.

2 Het testsysteem

Door EPA is in 2001 een chronische 28 daagse test ontwikkeld waarbij *Leptocheirus plumulosus* als testorganisme wordt toegepast. (DeWitt *et al.* 2001) Deze heeft voor een belangrijk deel model gestaan voor de test die thans door ons wordt ontwikkeld. Ook hier worden juveniele dieren in een testsysteem ingezet, en na 28 dagen wordt het aantal overlevenden en de groei daarvan bepaald, alsmede het aantal nakomelingen.

De chronische corophiumtest wordt als volgt uitgevoerd:

2.1 Temperatuur

Om groei en reproductiesnelheid zo optimaal te houden wordt gedurende de kweek en de test de temperatuur op $17 \pm 1^\circ\text{C}$ gehouden. (Kooman 2001)

2.2 Voorbereiding

2.2.1 Testorganismen

Om steeds hetzelfde uitgangsmateriaal te gebruiken is het nodig om altijd testorganismen te gebruiken die ongeveer dezelfde leeftijd hebben. Ook moet de test het hele jaar door kunnen worden uitgevoerd. Slijkgarnalen reproduceren in de natuur eenmaal in het voorjaar en eenmaal in het najaar. Als in die perioden jonge exemplaren uit het veld worden verzameld dan zullen deze nooit alle even oud zijn. Daardoor kunnen verschillen ontstaan in de hoeveelheid nakomelingen. Om dit te ondervangen, en om op elk gewenst tijdstip een test te kunnen uitvoeren, wordt dus een kweek opgezet.

2.2.2 Kweek

In plastic bakken wordt een laag van ± 3 cm schoon $250\ \mu\text{m}$ gezeefd sediment uitgespreid. Daarboven komt een laag van ± 12 cm gefiltreerd zeewater. Het geheel wordt belucht. In de bakken worden (afhankelijk van de afmetingen) enkele honderden volwassen slijkgarnalen ingezet. 3 x per week krijgen de dieren (per 200 st.) een volle theelepel fijngemalen YADY visvoer. Vanaf 1 á 2 weken (in de paaitijd) of 3 á 4 weken (buiten de paaitijd) wordt 1 x per week d.m.v. het zeven van sediment gekeken of er juvenielen in de kweek aanwezig zijn. Zodra dit het geval is wordt al het sediment uitgezeefd door $500\ \mu\text{m}$. Alle uitgezeefde volwassen exemplaren worden nu in een nieuwe kist met $250\ \mu\text{m}$ gezeefd sediment overgezet. Na een week wordt dit sediment opnieuw uitgezeefd door $250\ \mu\text{m}$. De daarin zich bevindende juvenielen hebben alle een leeftijd van 0 tot 7 dagen, deze kunnen voor de test worden gebruikt.

2.3 Chronische test adult → adult

De opzet van een kweek voor juvenielen is tijdrovend en de kweek mislukt soms. Ook zijn juvenielen door hun afmetingen lastig te behandelen en, bij het uithalen van de test, lastig te vinden.

Daarom is een 7 weeks experiment uitgevoerd op $250\ \mu\text{m}$ gezeefd Oesterputs sediment waarbij in plaats van juvenielen adulten werden ingezet.. Het voordeel hiervan is dat volwassen exemplaren gemakkelijker zijn te behandelen en te vinden bij het uithalen. Een belangrijk nadeel is echter het feit dat de reproductieorganen van deze dieren al volgroeid zijn zodat effecten van schadelijke stoffen in het sediment op de ontwikkeling daarvan niet kunnen worden vastgesteld.

De periode dat in het veld juvenielen gevonden worden in het voor- en najaar strekt zich uit over plusminus twee maanden. Het zou in deze test dus mogelijk zijn dat een aantal vrouwtjes al gejongd heeft en andere nog niet, ook kunnen verschillen optreden in de afmetingen van de juvenielen.

Om dit probleem te ondervangen werden dieren ingezet die alle ongeveer dezelfde afmetingen hadden. Om te voorkomen dat de 1l bekers glazen overbevolkt zouden raken werden niet 20 exemplaren ingezet zoals bij de test van juveniel → juveniel, maar slechts 10.

Voor het overige werd deze test uitgevoerd op dezelfde wijze als waarop dat gebeurt bij een test met juvenielen. Voor deze test werden 6 bekers glazen ingezet.

Bij het uithalen van de test werden in alle bekers glazen een aantal adulte exemplaren gevonden dat varieerde tussen de 25 en 40, er werden echter ook juveniele exemplaren aangetroffen. Dit waren hoogstwaarschijnlijk jongen van de oorspronkelijk ingezette dieren.

De spreiding van de hoeveelheid en grootte van de dieren waarin deze test resulteerde deed ons besluiten geen verdere experimenten in deze richting uit te voeren.

3 Uitvoering van de test

3.1 Inzet

Bij deze test wordt Oesterputs sediment als referentiesediment gebruikt.

Het te testen sediment en het referentiesediment worden gezeefd door $250\ \mu\text{m}$. Van ieder sediment komt een laag van 200 ml in 5 l bekers glazen. Deze worden afgevuld tot 800 ml met gefiltreerd zeewater. Het geheel wordt belucht d.m.v. glazen pasteurpipetten die op een luchtleiding zijn aangesloten. Nadat het geheel 24 uur heeft gestaan om het sediment te laten bezinken worden per bekers glas 20 juveniele slijkgarnalen ingezet waarmee de eigenlijke

test van start gaat. Ook wordt een aantal juveniele slijkgarnalen met een digitale camera gefotografeerd zodat daarvan met behulp van het programma Image-Pro Plus de lengte kan worden vastgesteld.

3.2 Onderhoud van de test

- De volgende parameters worden gemeten:
 - NH_4^+ (Bij inzet en uithalen van de test)
 - NH_2^- (Bij inzet en uithalen van de test)
 - Temperatuur ($^{\circ}\text{C}$, 1 x per week)
 - Saliniteit (‰, 1 x per week)
 - Zuurstof (% , 1 x per week)
 - pH (1 x per week)
- Dagelijks wordt de beluchting gecontroleerd.
- 2 x per week wordt het bovenstaande water ververs, daarbij wordt 400 ml afgeheveld of gepompt. Daarna worden de glazen weer bijgevuld met gefiltreerd zeewater van 17°C .
- 3 x per week (op maandag, woensdag en vrijdag) wordt per bekeerglas 30 mg fijn gemalen YADY visvoer per bekeerglas gevoerd. Hiervoor wordt per bekeerglas 30 mg voer gesuspendeerd in 3 ml leidingwater. Van deze suspensie wordt in elk bekeerglas 3 ml gepipetteerd.
- Ondanks het feit dat op $250\text{ }\mu\text{m}$ wordt gezeefd worden toch andere organismen in het sediment aangetroffen die het leefmilieu van de slijkgarnalen nadelig beïnvloeden. Daarvan zijn *Capitella capitata* en harpacticoïden de meest storende. Daarom worden de slijkgarnalen na 3 weken uitgezeefd over $250\text{ }\mu\text{m}$ en overgezet in van vers sediment en gefiltreerd zeewater voorziene 1l bekeerglazen.

3.3 Uithalen van de test

- Na 7 weken wordt de test uitgethaald. Daaraan voorafgaand worden, behalve de temperatuur saliniteit zuurstof pH NH_4^+ en NH_2^- gemeten
- De inhoud van alle testbekers wordt gezeefd over $250\text{ }\mu\text{m}$. In een normaal verlopen test zullen nu twee generaties slijkgarnalen kunnen worden aangetroffen:
 - **Volwassenen: de oorspronkelijk ingezette dieren**
Van de op de zeef zich bevindende volwassen exemplaren wordt het geslacht bepaald. Daarna worden alle volwassen exemplaren enkele minuten opgeslagen in 4% gebufferde formaline. Vervolgens worden ze op een tissue gedroogd, op een vel wit papier uitgespreid en met een digitale camera gefotografeerd. Met behulp van het programma "Image-Pro Plus" wordt aan de hand van deze foto de lengte van de dieren vastgesteld.
 - **Juvenielen: de nakomelingen**
Een klein gedeelte van het sediment blijft op de zeef liggen ondanks grondig zeven. In dit sediment zullen zich de nakomelingen van de oorspronkelijk ingezette dieren bevinden. Dit

wordt in zijn geheel in een petri-schaaltje gespoeld en vervolgens worden daar onder het binoculair alle juvenielen uitgehaald en geteld.

4 Testresultaat

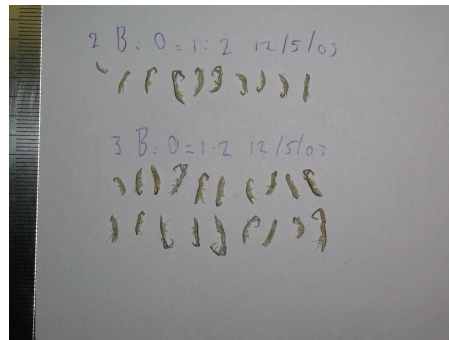
Bij deze test worden de volgende parameters als testresultaat gebruikt:

4.1 Het aantal overlevende exemplaren van de oorspronkelijk ingezette dieren

Hiervoor wordt het aantal uitgezeefde volwassen exemplaren geteld

4.2 De groei van deze dieren

De volwassen uitgezeefde exemplaren worden gedood in 4% gebufferde formaline, vervolgens op een tissue gedroogd en daarna op een wit vel papier gelegd. Op dit vel komt ook een liniaal of iets dergelijks waarop een cm. verdeling te zien is (figuur 1). Deze foto wordt ingelezen in de computer en met behulp van het programma "Image-Pro Plus" wordt hiermee de grootte van de dieren vastgesteld.



Figuur 1, foto volwassen slijkgarnalen

4.3 Het aantal door deze dieren geproduceerde nakomelingen, gedeeld door het aantal vrouwtjes dat nog leeft van het de oorspronkelijk ingezette dieren.

Alles wat na zeven op 250µm nog op de zeef ligt wordt met gefiltreerd zeewater in een petriscaaltje gespoeld. De juveniele slijkgarnalen die hierin zitten worden geteld.

4.4 Samenvatting van de eindpunten

4.4.1 Eindpunten die tot nu toe gehanteerd worden:

- Mortaliteit volwassenen (4.1)
- Lengte c.q. groei adulten (4.2)
- Aantal juvenielen/aantal vrouwtjes (4.3)

4.4.2 Overige mogelijk toe te passen eindpunten:

- Aantal juvenielen
- Sexratio van de overlevende ingezette dieren
- Aantal juvenielen/aantal adulten
- Eventueel biomassa juvenielen
- Eventueel biomassa volwassenen
- Aantal vrouwtjes zonder eitjes/aantal vrouwtjes met eitjes

5 Respons op een veldgradiënt

Om vast te stellen wat bij een chronische test de effecten zijn van vervuild sediment is een chronische test uitgevoerd waarbij juveniele slijkgarnalen werden blootgesteld aan havenslib, een mengsel van relatief schoon sediment en havenslib en schoon sediment.

Vervuild sediment uit de haven van Burghsluis werd, op basis van droog gewicht gemengd met relatief schoon sediment uit de Oesterput in de verhoudingen 0:2, 1:1, en 2:0. Van iedere concentratie werden 9 bekersglazen ingezet, waarvan 3 stuks t.b.v. een acute test met volwassen dieren en 6 stuks voor de chronische test. Dit experiment gaf de volgende resultaten te zien:

5.1 Resultaten

- Acute (10 daagse) test**

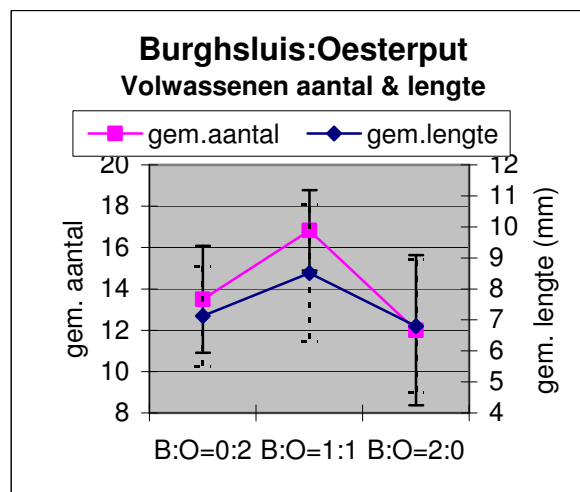
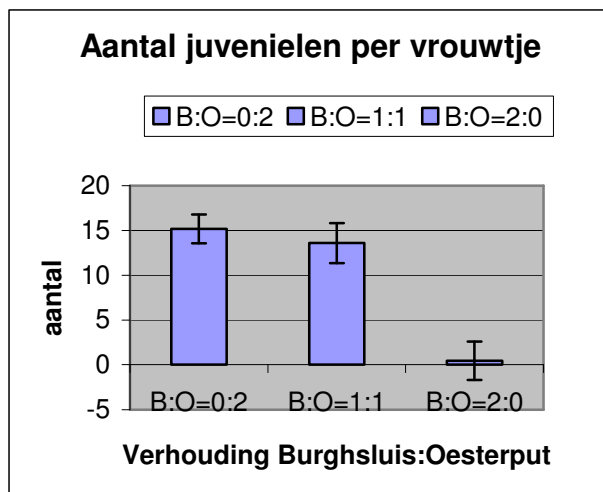
Het aantal overlevende dieren na de 10 daagse test:

Mengverhouding	Testbeker 1	Testbeker 2	Testbeker 3
B:O=0:2	21	22	20
B:O=1:1	22	19	20
B:O=2:0	19	20	18

- Chronische (7 weekse) test:**

Mengverhouding	Aantal Juvenielen per vrouwtje (gemiddeld per testbeker)	std
B:O=0:2	15,15324	5,322403
B:O=1:1	13,58796	5,079135
B:O=2:0	0,45	1,007472

In een diagram uitgezet::



5.2 Conclusie

Bij de acute test wordt geen respons waargenomen, terwijl ook bij de chronische test het aantal overlevenden van de oorspronkelijk ingezette dieren en de groei daarvan in de verschillende sedimenttypen geen opzienbarende verschillen geeft.

Het aantal juvenielen per vrouwtje laat echter grote verschillen zien per type sediment.

Er kan dus worden gesteld dat deze test t.o.v. de acute test gevoeliger is.

6 Gevoeligheid voor toxische stoffen

Om vast te stellen wat bij een chronische test de effecten zijn van met een toxicant gespiked sediment is een chronische test uitgevoerd waarbij juveniele slijkgarnalen werden blootgesteld aan sediment dat werd gespiked met verschillende concentraties van een toxicant.

Hieronder zijn de resultaten te zien van een test waarbij slijkgarnalen zijn blootgesteld aan met cadmium.gespiked 250µm gezeefd Oesterputsediment

De volgende concentraties werden toegepast: 0, 20, 40, 75 en 150 mg/kg droge stof. Behalve een chronische test is ook een acute test uitgevoerd waarbij zowel volwassen als juveniele exemplaren zijn ingezet. Dit leverde de volgende resultaten op:

- Acute (10 daagse) test:**

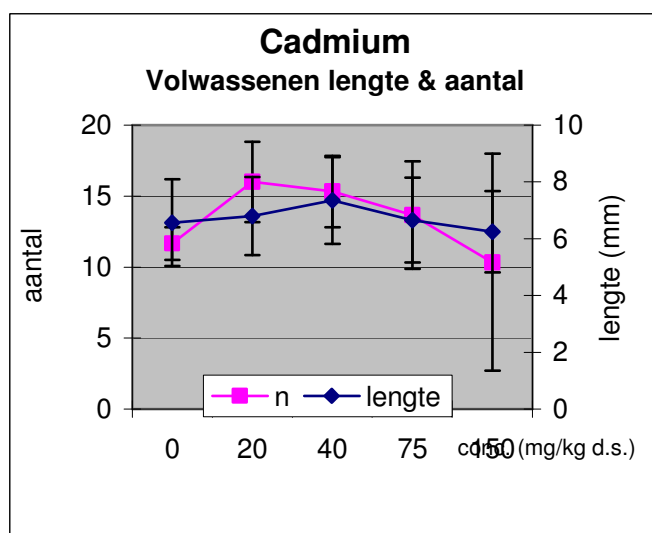
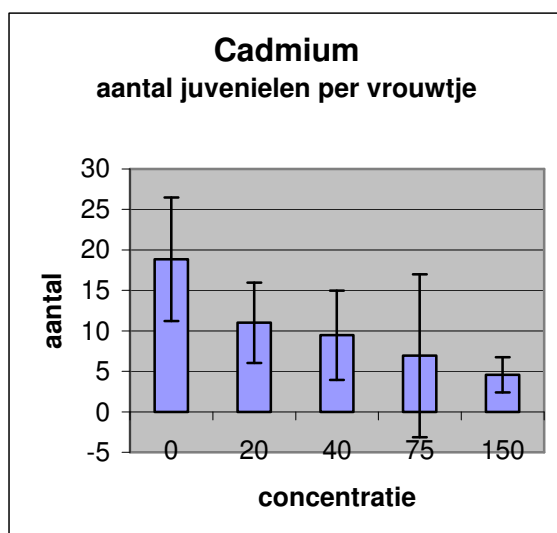
Van iedere concentratie zijn 3 bekerglazen ingezet, met in iedere testbeker 20 dieren. Bij uithalen werden de volgende hoeveelheden levende exemplaren aangetroffen:

Concentratie (mg/kg d.s.)	Aantal overlevende juvenielen			Aantal overlevende volwassenen		
0	18	19	18	20	20	18
20	20	17	20	20	20	20
40	18	18	20	20	19	18
75	21	20	20	20	20	20
150	20	20	20	21	20	19

- Chronische (7 weekse) test:**

Ook hier werden per concentratie 3 bekerglazen ingezet, in iedere testbeker 20 juvenielen. Dit leverde na 7 weken de volgende resultaten op:

Concentratie (mg/kg d.s.)	Aantal juvenielen per vrouwtje (gemiddeld per testbeker)	Std.
0	18,85	7,638226
20	11,00	4,949747
40	9,458333	5,525666
75	6,9375	10,06256
150	4,566667	2,182506



6.1 Conclusie

Bij de acute test wordt geen respons waargenomen, terwijl ook bij de chronische test het aantal overlevenden van de oorspronkelijk ingezette dieren en de groei daarvan in de verschillende sedimenttypen geen opzienbarende verschillen geeft. Het aantal juvenielen per vrouwtje laat echter grote verschillen zien per type sediment. Zij het ook dat de resultaten een vrij grote spreiding te zien geven. Toch kan worden gesteld dat deze test t.o.v. de acute test gevoeliger is.

7 Nog nader te bepalen voorwaarden zijn:

- Bij welke saliniteit vindt blootstelling plaats?
- Hoe aan te passen aan saliniteit te beoordelen sediment in het veld?
- Is er een effect van het organisch stofgehalte in het sediment op de respons? Moet organisch stof als randvoorwaarde of testbeperking worden meegenomen?
- Is er een effect van korrelgrootte op de respons? Moet korrelgrootte als randvoorwaarde of testbeperking worden meegenomen?
- Ook dienen van de volgende parameters de begrenzingen nog te worden vastgesteld:
 - NH_4^+
 - NH_2^-
 - Saliniteit
 - Zuurstof
 - pH

8 Problemen die we nog tegen het lijf lopen, en eventuele oplossingen daarvan

8.1 Zeven van sediment op 250 μm

Uit vorige testen is gebleken dat de maximum maaswijdte waar juveniele slijkgarnalen door worden tegengehouden 250 μm bedraagt. Ook Dewitt *et al.* hanteren deze maaswijdte voor het verzamelen van juveniele *Leptocheirus plumulosus*. Het zeven door deze maaswijdte kan gebeuren door het sediment met een varkensharen borstel door de zeef te wrijven, of door dit in een kist met water (desgewenst gefiltreerd zeewater) te zeven. Bij deze laatste methode is er een kans dat toxicanten uit het sediment verdwijnen. In hoeverre dit het geval is zal nog moeten worden vastgesteld.

8.2 Gebruik van juveniele slijkgarnalen

In deze test worden de slijkgarnalen die nog in de groei zijn blootgesteld aan het te testen sediment. Verwacht wordt dat de ontwikkeling van de reproductieorganen door de zich in het sediment bevindende toxicanten nadelig beïnvloed zou kunnen worden wat zijn weerslag zou vinden in de hoeveelheid nakomelingen.

Het inzetten van juveniele slijkgarnalen en het vinden van juvenielen in sediment is lastig en tijdrovend, daarom is ook een test uitgevoerd waarbij volwassen exemplaren (waarbij de $\square\square$ geen eitjes hadden) werden ingezet. Deze test duurde zeven weken. Bij uithalen bleken de ingezette dieren gejongd te hebben. De nakomelingen waren niet meer te onderscheiden van de oorspronkelijk ingezette exemplaren, ook bleek dat of enkele nakomelingen gejongd hadden of dat de oorspronkelijk ingezette exemplaren voor de tweede maal gejongd hadden. Deze manier van testen bleek dus onbruikbaar.

Bovendien zijn van volwassen exemplaren de reproductieorganen al ontwikkeld waardoor effecten op de groei daarvan wordt gemist.

8.3 Sterfte van juveniele slijkgarnalen

Zoals hierboven wordt beschreven wordt na 3 weken het sediment ververst om te voorkomen dat daarin veel andere hinderlijke organismen komen. In alle gevallen waarin dat plaatsvond werden per beekerglas door sterfte minder juveniele slijkgarnalen terug gevonden als de oorspronkelijk ingezette 20 exemplaren. Een enkele maal werden slechts 6 slijkgarnalen teruggevonden. Hiermee zou dan het vervolg van de test (nog 4 weken) moeten worden uitgevoerd. Het zou dus beter zijn om in de toekomst de test niet te starten met een aantal beker glazen met daarin het te testen sediment waarin 20 juveniele exemplaren zijn uitgezet. In plaats daarvan kan beter een kist, een accubak of iets dergelijks worden voorzien van een laag te testen sediment dan wel referentiesediment waarin > 100 juveniele slijkgarnalen worden uitgezet. Na 3 weken kunnen hieruit 5 beker glazen met het te testen of het referentiesediment worden voorzien van elk 20 exemplaren.

8.4 Beggiatoa

Vaak komt het voor dat in de kweek die is opgezet om juveniele slijkgarnalen te verkrijgen beggiatoa gaat groeien, wat uiteindelijk kan resulteren in een sterfte van alle leven op- en in de bodem, dus ook van de slijkgarnalen. Deze bacterie groeit in zuurstofarm sediment, en, zoals de laatste ervaringen lijken aan te tonen, neemt de kans op beggiatoa toe bij hogere temperatuur of saliniteit. Hoewel de verhoogde saliniteit ook een gevolg kan zijn van de temperatuur.

Om dit te voorkomen zou mogelijk het water meer over de bodem van het sediment moeten circuleren. Dit is geprobeerd, maar gaf niet het gewenste resultaat. Ook is geprobeerd het sediment te mengen met grof zand teneinde het zuurstof meer in de bodem te laten dringen, ook zonder resultaat.

In het verleden zijn echter een aantal kweken ingezet met *Leptocheirus plumulosus*. Deze kweken werden gehouden bij een temperatuur van 20°C, het water had echter een saliniteit van 20‰. Daarom is thans een aantal kweken opgezet waarbij eveneens water wordt gebruikt met een saliniteit van 20‰. Van dit experiment zijn nog geen gegevens beschikbaar.

8.5 Reproductiesucces

Om het reproductiesucces vast te stellen wordt het aantal gevonde juvenielen gedeeld door het aantal zich in de testbeker bevindende vrouwtjes. De vraag is nu gerezen of het niet mogelijk is dat in een testbeker juvenielen aanwezig zijn waarvan de moeder al gestorven is, zodat de hierboven beschreven breuk gunstiger zou kunnen uitvallen. Daardoor zou een verkeerd beeld worden verkregen.

Om dit testen zijn 10 eidragende vrouwtjes onthoofd en daarna uitgezet in 11 testbekers met 200 ml 250µm gezeefd testsediment waarboven 600 ml gefiltreerd zeewater stond. Het geheel werd verder belucht en gevoerd zoals dat gebruikelijk is bij een chronische test. Na twee weken werd deze test uigehaald. In geen enkele testbeker werden juveniele slijkgarnalen aangetroffen.

Hieruit zou zijn op te maken dat uit eidragende vrouwtjes die dood zijn geen levende jongen kunnen worden verkregen zodat de kans op de fout die hiervoor besproken wordt klein is.

9 Zaken die nog verder ontwikkeld dienen te worden

9.1 Randvoorwaarden en parameters

Voor de volgende parameters dienen nog grenzen te worden bepaald:

- NH_4^+
- NO_2^-
- Saliniteit
- Zuurstof

9.2 Kweek

Het komt nog weleens voor dat de kweek van juvenielen door beggiatoa volledig te gronde gaat. Een afdoende oplossing is hiervoor nog niet gevonden, bij het thans instaaende experiment lijkt het echter dat een aanpassen van de saliniteit (tot 20 promille) en/of het terugbrengen van de hoeveelheid voer positieve resultaten oplevert.

9.3 Tellen van juvenielen

Het tellen van de juveniele exemplaren bij het uithalen is het meest tijdrovende deel van een test. De juvenielen verschuilen zich in iederslukje sediment dat in het petrischaaltje ligt, zelfs in kokertjes die zijn gemaakt door *Capitella capitata*.

Inplaats van tellen is bij een aantal experimenten de hoeveelheid juveniele slijkgarnalen geschat door 3 personen. Dit gaf dermate grote onderlinge verschillen dat deze methode niet meer werd toegepast.

9.4 Zeven van testsediment

Zoals hierboven reeds is opgemerkt is nog niet vastgesteld wat de effecten zijn van zeven (nat of droog) op de toxiciteit van sedimenten. Een nader onderzoek verdient aanbeveling.

9.5 Kwaliteitscontrole

Naar de hoedanigheden van de kwaliteitscontrole is nog geen onderzoek verricht.

10 Literatuur

DeWitt, T.H., T.S. Bridges, D.S. Ireland, L.L. Stahl, M.R. Pinza and L.D. Antrim. 2001. Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-associated Contaminants with the Amphipod *Leptocheirus plumulosus*. EPA 600/R-01/020, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. WED-01-073

Kooman, H. (1) Pilotstudie naar de opzet van een chronische bioassay met de amphipode *Corophium volutator*. Stageverslag 2002

Kooman, H., (2) Ontwikkeling van een Chronische Bioassay met de Amphipode *Corophium volutator*. Afstudeerrapport, m 21 juli 2002

Stronkhorst en Schipper. 1999 RIKZ/99.012 RIKZ handboek Toxiciteitstesten voor zoute baggerspecies.

BIJLAGE !

Burghsluis : Oesterput juvenielen : vrouwtjes

nummer	sedimenttype	aantal juvenielen per bekergla	aantal vrouwtjes	aant.juv./aant. vrouwtjes	gemiddelde	std.
1	B:O=0:2	217	9	24,1	15,15	5,322
2		45	5	9		
3		61	5	12,2		
4		107	6	17,8		
5		123	8	15,4		
6		62	5	12,4		
1	B:O=1:1	117	10	11,7	13,59	5,079
2		112	9	12,4		
3		94	5	18,8		
4		250	12	20,8		
5		63	7	9		
6		70	8	8,75		
1	B:O=2:0	0	3	0	0,45	1,007
2		1	5	0,2		
3		0	6	0		
4		0	3	0		
5		0	3	0		
6		15	6	2,5		

Burghsluis : Oesterput Adulten

beker nr.	B:O=0:2			B:O=1:1			B:O=2:0		
	lengte	std	n	lengte	std	n	lengte	std	n
1	7,670444	1,817448	14	7,292226	1,433119	17	4,659181	0,790265	11
2	7,349507	1,559553	14	8,665756	2,843548	18	8,591095	2,067261	17
3	6,979841	1,672316	15	8,824201	1,71632	17	5,883831	1,509697	12
4	6,837502	1,439086	17	8,728309	1,984137	18	6,530944	1,299224	6
5	6,898633	1,837085	11	8,194966	2,095285	13	5,371229	0,848276	12
6	7,004898	1,514105	10	9,246393	2,564088	18	8,444493	1,457411	14
			som 1-6			som 1-6			som 1-6
gem.tot.	7,123471	1,639932	81	8,491975	2,106083	101	6,580129	1,328689	72
std.tot.	0,321649			0,677227			1,622256		

Burghsluis : Oesterput fysisch-chemische parameters

	verh.	temp.	saliniteit	zuurstof	pH
03-06-03	B:O=0:2	18,3	32,2	92	8,19
inzet	B:O=1:1	18,3	31,9	91	8,22
	B:O=2:0	18,5	32,3	90	8,2
06-06-03	B:O=0:2	17,9	32,8	94	8,29
	B:O=1:1	17,1	34	88	8,13
	B:O=2:0	17,9	33,8	92	8,26
16-06-03	B:O=0:2	16,8	33,3	98	8,26
	B:O=1:1	16,7	33,9	95	8,47
	B:O=2:0	16,8	34	97	8,53
18-06-03	B:O=0:2	16,4	33	95	8,09
	B:O=1:1	16,5	33	93	8,32
	B:O=2:0	16,6	33,4	93	8,36
20-06-03	B:O=0:2	16,7	33,2	94	8,26
	B:O=1:1	16,7	33,4	91	8,36
	B:O=2:0	16,7	34	93	8,47
23-06-03	B:O=0:2	16,8	34,2	82	7,97
	B:O=1:1	16,9	33,7	81	8,33
	B:O=2:0	16,9	34,2	93	8,41
25-06-03	B:O=0:2	16,4	32,6	90	8,2
	B:O=1:1	16,6	32,4	89	8,29
	B:O=2:0	16,6	32,7	89	8,28
27-06-03	B:O=0:2	16,7	33,2	94	8,29
	B:O=1:1	16,7	32,7	93	8,37
	B:O=2:0	16,8	33,2	91	8,34
30-06-03	B:O=0:2	18,8	34,1	80	7,94
	B:O=1:1	18,8	33,3	84	8,32
	B:O=2:0	18,9	33,7	88	8,36
04-07-03	B:O=0:2	18,1	34,4	88	8,23
	B:O=1:1	18,2	33,3	88	8,4
	B:O=2:0	18,3	33,9	89	8,59
07-07-03	B:O=0:2	16,5	34	84	8,06
	B:O=1:1	16,5	33,5	86	8,32
	B:O=2:0	16,4	33,5	87	8,51
14-07-03	B:O=0:2	16,6	33,3		
	B:O=1:1	16,7	33,2		
	B:O=2:0	16,8	33,6		
21-07-03	B:O=0:2	16,6	33,4	89	8,09
	B:O=1:1	16,8	33	90	8,2
	B:O=2:0	16,9	33,2	90	8,34

Cadmiumtest juvenielen : vrouwtjes

concentratie	aant. juv. per bekerglas	aantal vrouwtjes	aant. juv/aant. vrouwtjes	gemiddeld	std.
0	103	10	10,3	18,9	7,6382
	125	5	25		
	170	8	21,3		
20	45	6	7,5	11	4,9497
	87	6	14,5		
40	27	8	3,38	9,46	5,5257
	65	6	10,8		
	170	12	14,2		
75	60	5	12	12	10,063
	15	8	1,88		
	110	5	22		
150	11	5	2,2	4,57	2,1825
	5	1	5		
	52	8	6,5		

Cadmiumtest adulten

conc.	n (3 bekera)	lengte	std.
0	35	6,565435	1,534834
20	32	6,79188	1,375095
40	46	7,348312	1,526258
75	41	6,652809	1,489372
150	31	6,244088	1,426328