Visdieven in gevaar

Een pilot-studie naar oorzaken van verminderd broedsucces van Visdieven *(Sterna hirundo)* broedend op het sluiscomplex bij Terneuzen.

A.T.C. Bosveld[1], G.M. Dorrestein[2], P.L. Meininger[3]

Rijkswaterstaat
Rijksinstituut voor
Kust en Zee/*RIKZ*
bibliotheek

ibn-dlo

Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek[1]

Universiteit Utrecht, fac Diergeneeskunde[2]
Rijksinstituut voor Kust en Zee, RIKZ[3]

Wageningen 1998

IBN-RAPPORT 361, ISSN: 0928-6888

INHOUD

Voorwoord 5

Inleiding 7
- Intermezzo: overzicht van waarnemingen 8
- Intermezzo: drie mogelijke oorzaken van slecht broedsucces 9

Materiaal en methoden 10
- beschrijving van de kolonies 10
- broedbiologie 11
- bloedafname bij adulten 11
- parasitologisch/pathologisch onderzoek 12
- kunstmatige bebroeding van de eieren 12
- biometrie van de eieren 12
- calciumgehalte van de eischalen 13
- sectie en biometrie van de kuikens 13
- morfometrie van de hersenen 13
- EROD activiteit 14
- histopathologie 14

Resultaten 17
- broedbiologie (veldobservaties) 17
- de eieren 18
- broedsucces 18
- biometrie van kunstmatig bebroede kuikens 19
- *hersendimorfie* 20
- parasitaire infecties 21
- (histo)pathologie 21
- EROD activiteit 24

Discussie 25

Conclusie 27

Aanbevelingen voor verder onderzoek 28

Literatuur 29

Bijlagen 31
- chronologisch overzicht van de veldactiviteiten en waarnemingen 31
- *Lijst van figuren entabellen* 34

Voorwoord

Sinds vele jaren wordt door het Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ) onderzoek verricht in de visdiefkolonie (*Sterna hirundo*) op het sluiscomplex van Terneuzen (Westerschelde). Dit in het kader van het biologisch monitoringprogramma en diverse broedbiologische en ecotoxicologische onderzoeken. De aanvankelijke toename van aantallen broedparen in deze kolonie stagneerde in 1994. Hierna werd een aantal zorgwekkende ziekteverschijnselen geconstateerd en was het broedsucces herhaaldelijk nihil. Deze verschijnselen werden niet waargenomen in de overige kolonies in het Westerschelde gebied. Om de oorzaken hiervan te achterhalen is reeds een aantal acties ondernomen die echter nog steeds geen duidelijk beeld opgeleverd hebben. Verondersteld werd dat waterverontreiniging een belangrijke rol speelt. Om dit te onderzoeken is het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN-DLO) in opdracht van het RIKZ in het kader van het RIKZ project SAP/SCHOON in het broedseizoen van 1997 aangevangen met een studie. Hierin moet een combinatie van broedbiologisch veldonderzoek en toxicologisch biomarkeronderzoek aan kunstmatig uitgebroede eieren meer helderheid verschaffen omtrent de mogelijke oorzaken van de slechte toestand waarin deze kolonie verkeert. Dit rapport geeft de resultaten weer van een pilot-studie naar het broedsucces en toxicologische effecten bij visdieven bij Terneuzen in vergelijking tot een referentiekolonie in een schoon foerageergebied. Aan de hand van deze resultaten wordt een eerste duiding gegeven van de verantwoordelijke groep(en) van verbindingen. Een vervolgonderzoek zal gericht worden op het chemisch nader identificeren van verbindingen die mogelijk (mede)veroorzaker zijn van de waargenomen effecten.

Het voor u liggende rapport is het resultaat van een onderzoek waarbij het IBN-DLO nauw samengewerkt heeft met het RIKZ te Middelburg en de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht (Vakgroep pathologie, laboratorium Bijzondere diersoorten). De mensen die belangrijke bijdragen geleverd hebben bij het ontwerp van het onderzoek, het werk in het veld en het laboratorium,of de rapportage van de gegevens zijn Floor Arts (Bureau Waardenburg), Jan van Beek (IBN-DLO), Roel van Beek (IBN-DLO), Paul de Bie (IBN-DLO), Nico van den Brink (IBN-DLO), Albert Holland (RIKZ), Hugh Jansman (IBN-DLO), Johan de Jong (IBN-DLO), Hester Jongepier (IBN-DLO), John Verbunt (IBN-DLO),.Dick Vethaak (RIKZ) en Pim Wolf (Delta Project Management).

Inleiding

Gering broedsucces en ziekte verschijnselen bij Visdieven in de kolonie op het sluiscomplex bij Terneuzen.

Sinds vele jaren wordt door het RIKZ onderzoek verricht in de visdiefkolonie op het sluiscomplex van Terneuzen (Westerschelde). De aantallen broedparen in deze kolonie zijn geleidelijk toegenomen van 5 in 1979 tot 276 in 1994. In deze periode was het broedsucces goed (>1 jong per broedpaar). In de periode 1994 t/m 1996 werd in de kolonie op de sluis van Terneuzen een aantal zorgwekkende ziekteverschijnselen geconstateerd en was het broedsucces herhaaldelijk nihil (zie tabel 1). Deze verschijnselen, die niet zijn waargenomen bij de overige kolonies in het Westerscheldegebied, waren rottende eieren, ontstekingen en bloedingen op diverse plaatsen bij kuikens en een verhoogde mortaliteit onder kuikens. Eerder onderzoek naar de virologische staat van de kadavers en PCB concentraties in de eieren of kuikens heeft geen sluitende verklaringen voor deze verschijnselen kunnen leveren. Er is besloten te trachten de oorzaak voor het slechte broedsucces te achterhalen middels een combinatie van veldonderzoek en laboratoriumonderzoek.

tabel 1. Aantal broedparen en broedsucces van de Visdief in de belangrijkste kolonies langs de Westerschelde (database RIKZ); Tern = Terneuzen, Nw N = Nieuw Neuzen, H.Platen = Hoge Platen, Saeft = Saeftinge.

Jaar	W.schelde totaal	Tern.			Nw N.			H.Platen			aeft			
	n	n	bs	oorz	n	bs	oorz	n	bs	oorz	n	bs	oorz	
1979	441	5			70			30			200			
1980	535	17			40			100			270			
1981	586	10			40			140			260			
1982	829	5			30			350			275			
1983	931	18			20			475			290			
1984	992	44			30			550			285			
1985	1178	50			50			750			270			
1986	1404	41			145			1000			210			
1987	1583	15			250			850			430			
1988	1673	28			350			825			420			
1989	1625	29			350			725			500			
1990	1443	87			5			900			432			
1991	1578	146			90			775			522			
1992	1446	175			76			700			430			
1993	1128	206	+		44	?		530	?		381		?	
1994	1292	276	0	s	31	?		640	+		321		+	
1995	1404	168	+		70	±		800	-	o	339		+	
1996	1437	182	0	s	27	0	p	750	±		472		±	

Noot: bs = broedsucces: ? = onbekend; 0 = nihil (<0,1 jong/paar); - = slecht (<0,5 jong/paar); ± = matig (0.5-1 jong/paar); + = goed (> 1 jong/paar). oorz = oorzaken slecht broedsucces: p = predatie; o = overspoeling; s = embryonale sterfte.

Overzicht van waarnemingen in de broedkolonie te Terneuzen 1994-1996.

1994. 276 nesten. Uitkomstsucces redelijk. Uitvliegsucces vrijwel nihil. Predatie van adulten door zoogdier of uil (afgebeten koppen). Deel eieren rot. Alle uitkomende of uitgekomen jongen (op twee na) binnen enkele dagen tot een week dood. Symptomen: ontstoken ogen, poten en zwemvliezen met rode vlekken, zwemvliezen aangetast, bebloede vleugelpunten, gelijkend op paratyfus Salmonella typhimurum. Virulogisch onderzoek door ID-DLO Lelystad: uitslag onduidelijk, materiaal in ontbinding. Chemisch onderzoek door RITOX: geen eenduidige resultaten wegens ontbreken vers materiaal.

1995 168 nesten. Uitkomstsucces 70% (normaal >90%). Uitvliegsucces redelijk tot goed. Geen predatie en geen ziekteverschijnselen. Eieren uit Saeftinge en Terneuzen onderzocht op PCBs door RIKZ. In Saeftinge PCBs hoger. Ander grafisch patroon met 'onbekende pieken' .

1996 194 nesten. Uitkomstsucces 2%, uitvliegsucces nihil. Predatie van (>5) adulten (afgebeten koppen) en eieren (15% verdwenen). Uitgekomen jongen binnen enkele dagen dood. Symptomen als in 1994. Geen analyses uitgevoerd.

Vergelijking van de Terneuzen-kolonie met een referentiekolonie.

Een pilot studie, waarvan hier verslag wordt gedaan, is uitgevoerd in voorjaar/zomer 1997. De studie is gericht op het vaststellen van het broedsucces en de respons van enkele biomarkers om effecten van milieukritische stoffen op individueel nivo te karakteriseren. Hiertoe is onderzoek gedaan bij kuikens uit de Terneuzen kolonie. Ter vergelijking is eenzelfde onderzoek uitgevoerd bij kuikens uit een referentiekolonie gelegen op de Oesterdam langs de Oosterschelde. De resultaten van deze pilot-studie moeten aangeven of het broedseizoen 1997 wederom slecht verloopt voor de Terneuzen kolonie en of de problemen een chronisch karakter aannemen. Op basis van de resultaten kan tevens een idee gevormd worden over de mogelijke oorzaken van deze problemen en een voorstel geformuleerd worden voor vervolgonderzoek dat een nadere aanduiding van de oorzaak mogelijk moet maken.

Infectieziekten, embryotoxiciteit, en verminderde broedzorg als mogelijke oorzaken.

Bij de aanpak van het onderzoek is uitgegaan van drie mogelijke oorzaken van de waargenomen effecten. De eerste mogelijkheid is dat de sterfte veroorzaakt wordt door een *infectieziekte,* mogelijk mede veroorzaakt door aantasting van het immuun-systeem t.g.v. blootstelling aan contaminanten. Een tweede mogelijkheid is dat een blootstelling aan milieuverontreinigende stoffen optreedt waarbij de *embryotoxiciteit* van deze stoffen rechtstreeks het broedsucces beïnvloedt. Een derde mogelijkheid is dat blootstelling aan milieuverontreinigende stoffen een gedragsverandering en/of conditieverslechtering bij de oudervogels veroorzaakt waardoor de *broedzorg* negatief beïnvloed wordt en het broedsucces afneemt. Bij alle genoemde mogelijke oorzaken wordt met name gedacht aan verhoogde blootstelling aan organochloorverbindingen zoals PCB's, PCDD's en PCDF's.

De validiteit van de drie mogelijke oorzaken 1) infectie, 2) embryotoxiciteit, 3) broedzorg is onderzocht middels een vergelijking van visdieven uit de Terneuzen kolonie en een referentie kolonie welke gelegen is in een gebied waarin de mate van verontreiniging gering verondersteld wordt. Bij de vergelijkingen is gelet op 1) infectieuze organismen in de darm, 2) broedsucces bij kunstmatig uitbroeden, 3) biometrische, histopathologische en biochemische effecten bij kunstmatig uitgebroede kuikens, 4) broedsucces in het veld.

Voor eventueel chemisch analytisch onderzoek is materiaal verzameld. Voedsel (vis) is verzameld in de foerageergebieden van de visdieven om een indruk van de lokale blootstelling te verkrijgen. Bloedmonsters van adulte vogels zijn verzameld om een

indruk van de interne concentraties in de adulte vogels te verkrijgen. Van pas uitgekomen kuikens is het resterend dooiermateriaal verzameld om een indruk van de daadwerkelijke blootstelling tijdens de embryonale fase te verkrijgen.

Drie mogelijke oorzaken van slecht broedsucces bij visdieven bij Terneuzen.

1. Infectieziekten. Naar analogie van de zeehondensterfte eind jaren tachtig in o.a. de Waddenzee waarbij verstoorde immuunfuncties een rol hebben gespeeld (Reijnders 1986, Ross *et al.* 1995) lijkt een mogelijke oorzaak een infectieziekte die mede t.g.v. een door verontreinigingen aangetast immuunsysteem toe kan slaan. Infecties bij de pas uitgekomen kuikens kunnen leiden tot verhoogde mortaliteit en aldus het uitvliegpercentage negatief beïnvloeden.

2. Embryotoxiciteit. Verhoogde blootstelling van het embryo of kuiken kan leiden tot een verlaagd uitkomst en/of uitvliegpercentage. Een laag uitkomstpercentage is aangetoond in studies waarin eieren kunstmatig uitgebroed zijn om mogelijke effecten van het broedgedrag van de oudervogels uit te schakelen. Zowel bij de Forster's Stern *(Sterna forsterii)* als bij de Visdief uit verontreinigde kolonies in het Amerikaanse Grote Meren gebied zijn op deze manier significante concentratie-afhankelijke afnamen van het uitkomstpercentage aangetoond (Kubiak *et al.* 1989; Hoffman *et al.* 1993). Daarnaast is in verschillende ei-injectie studies met verschillende vogelsoorten gebleken dat PCB's embryonale sterfte kunnen veroorzaken (Brunström *et al.* 1986, 1988, 1990).

Een laag uitvliegpercentage is een ander mogelijk effect van verhoogde embryonale blootstelling, eventueel aangevuld met een verhoogde postnatale blootstelling aan milieucontaminanten. Bij visdief eieren/kuikens afkomstig uit verschillende meer of minder vervuilde gebieden is een relatie gevonden tussen PCB concentraties in de dooier en de tijd die nodig is om de eieren uit te broeden. Ook is een relatie met het eivolume vastgesteld (Bosveld *et al.* 1994, Murk *et al.* 1996). Het uitkomstpercentage in het laboratorium werd hierdoor echter niet beïnvloed. Ook is een significante relatie met de ethoxyresorufine O-deethylase (EROD) activiteit in de lever aangetoond. In latere experimentele blootstellingsstudies is aangetoond dat de mate van EROD inductie gecorreleerd is aan toxische effecten zoals atrofie van de bursa fabricius (betrokken bij immuun functies), schildklier en schildklierhormoon concentraties en testosteron hydroxylase activiteiten (verstoring steroïd hormoon metabolisme; endocriene verstoring) (zie Bosveld *et al.* 1997). Deze effecten zijn mogelijk gerelateerd aan een verlaagde fitness en een daaraan gekoppelde verhoogde mortaliteit in de eerste weken na uitkomst.

3. Broedzorg. Naast rechtstreekse toxische effecten van milieucontaminanten op het embryo/kuiken kunnen ook indirecte effecten optreden waarbij een laag uitkomstpercentage het gevolg is van een verslechterde conditie van de oudervogel. Bij Zilvermeeuwen *(Larus argentatus)* uit verontreinigde kolonies met een verlaagd broedsucces is een relatie aangetoond tussen concentraties organochloorverbindingen en de tijd die de oudervogel besteedt aan het broeden (Fox et al. 1978, Peakall et al. 1980). Een effect op het broedgedrag is ook in een laboratoriumstudie bij duiven aangetoond (Peakall & Peakall 1973). Ei-uitwisselingsexperimenten bij de Forster's Stern wezen eveneens op een relatie tussen verstoord broedgedrag bij vogels in een verontreinigde kolonie en het uitkomstpercentage (Kubiak *et al.* 1993). Daarnaast kan een verslechterde conditie van de oudervogels in de periode na uitkomst leiden tot een verminderde voedselaanvoer voor het pas uitgekomen jong. Het mogelijke gevolg hiervan is een vroege sterfte van het kuiken door voedselgebrek. Een verslechterde conditie kan bovendien leiden tot een verminderde capaciteit om predatoren op afstand te houden. In dit verband was het passieve gedrag van de Visdieven in de Terneuzen kolonie in de afgelopen jaren opvallend, terwijl in 1991 in de kolonie aanwezige onderzoekers nog zeer agressief bejegend werden.

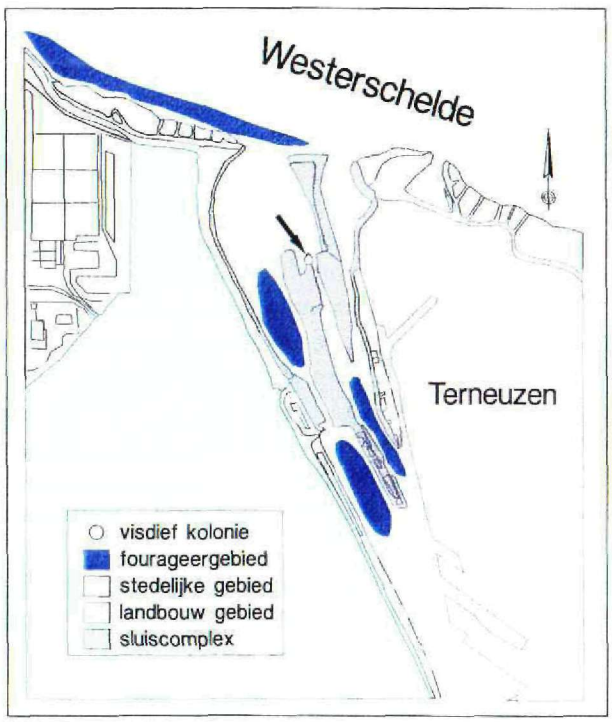
Materiaal en Methoden

Beschrijving van de kolonies

Visdieven broeden op het sluiscomplex bij Terneuzen en fourageren in en bij de monding van het kanaal van Gent naar Terneuzen.

Terneuzen: De kolonie is gesitueerd op het sluiscomplex van Terneuzen en in beheer bij Rijkswaterstaat Directie Zeeland. De vogels broeden op een plateau gelegen tussen twee sluistoegangen. Het plateau, met een oppervlakte van 90 x 25 m, is volgestort met grof grind. Sinds 1991 wordt de hele kolonie ieder jaar door RIKZ met gaas omsloten om te voorkomen dat bij betreding van het terrein de jongen vanaf het plateau in het water springen. Verspreid over de grindbak liggen enkele betonnen rioolbuizen, die tijdens slecht weer als schuilplaats kunnen dienen voor jonge Visdieven. Het plateau ligt enkele meters boven het hoogwaterniveau en overspoelt dus nooit. De laatste jaren wordt de vegetatie sterk gedomineerd door kleverig kruiskruid en kleine klaproos. Verder groeit er muurpeper, akkerdistel, braam en gras. De vegetatiebedekking is sinds 1991 sterk toegenomen.
Behalve de Visdieven broedden in 1997 op deze locatie 1 paar Scholeksters en 3 paar Kokmeeuwen. Uit ringaflezingen bij Visdieven blijkt dat veelal dezelfde individuen ieder jaar terug keren naar deze lokatie om te broeden.

Figuur. 1.
Locatie van de Terneuzen kolonie.



Een Visdiefkolonie in het Zoommeer, broedend op een schiereiland nabij de Oesterdam, als schone referentiekolonie.

Oesterdam: Als referentie is de 'Oesterdam kolonie' geselecteerd. De vogels uit deze kolonie betrekken hun voedsel (vooral vis) uit de schone Oosterschelde. In veel mindere mate wordt ook gefoerageerd in het Zoommeer waar waarschijnlijk vooral poppen van chironomiden gegeten worden. De Oesterdamkolonie is gesitueerd op een in begin 1996 opgespoten schiereiland in het Zoommeer nabij het Oosterschelderak, grenzend aan de Oesterdam ter hoogte van kilometerpaal 6.9 (verder aangeduid 'Oesterdam'). De bodem is zandig met vrij veel schelpmateriaal. De vegetatie was aan het begin van het seizoen nog spaarzaam, gedomineerd door o.a. zeezuring. Prominent aanwezig in het begin van voorjaar waren de verdroogde stengels van pollen zeezuring uit 1996. In de loop van mei nam de vegetatiebedekking en hoogte sterk toe. Behalve ca 217 paar Visdieven waren hier in 1997 ook broedgevallen of -pogingen van Kluut (313), Kleine Plevier (7), Bontbekplevier (2), Strandplevier (9), Kokmeeuw (50), Zilvermeeuw (2 nesten), Dwergstern (11), en Noordse Stern (1). Op de vooroeververdediging van dit schiereiland broedden nog 1 paar Kleine Mantelmeeuwen en 10 paar Zilvermeeuwen. Met name de vooroeververdediging was in trek als hoogwatervluchtplaats voor c. 150 Scholeksters en maximaal enkele honderden onvolwassen grote meeuwen. Behalve door de onderzoekers werd het gebied slechts incidenteel door mensen bezocht, waarbij nooit sprake was van moedwillige verstoring of eirapen. Eén maal werd het spoor gezien van een hond, maar ruim buiten de eigenlijke kolonie. Er waren geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van grondpredatoren zoals ratten.

Broedbiologie (veldstudie)

Bepaling van het aantal broedparen en het broedsucces in het veld.

In de maanden mei t/m september 1997 zijn de beide kolonies een aantal keren bezocht en zijn observaties gedaan om het aantal ouderparen, legsels en kuikens te bepalen. Tijdens deze bezoeken zijn ook de eieren voor het laboratoriumonderzoek eerst gemarkeerd en later verzameld. In het begin van de legfase zijn de kolonies frequent bezocht en zijn van de gevonden 1-legsels de eieren gemerkt met een watervaste stift op alcoholbasis, om in een later stadium te worden verzameld. Alle gevonden legsels werden gemerkt met een genummerd, houten stokje. De inhoud van de nesten werd tijdens de controles genoteerd. Van een aantal legsels werd de afmetingen van de eieren (Terneuzen n = 36) genomen met een schuifmaat, tot op 0.1 mm nauwkeurig. Aanwezige kuikens werden geringd met een roestvrijstalen ring van het Vogeltrekstation Arnhem. Om uitkomstsucces, uitvliegsucces en individuele groei van de kuikens in beide kolonies te bepalen, is een deel van de kolonie afgezet met 40 cm hoog gaas. Binnen deze omheining werden de kuikens gemeten (kop + snavel met een schuifmaat tot op 0.1 mm nauwkeurig) en gewogen (met een veerbalans tot op 1 g nauwkeurig). In de kolonie van Terneuzen zijn op deze manier 22 nesten omsloten voor de bepaling van het broedsucces. Langs de Oesterdam is het niet tot de aanleg van een omheining gekomen, omdat alle legsels voortijdig verdwenen waren.

Bloedafname bij adulten

Bloedafname voor chemisch-analytisch onderzoek.

Van 15 adulten in de Terneuzen kolonie en 14 adulten in de Oesterdam kolonie zijn bloedmonsters genomen om hierin op een later tijdstip de concentraties van de aanwezige PCB te bepalen (niet in dit rapport opgenomen).
Volwassen vogels werden op het nest gevangen met behulp van een inloopkooi. Het vangen gebeurde in de tweede helft van de broedcyclus om het verlaten van nesten te voorkomen. De gevangen vogels werden voorzien van een ring, gewogen en gemeten (snavel, kop + snavel, vleugel). Aan de hand van de afmetingen van kop + snavel is, voor zover mogelijk, het geslacht bepaald. Bloed (c. 5 ml) werd afgenomen door een prik in een ader in de oksel.

Parasitologisch/pathologisch onderzoek

Onderzoek naar parasitaire en bacterieële infecties.

Ten behoeve van parasitologisch onderzoek is in de Terneuzen kolonie een aantal dodelijk zieke kuikens gevangen en naar het IBN-DLO vervoerd. Op het laboratorium zijn deze dieren onder anesthesie gebracht, gedood en zijn secties verricht overeenkomstig de methode zoals beschreven voor de in het laboratorium uitgekomen kuikens. De kadavers zijn gekoeld bewaard en overgebracht naar het laboratorium Bijzondere dieren (vakgroep Pathologie) van de faculteit Diergeneeskunde Universiteit Utrecht. De longen van de dieren zijn microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van bloedparasieten. De nieren zijn microscopisch onderzocht op afwijkingen en de inhoud van de darmen is onderzocht op afwijkingen. De microbiologische status van de dikke darm is onderzocht door monsters hieruit op agar platen over te brengen en na verloop van tijd de mate van aanwezigheid van *Enterobacter agglomerans, Enterobacter spec., Aeromaonas spec., Escherichia coli, en Streptococcus spec.* te beoordelen. Door een gebrek aan levend materiaal in de referentie kolonie (door predatie in de Oesterdam kolonie is geen enkel kuiken grootgebracht) konden hier geen monsters verzameld worden voor parasitologisch referentieonderzoek.

Kunstmatige bebroeding van eieren

Onderzoek naar het broedsucces onder gestandaardiseerde omstandigheden in het laboratorium.

Om een vergelijk tussen de intrinsieke kwaliteit van de gelegde eieren te kunnen maken, zijn in zowel de Terneuzen als de referentiekolonie op 28 mei recent gelegde eieren verzameld en overgebracht naar het laboratorium. Hier zijn deze kunstmatig uitgebroed waarbij de randvoorwaarden van het broedproces (o.a. temperatuur, luchtvochtigheid) zoveel mogelijk gelijk gehouden zijn. Op basis van het identieke broedproces kunnen eventueel optredende verschillen tussen Terneuzen en de Oesterdam op het conto van reeds in het ei aanwezige factoren geschreven worden. In de Terneuzen kolonie zijn 17 van de 29 eieren verzameld welke op 21 mei gemerkt zijn als eerste ei van een legsel. De 8 resterende eieren waren in de tussenliggende periode verlaten, gebroken of gepredeerd. In de Oesterdam kolonie zijn op 19 mei 10 en op 20 mei 7 vers gelegde eerste eieren van een legsel gemerkt. Op 28 mei zijn de overgebleven gemerkte eieren, 12 stuks, verzameld. Bij aanvang van het kunstmatige broedproces waren de Terneuzen eieren dus 7 dagen oud en de Oesterdam eieren 8 of 9 dagen. De verzamelde eieren zijn in eierdozen geplaatst en in een koelbox vervoerd naar het IBN-DLO te Arnhem. Hier zijn de eieren geplaatst in een Miracle broedmachiene (Pherdo, Appingedam, Nederland). De eieren zijn uitgebroed bij 37.5 °C met incidenteel afwijkende temperaturen tussen 37.2 en 38.0 °C. De eieren zijn automatisch gekeerd. In de broedmachiene is een schaaltje (15 cm id.) met water geplaatst om de vereiste luchtvochtigheid te bereiken. Het broedsucces is beschreven aan de hand van het percentage aangepikte eieren (embryonale groei voltooid), het percentage uitgekomen eieren, en het voorkomen van geboorte afwijkingen bij de uitgekomen kuikens.

Biometrie van de eieren

Bepaling van eivolume, eigewichten, en eischaaldikte.

Het eivolume is bepaald met de formule van Hoyt (1979): volume (mm^3) = 0.509 x lengte x (breedte)^2/1000. De eigewichten zijn bepaald bij aanvang van het broedproces in het laboratorium (28 mei 1997). Na uitkomen zijn de eischalen bewaard bij kamertemperatuur voor latere meting van eischaaldikten. Hiertoe is het ingedroogde eivlies verwijderd van de eischaal en zijn het eivlies en de eischaal afzonderlijk gemeten met een micrometer. De metingen zijn in duplo verricht.

Calcium gehalte van de eischalen

Bepaling van het calciumgehalte in de eischaal.

Van de restanten van de eischalen is het Calcium gehalte bepaald. Hiertoe zijn de eischalen ontdaan van het binnenmembraan, verbrokkeld en gedroogd bij 105 °C. De verbrokkelde eischalen zijn overgebracht in bekerglazen en gewogen. In iedere glas is 4 ml HNO_3 65% suprapur toegevoegd. De oplossing is drooggedampt op een zandbad bij ca 80 °C. Dit proces is twee maal herhaald met 2 ml HNO_3 65% suprapur. Aan het residu is vervolgens 1 ml HNO_3 65% suprapur + 4 ml milli-Q water toegevoegd. Het verkregen mengsel is 10 minuten opgewarmd op een zandbad bij 80°C, kwantitatief overgebracht in een maatkolf en aangevuld tot 25 ml. Het Calcium gehalte is gemeten met een vlam atomaire absorptie spectrometer (AAS) type Video12 van International Laboratories (USA). Als ontstoringsmiddel voor de bepalingen is aan alle oplossingen $LaCl_3$ (5000 mg La/l) toegevoegd. Metingen zijn verricht bij een golflengte van 422.6 nm.

Sectie en Biometrie van de kuikens

Sectie van de kuikens en bepaling van afmetingen van kop, snavel, dijbeen, scheenbeen, handwortelbeen, en handpennen.

Binnen 24 uur na uitkomst van de kuikens zijn deze verdoofd met diethylether, gewogen en is de buikwand geopend. Bloed is afgenomen bij het hart. Direct hierop volgend is de lever uit het dode kuiken gesneden. Een klein deel van de lever is afgesneden en overgebracht in Bouin fixeermiddel voor later histopathologisch onderzoek. De rest van de lever is in twee delen gescheiden (lobus dextris en lobus sinistris) welke apart omwikkeld met aluminium folie ingevroren zijn in vloeibare stikstof (-196 °C) en opgeslagen zijn bij -80°C.
De linkerpoot van het kuiken is verwijderd en gekookt in water om het spierweefsel te verwijderen. Het dijbeen *(femur)*, scheenbeen *(tibia)* en handwortelbeen *(tarsus)* zijn vrijgeprepareerd en de lengtes van deze botten zijn gemeten met een schuifmaat. Van de linkervleugel is de lengte van de handpennen gemeten.
Nadat de lengte van de kop en de snavel gemeten zijn is de schedel geopend en zijn de hersenen uitgenomen en overgebracht in Bouin fixeermiddel voor later morfometrisch onderzoek. Het restant van het kadaver is in zijn geheel overgebracht in Bouin voor histopathologisch onderzoek.

Morfometrie van de hersenen

Bepaling van de mate van asymmetrie tussen linker en rechter hersenhelft.

De in Bouin gefixeerde hersenen zijn overgebracht in een petrischaal met daarin een laagje demiwater. De hoogte, breedte, en diagonaal van de grote hersenen zijn gemeten (zie Fig. 2). De metingen zijn verricht met een olympus binoculair (objectief: 2x) met een geijkte schaalverdeling in het oculair. De verschillende hersenen zijn ieder drie keer afzonderlijk gemeten. De gemiddelde waarde van deze metingen is gebruikt voor verdere berekeningen

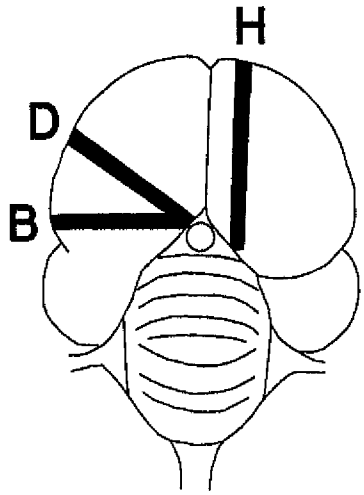


Fig. 2.
Morfometrie van de hersenen. Achteraanzicht van de hersenen met aanduiding van de assen waarlangs de breedte (B), diagonaal (D), en hoogte (H) van de hersenen gemeten zijn.

EROD activiteit

EROD activiteit in de lever.

De 7-ethoxyresorufine O-deethylase (EROD) activiteit is bepaald in de microsomale fracties van de lever. De ingevroren levers zijn hiertoe ontdooid en gehomogeniseerd in 0.1 M fosfaatbuffer met EDTA ($Na_2HPO_4.12\ H_2O$, 31.94 g/l; KH_2PO4 4.86 g/l NaEDTA 3.72 mg/l; pH 7.6) met een glazen in ijs geplaatste potterbuis en een teflon plunjer aangedreven door een multifix M80 motor. Het homogenaat is overgebracht in ultracentrifugebuizen en 12 min gecentrifugeerd bij 15.000 g. Het verkregen supernatant is overgebracht naar een nieuwe buis en 70 min gecentrifugeerd bij 150.000 g in een gekoelde (4°C) Beckman L-60 ultracentrifuge met 50.2 Ti rotor. De verkregen pellet is opgenomen in fosfaatbuffer met 20% glycerol, geresuspendeerd met een ultrasoon trilstaaf (Converter en Sonifier B12 van Branson sonic power company, Danburg, Connecticut) en ingevroren bij -80°C. Op een later tijdstip is de verkregen microsomale fractie weer ontdooid, de eiwitconcentratie gemeten en EROD activiteit bepaald . Ten behoeve van de eiwitbepaling is 25 µl microsomale fractie opgenomen in 300 µl fosfaatbuffer ($(Na_4(PO_4)_2.10H_2O$ in demiwater; 22.297 g/l, pH=8.0) en 100 µl 0.1 N NaOH). Na sonificeren is al schuddend 100 µl fluorescamine oplossing (fluorescamine in aceton 1.08 M) toegevoegd. Na 1 min incubatie is de hydrolyse van fluorescamine onder invloed van de aminogroepen in de eiwitten fluorimetrisch bepaald bij een exitatie golflengte van 360/40 nm en een emissie golflengte van 475/40 nm. Bovine Serum albumine (BSA) is gebruikt als standaard. Ter bepaling van de EROD activiteit is in microtiterplaten van Greiner (24 wells) een reactiemengsel gemaakt bestaande uit 75 µl microsomale fractie , 375 µl TRIS buffer (0.1 M, pH 8.0), 25 µl 7-ethoxyresorufine oplossing (500 µM stockoplossing in methanol doorverdund naar 50 µM in TRIS buffer), en 50 µl BSA oplossing (Bovine Serum Albumine 10 mg/ml in TRIS). Na 5 min pre-incubatie bij 37°C is 75 µl NADPH oplossing (25 mM in TRIS) toegevoegd om de reactie te starten. De door het cytochroom P450 1A gekatalyseerde EROD is gemeten door de resorufine vorming direct na de start van de reactie en na 10, 20 en 30 min fluorimetrisch te bepalen bij een exitatie golflengte van 530 nm en een emissie golflengte van 590 nm. Resorufine (Kodak, Nederland) is gebruikt als standaard. EROD activiteit is uitgedrukt in pmol gevormd resorufine per minuut per mg microsomaal eiwit (pmol/min.mg).

Histopathologie

Histopathologische beoordeling van de inwendige organen: lever, bursa fabricius, thymus, nieren, schildklier, geslachtsorganen, bot, en lymfoïd weefsel in de darm.

De in Bouin gefixeerde levers en kadavers zijn gedehydrateerd en ingebed in parafine. Met een microtoom zijn aansneden gemaakt van de lever, thymus, wervels en ribben, geslachtsorganen, bursa fabricius, schildklier, nieren, en lymfoïd weefsel in de blinde darm (GALT; gut associated lyphoid tissue). De coupes zijn gekleurd met PAS/Best voor de beoordeling van glycogeenstapeling, met Prussian blue voor de beoordeling van ijzerstapeling, en met hematoxyline/eosine (HE) voor de algemene weefselbeoordeling.

In de lever is de mate van vacuolisatie, de locatie van vacuolisatie, voorkomen van apopotosis, galgang proliferatie, aanwezigheid van galpigment, en de aanwezigheid van bloed precursorcellen (heamopoese) beoordeeld. Bloedvorming in de nieren is eveneens beoordeeld. Van de thymus is de afmeting bepaald als maat voor de ontwikkeling. De verhouding tussen de cortex en de medulla (C/M) in longitudinale en transversale richting is bepaald als maat voor de lymfoïde activiteit van de thymus. Als indicatie voor de aanwezigheid van een (ongewenste) grond van afweerreacties en als maat voor de reactiviteit van het immuunsysteem is het aantal granulocyten (van het heterofiele type) in de thymus en in de bursa fabricius bepaald. Daarnaast is in de bursa fabricius het aantal follikels per beeld bepaald als maat voor de gemiddelde grootte van de aanwezige follikels, waarbij grote follikels duiden op een goed ontwikkeld afweersysteem. Als maat voor de ontwikkeling van het immuunsysteem is verder het aantal lymfocyten per follikel en het stadium van cortex formatie bepaald in de bursa fabricius. Als maat voor de ontwikkeling van het "gut associated lymphoid tissue"

Tabel 2.

Classificatie van waarnemingen aan weefsels van lever, thymus, bursa fabricius, galt, bot, gonaden, nieren, schildklier,

parameter	score —>	0	1	2	3	4	5
LEVER	Vacuolisatie	-	niet aangetroffen	weinig	redelijk	veel	zeer veel
	Locatie vacuoles	-	apicaal	basaal	diffuus	-	-
	Apoptosis	niet aangetroffen	zeer weinig	weinig	redelijk veel	veel	zeer veel
	Galgang proliferatie	-	niet aangetroffen	weinig	redelijk	veel	zeer veel
	Galpigment	niet aangetroffen	in geringe mate aangetroffen	duidelijk aanwezig			
	Bloed precursor cellen	niet aangetroffen	zeer weinig	weinig	redelijk veel	veel	zeer veel
THYMUS	Orgaan grootte	-	≤ ¼ van 25/060 objectiefveld	¼-½ van 25/0.60 objectiefveld	≤ ¼ van 10/0.30 objectiefveld	¼-½ van 10/0.30 objectiefveld	-
	Cortex/medulla verhouding	-	≤ ½ in beide richtingen	≤ ½ in een richting	1 in beide richtingen	geen medulla aanwezig	-
	Aantal granulocyten	niet aangetroffen	sporadisch aangetroffen	normaal	opmerkelijk hoog	-	-
BURSA	Aantal granulocyten	niet aangetroffen	sporadisch aangetroffen	normaal aantal	opmerkelijk hoog aantal	-	-
	Lymfocyten in follikels	variërend van 0 (niet aanwezig) tot 7 (zeer veel aanwezig)					
	Cortex vorming in follikels	niet aangetroffen	aangetroffen in enkele follikels	beginnend in de helft van de follikels	-	-	-
	Apoptosis in centrum van follikels	niet aangetoond	gering en sporadisch	normaal	sterk en veelvuldig	-	-
GALT	Aantal lymfocyten	variërend van 0 (niet aanwezig) tot 10 (zeer veel aanwezig)					
BOT	Verbening in rib & wervels	niet aangetroffen	marginaal beginnend	marginaal volledig centraal	marginaal volledig, en beginnende vascularisatie	marginaal volledig, centraal vascularisatie,	-
GONADEN	Algemene inspectie						
NIEREN	Bloed precursor cellen	niet aangetroffen	zeer weinig	weinig	redelijk veel	veel	zeer veel
SCHILDKLIER	Activiteit	actief	niet actief	-		-	-

(GALT) is in weefsel onder het slijmvlies van de blinde darm (tunica submucosa van het caecum) de mate van lymfocyten infiltratie beoordeeld, waarbij hoge aantallen lymfocyten duiden op een goed ontwikkelde afweerfunctie van de darm.
In botweefsel is de mate van verkalking beoordeeld als indicatie voor de relatieve ontwikkeling van het skelet. Hiertoe is in de thorax de osteoid vorming in de wervellichamen, de wervelbogen en in de ribben bepaald. De scores die voor de beoordeling van de verschillende histopathologische parameters gebruikt zijn, zijn weergegeven in tabel 2. Verschillen tussen de groepen zijn getest met een *t*-toets. Discontinue datareeksen zijn logit-getransformeerd om de varianties tussen de groepen te standaardiseren en vervolgens getest in GENSTAT (GENSTAT 1987) onder de aanname van een binomiale verdeling van de histopathologische scores.

Broedbiologie (veldobservaties)

Onderhuidse bloedingen in vleugels en poten, ontstekingen bij de ogen, evenwichtsstoornissen, en hoge mortaliteit bij kuikens in de Terneuzenkolonie.

De lokatie Terneuzen is 13 keer bezocht in de periode van 14 mei tot 17 september. De eerste eieren zijn gelegd in de periode tussen 14 en 21 mei. Het grootste aantal nesten (145) is geteld op 3 juni. De eerste jongen zijn waargenomen op 18 juni. In de periode hierna zijn veel jongen uitgekomen maar gestorven. De uitgekomen kuikens vertoonden kleine onderhuidse bloedingen aan de poten en de vleugels, ontstoken ogen, en evenwichtsstoornissen. Ook is een groot aantal eieren niet uitgekomen. Geen van de jongen heeft het vliegvlugge juveniele stadium bereikt. In de maand juli zijn 42 nieuwe legsels waargenomen. Ook uit deze legsels zijn geen vliegvlugge Visdieven voortgekomen.
De lokatie Oesterdam is 11 keer bezocht in de periode van 13 mei tot 26 juni. De eerste nesten in deze kolonie zijn waargenomen op 13 mei. Op 2 juni waren totaal 217 legsels aanwezig. Geen van deze legsels heeft echter vliegvlugge jongen opgeleverd. Alle eieren en uitgekomen jongen zijn gepredeerd (o.a. door kokmeeuw). Op 26 juni was de kolonie geheel verlaten. In bijlage 1 is een chronologisch overzicht van de veldactiviteiten en waarnemingen gegeven.

Tabel 3.
Broedbiologische parameters.

Verschil in broedbiologie tussen Terneuzen kolonie en referentie kolonie (Oesterdam).

	Terneuzen	*Oesterdam*
aantal broedparen	*152*	*217*
aantal legsels	*188*	*217*
legselgrootte (ei/nest)	*2.4±0.8 (n=156)*	*2.4±0.7 (n=143)*
eerste waarneming eileg	*21 mei*	*13 mei*
einde ileggperiode	*10 juli*	*9 juni*
vroege legsels	*146*	-
late legsels (na 15 juni)	*42*	-
eivolume	*20.0±1.1 (n=36)*	-
eerste waarneming uitkomst	*18 juni*	*9 juni*
aantal eieren gevolgd voor broedsucces	*376*	*338*
- waarvan ei uitgekomen	*28%*	*1%*
- waarvan ei gepredeerd	*20%*	*86%*
- waarvan ei meegenomen voor onderzoek	*5%*	*4%*
- waarvan ei niet uitgekomen	*10%*	*0%*
- waarvan lot onbekend	*37%*	*9%*

De eieren.

Geen algemeen verschil tussen de eieren uit Terneuzen en de referentiekolonie. Wel een verschil tussen de eieren met levensvatbare kuikens. Deze zijn in Terneuzen significant groter en zwaarder.

Bij vergelijking van de voor kunstmatige bebroeding verzamelde eieren bleek het eivolume in de Terneuzen kolonie niet af te wijken van het eivolume in de referentie kolonie. Ook is geen verschil waargenomen tussen het volume van wel en niet uitgekomen eieren. Wel is een verschil aangetoond tussen het gemiddeld volume van de uitgekomen eieren uit de referentie en de Terneuzen kolonie. Het volume in Terneuzen was significant (p=0.02) groter. Hetzelfde geldt ook voor de eigewichten: geen verschillen tussen wel en niet uitgekomen eieren, maar wel tussen uitgekomen eieren uit Terneuzen en uitgekomen eieren uit de referentie kolonie (p=0.005).

Eieren uit Terneuzen hebben een dikkere eischaal dan eieren uit het referentiegebied, maar vertoonden wel veel meer breuk. Ook hebben de uitgekomen eieren een dikkere eischaal dan de niet uitgekomen eieren.

Eieren uit de Terneuzen kolonie hebben een significant (p=0.05) dikkere eischaal en eivlies dan de referentie kolonie. Daarnaast bleken de uitgekomen eieren uit de Terneuzen kolonie ook een dikkere (p=0.03) eischaal te hebben dan de niet uitgekomen eieren. Voor het eivlies werd dit verschil niet waargenomen. Wel werd een verschil in dikte van het eivlies waargenomen tussen de wel en niet uitgekomen eieren uit de Terneuzen kolonie. Het calciumgehalte van de eischalen verschilde niet tussen de kolonies of tussen de wel en niet uitgekomen eieren (Tabel 4).

Tabel 4.

Eieren. Volume, gewicht, schaaldikte, vliesdikte en calciumgehalte van de kunstmatig bebroede eieren. Weergegeven zijn de gemiddelden ± standaarddeviaties en het aantal waarnemingen (n).

	kolonie	alle eieren	n	uitgekomen	n	niet uitgekomen	n
eivolume (ml)	Terneuzen	21.1 ± 1.5	17	21.7 ± 0.8^{a}	8	20.6 ± 1.7	9
	Oesterdam	20.6 ± 1.1	10	20.5 ± 1.1^{a}	9	21.9	1
eigewicht (g)	Terneuzen	20.8 ± 1.5	17	21.5 ± 0.9^{b}	8	20.3 ± 1.7	9
	Oesterdam	20.2 ± 1.3	12	20.0 ± 1.1^{b}	11	22.8	1
eischaaldikte (mm)	Terneuzen	1.48 ± 0.07^{d}	13	1.45 ± 0.04^{c}	8	1.54 ± 0.07^{c}	5
	Oesterdam	1.40 ± 0.12^{d}	12	1.40±0.13	11	1.40	1
eivliesdikte (mm)	Terneuzen	0.80 ± 0.06^{e}	13	0.81 ± 0.06^{f}	8	0.78±0.06	5
	Oesterdam	0.73 ± 0.08^{e}	12	0.72 ± 0.08^{f}	11	0.85	1
Calciumgehalte (‰)	Terneuzen	364 ± 7	11	367 ± 2	7	359 ± 9	9
	Oesterdam	366 ± 4	12	366 ± 4	11	366	1
eibreuk (%)	Terneuzen	41^{g}	17	38^{h}	8	44	9
	Oesterdam	0^{g}	12	0^{h}	11	0	1

NB. Waarden met overeenkomende index zijn significant verschillend van elkaar (p≤0.05).

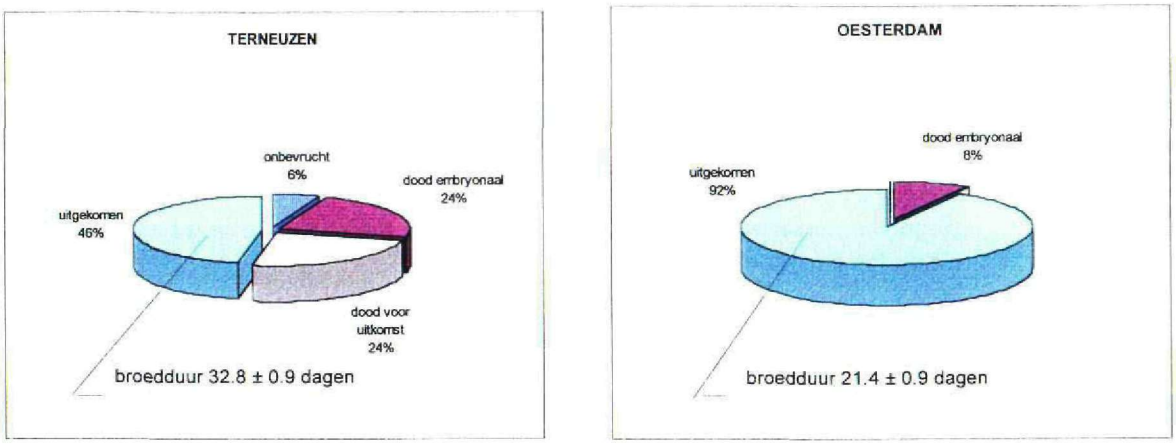
Broedsucces

Significant langere broedtijd en lager broedsucces bij de Terneuzen eieren.

Het uitkomstpercentage van de kunstmatig bebroede Terneuzen eieren was significant lager dan van de Oesterdam eieren. Van de kunstmatig bebroede Terneuzen eieren is 46% (8/17) uitgekomen. Eieren uit de referentie kolonie hadden een uitkomstpercentage van 92% (11/12) in het laboratorium (zie Fig. 3). De broedtijd tot uitkomen was 2.4 dagen langer (11%; voor de Terneuzen eieren dan voor de referentie eieren. Bij een gezamenlijke analyse van beide verzamelingen eieren (Terneuzen en Oesterdam) bleek dat broedduur significant positief gerelateerd was aan eigewicht (p<0.02), eilengte (p<0.05), en eivliesdikte (p<0.05) (zie Fig. 4). De broedduur bleek niet significant gerelateerd aan het eivolume.

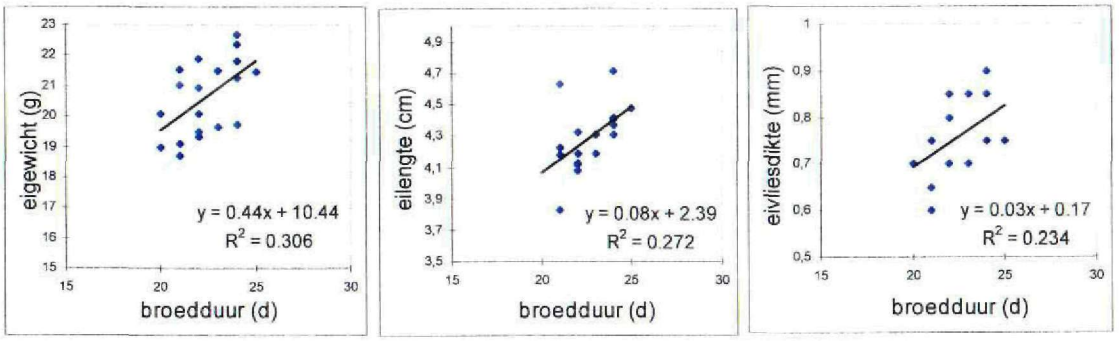
Figuur 3.

Broedsucces. Broedsucces van kunstmatig bebroede eieren uit Terneuzen (links; n=17) en uit de referentie kolonie Oesterdam (rechts; n=12).



Figuur 4.

Relaties tussen broedduur en eigrootte. Relatie tussen broedduur en eigewicht (links), eilengte (midden), en eivliesdikte (rechts), gebaseerd op alle uitgekomen eieren uit zowel Terneuzen als Oesterdam.



Biometrie van kunstmatig bebroede kuikens

Langere snavels bij kuikens uit kunstmatig bebroede eieren uit Terneuzen. Geen andere morfometrische afwijkingen van de referentiekolonie.

Het kuikengewicht en de afmetingen van de kop en de poot- en vleugelbotten van de kuikens uit de kunstmatig bebroede eieren uit de Terneuzen kolonie verschilt niet significant van die uit de referentie kolonie. Wel is een verschil waargenomen in snavellengte. Deze is 7% langer bij de Terneuzen kuikens in vergelijking met de referentie kuikens (p=0.003) (zie Tabel 5).

Tabel 5.

Biometrie van uitgekomen kuikens van kunstmatig bebroede eieren.

	Terneuzen	*n*	*Oesterdam*	*n*
kuiken (g)	*14.64 ± 1.37*	*8*	*14.67 ± 0.88*	*11*
kop (mm)	*3.10 ± 0.09*	*8*	*3.05 ± 0.24*	*11*
snavel (mm)	*1.01 ± 0.03[a]*	*8*	*0.94 ± 0.06[a]*	*11*
dijbeen (mm)	*29.71 ± 12.82*	*7*	*36.44 ± 8.93*	*9*
scheenbeen (mm)	*54.14 ± 19.54*	*7*	*67.82 ± 16.36*	*11*
handwortelbeen (mm)	*32.86 ± 14.88*	*7*	*41.64 ± 14.73*	*11*
humerus (mm)	*1.28 ± 0.05*	*6*	*1.34 ± 0.13*	*11*
ulna (mm)	*1.31 ± 0.07*	*6*	*.34 ± 0.24*	*11*

[a-a] Significant verschillend van elkaar; p=0.003

Hersendimorfie

Grotere mate van variatie in grootte tussen linker- en rechter-hersenhelft bij kuikens uit Terneuzen.

Uit de lengte, breedte en diagonaal metingen van de hersenhelften bleek dat bij de Terneuzen kuikens geen significant groter verschil tussen de linker en rechter hersenhelft aanwezig is dan bij de referentie kolonie. Wanneer echter het absolute verschil beschouwd wordt, waarbij geen rekening gehouden wordt met het feit of de linker of rechter hersenhelft de grootste is, blijkt dat er wel een significant verschil tussen de twee groepen aanwezig is. Zowel op basis van breedte, lengte als diagonaal is er bij de Terneuzen kuikens meer absolute variatie tussen hersenhelften dan bij de kuikens uit de referentie kolonie ($p<0.02$) (zie tabel 6). Ook is de dimorfie in breedte en diagonaal sterker aanwezig bij de niet uitgekomen eieren dan bij de wel uitgekomen eieren ($p\leq 0.01$) (zie Fig. 5).

Tabel 6.

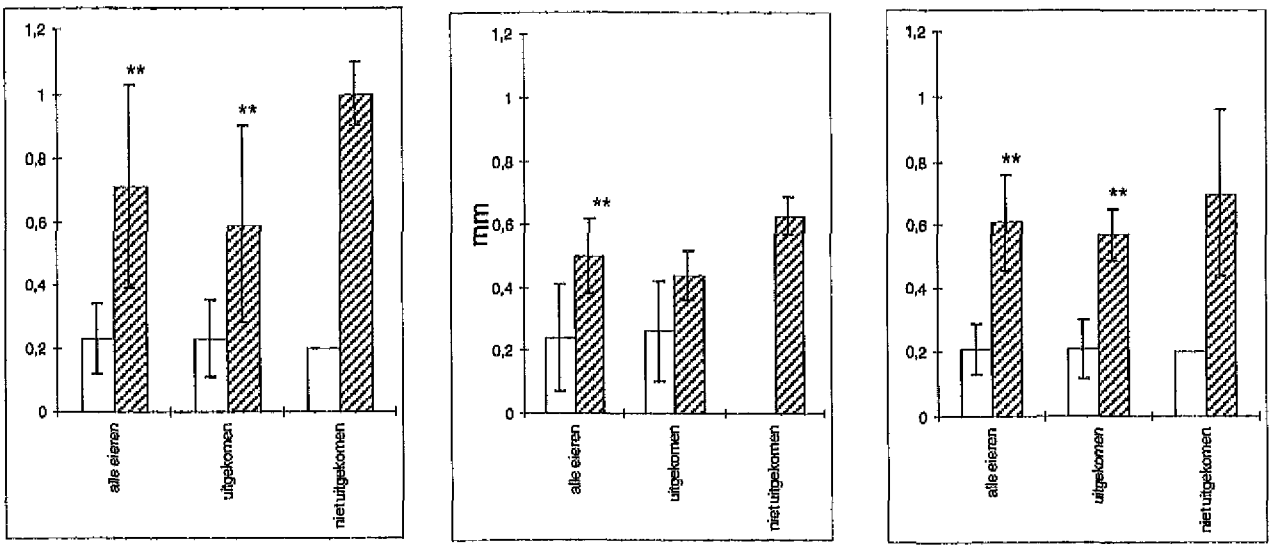
Hersenen. Hersengewicht en hersendimorfie. Verschil tussen linker en rechter hersenhelft bij vergelijking van breedte, diagonaal en hoogte. Zowel het gemiddelde van het nominale verschil (Links - Rechts) als het gemiddelde van het absolute verschil (|Links-Rechts|) is weergegeven. De gemiddelden zijn gebaseerd op analyse van hersenen van uitgekomen kuikens èn embryo's uit niet uitgekomen eieren (zie ook Fig. 5).

	Terneuzen	n	Oesterdam	n
gewicht (g)	0.60±0.03	8	0.61±0.04	10
Δbreedte (mm)	-0.05±0.81	10	-0.06 ± 0.25	11
Δdiagonaal (mm)	0.14 ± 0.52	10	0.07 ± 0.29	11
Δhoogte (mm)	0.07 ± 0.66	10	-0.01 ± 0.23	11
I Δ breedte (mm)	0.71 ± 0.32^{a}	10	0.23 ± 0.11^{a}	11
I Δdiagonaal (mm)	I 0.50 ± 0.12^{b}	10	0.24 ± 0.17^{b}	11
I Δhoogte (mm)	0.61 ± 0.15^{c}	10	0.21 ± 0.08^{c}	11

NB. $^{a\text{-}a}$ Significant verschillend van elkaar; p=0.02, $^{b\text{-}b}$ p=0.007, c-c p<0.0001

Figuur. 5.

*Hersendimorfie. Verschil in breedte (links), diagonaal (midden) en hoogte (rechts) (in mm) tussen linker en rechter hersenhelft bij visdiefkuikens uit Terneuzen en de Oesterdam. Significante verschillen zijn aangegeven met * als p≤ 0.05 en met ** als p≤0.01.*



Parasitaire infecties

Geen pathogenen aangetroffen in kuikens uit Terneuzen.

In geen van de elf onderzochte visdiefkuikens uit de Terneuzen kolonie zijn bloedparasieten aangetoond. In ruim de helft (55%) van de onderzochte dieren zijn veel macrofagen aangetroffen in de long. In een meerderheid van de kuikens (82%) waren de longen sterker rood gekleurd dan normaal. De nieren waren bij alle dieren minder sterk gekleurd dan normaal. De inhoud van de dikke darm was bij de meeste kuikens (82%) vochtig en slijmerig. Slechts in één kuiken is een normaal gevormde faeces aangetroffen. In de darmen zijn wisselende aantallen *Enterobacter agglomerans, Enterobacter spec., Aeromaonas spec., Escherichia coli, en Streptococcus spec.* aangetoond. Vooral de aantallen aangetroffen *aeromonas spec.* waren hoger dan gemiddeld. In de darmen zijn geen pathogenen aangetroffen.

(Histo)pathologie

lever

Geen leverafwijkingen gevonden.

Bij beoordeling van de levers zijn uitwendig en over een doorsnede macroscopisch geen pathologiën waargenomen. Het levergewicht van kuikens uit Terneuzen was niet afwijkend van referentie materiaal afkomstig uit de Oesterdam kolonie (respectievelijk 0.40±0.03 en 0.39±0.04 g).
Bij de microsopische beoordeling van de lever bleek op basis van een PAS/Best carmijn kleuring en een Prussian Blue kleuring bij geen van de coupes glycogeen of ijzerstapeling opgetreden te zijn. Bij beoordeling van de HE gekleurde coupes bleek eveneens geen verschil tussen de uitgekomen kuikens van de twee kolonies.

thymus

Geen afwijkingen in de thymus gevonden.

Op basis van de afmeting van de thymus, de verhouding tussen de cortex en de medulla en het aantal granulocyten in het weefsel, zijn geen verschillen waargenomen tussen visdiefkuikens (of voortijdig overleden embryo's) uit Terneuzen en uit de referentiekolonie op de Oesterdam.

bursa fabricius

Significant kleinere follikels en hogere mate van apoptose in de bursa fabricius bij visdieven uit Terneuzen.
Marginale afwijkingen in aantallen lymfocyten en granulocyten.

Bij microscopische beoordeling van de bursa fabricius bleek dat de follikelgrootte in Terneuzen significant kleiner was dan in de referentiekolonie (zowel op basis van alle individuen als op basis van alleen de uitgekomen kuikens). Wanneer van de bursa fabricius alleen de uitgekomen kuikens beschouwd worden blijkt er bij de visdieven uit Terneuzen naast een geringere omvang van de follikels, ook een significant ($p \leq 0.05$) verminderd voorkomen van apoptose in het centrum van de follikels. De lymfocyten infiltratie en het aantal granulocyten in de bursa uit visdieven van Terneuzen was gering afwijkend ($p \leq 0.1$) van de dieren uit de referentie kolonie (zie figuur 6).

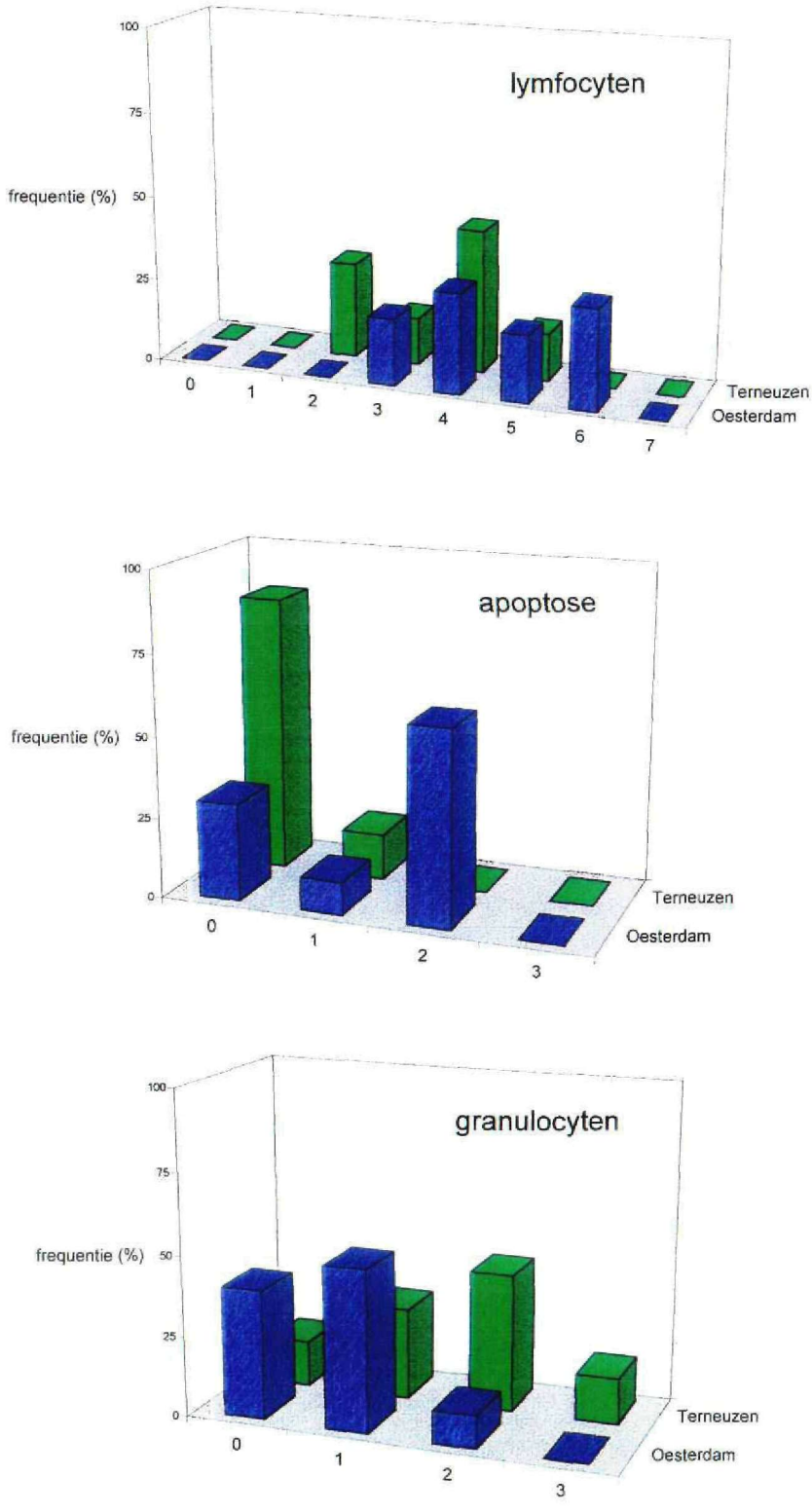
botvorming

Geen afwijkingen in botvorming.

De oesteoidvorming in kuikens uit Terneuzen was niet significant afwijkend van de referentiekolonie. In geen van de groepen is mineralisatie waargenomen.

Figuur 6.

Frequentieverdelingen van afwijkingen in de bursa fabricius van kunstmatig uitgebroedde kuikens uit de Terneuzen kolonie in vergelijking met kuikens uit de referentie kolonie (Oesterdam). Op de x-as staat de score, zoals beschreven in tabel 2. aangegeven. Op de y-as is de relatieve frequentie (in %) waarmee deze score optreedt aangegeven.



EROD activiteit

Overeenkomende maar marginale EROD activiteit in kuikens uit Terneuzen en uit de referentiekolonie.

De EROD activiteit, gemeten in de microsomale fracties van de levers van de net uitgekomen kuikens uit de Terneuzen kolonie bleek niet significant verhoogd ten opzichte van de Oesterdam kolonie. In beide kolonies was de activiteit echter minimaal. De eiwitgehalten van de opgewerkte microsomale fracties varieerden van 6 tot 16 µg/µl in beide groepen.

Tabel 11.

EROD activiteit. Ethoxyresorufine O-deethylase activiteit in microsomale fracties van de levers van visdiefkuikens.

	gemiddelde ± standaarddeviatie (pmol RES/min.mg eiwit)	***range (pmol RES/min.mg eiwit)***	***n***
Terneuzen	*3.1 ± 1.6*	*1.0 - 5.3*	*9*
Oesterdam	*5.7 ± 5.4*	*1.3 - 19*	*8*
*Oesterdam**	*4.0 ± 2.2*	*1.3 - 7.5*	*7*

Noot:

Oesterdam. Herberekende gemiddelden en range na uitsluiting van een enkele sterk afwijkende waarde met gemeten activiteit van 19 pmol/min.mg.*

Discussie

Slecht broedsucces in de Terneuzen kolonie lijkt niet veroorzaakt te worden door parasitaire infecties.

Wanneer de resultaten van het veldonderzoek beschouwd worden blijkt dat in 1997 in de Visdiefkolonie van Terneuzen zich wederom verschijnselen voordoen die sterke gelijkenis vertonen met de in 1994 en 1996 waargenomen afwijkingen. Het broedsucces in de Terneuzenkolonie was nihil. Eieren kwamen niet uit en vertoonden rottingsverschijnselen, wel uitgekomen kuikens vertoonden evenwichtsstoringen en hadden vaak bloedingen aan poten en vleugels en stierven uiteindelijk. Uit een gering aantal nesten zijn wel normale jongen voortgekomen. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat deze verschijnselen veroorzaakt werden door infectieziekten. Een goede vergelijking met het broedsucces in de referentie kolonie is niet te maken, omdat bij de Oesterdam de gehele kolonie in de loop van de onderzoeksperiode verdwenen is als gevolg van predatie door Kokmeeuw en mogelijk ook Kauwen en Zwarte Kraaien. De Visdief jongen die wel uit het ei gekomen zijn (en in een later stadium ook gepredeerd zijn) vertoonden echter geen verschijnselen zoals in de Terneuzen kolonie waargenomen zijn.

Intrinsieke factoren in het ei spelen een rol bij het veroorzaken van de embryonale sterfte.

Bij de uit de kolonies verzamelde en in het laboratorium kunstmatig uitgebroede eieren, bleek wel een significant verschil in broedsucces tussen Terneuzen en de Oesterdam. Het uitkomst percentage in deze twee groepen was respectievelijk 46% en 92%. Ook was de vereiste broedduur voor de Terneuzen eieren 11% (2.4 dagen) langer dan voor de Oesterdam eieren. Van de niet uitgekomen Terneuzen eieren bleek de helft van de embryo's wel volledig ontwikkeld maar had de eischaal niet aangepikt. Een evenredig groot deel had de eischaal aangepikt maar is daarna overleden. Een mogelijke verklaring voor de langere broedduur of het niet uitkomen is dat bij de embryo's de (hormonale) prikkelingen die hen aanzetten tot uitkomen verstoord zijn. Omdat de broedomstandigheden voor beide groepen gelijk waren, moet de oorzaak van de verschillen tussen beide kolonies in het ei gezocht worden. Mogelijke factoren zijn afwijkingen in de eischaal of de aanwezigheid van embryotoxische verbindingen of verbindingen die de hormoonhuishouding in het embryo verstoren.

Afwijkingen in de eischaal veroorzaken mogelijk de waargenomen effecten.

Van de eieren die voor kunstmatige bebroeding en toxicologisch onderzoek verzameld waren, bleken de eieren afkomstig uit Terneuzen gemiddeld groter, hadden een 5% dikkere eischaal en een 10% dikker eivlies ($p \leq 0.05$). Van de Terneuzen eieren waren het juist de niet uitgekomen eieren die een dikkere eischaal hadden in vergelijking met de Oesterdam (zowel uitgekomen als niet uitgekomen eieren). Deze gegevens duiden op een beïnvloeding van het broedsucces door de eischaaldikte, waarbij een dikke eischaal mogelijk de gasuitwisseling verstoord. Een dikkere eischaal was niet gecorreleerd met meer eibreuk. De eieren uit Terneuzen vertoonden significant ($p \leq 0.01$) meer eibreuk dan de eieren uit Oesterdam (resp. 45% en 0%). Binnen de Terneuzen groep was eibreuk echter niet significant gecorreleerd met het wel of niet uitkomen van de eieren (resp. 38% en 44% eibreuk). Ook het calciumgehalte van de eischalen was niet verschillend tussen de Terneuzen en Oesterdam groep, of tussen de wel en niet uitgekomen eieren. Wat niet onderzocht is, maar mogelijke wel een verklaring is voor

de gevonden verschillen, is een afwijkende eiwitstructuur die de samenhang van de eischaal kan beïnvloeden. Verondersteld wordt dat hierdoor een verhoogde kans op eibreuk optreedt welke niet gerelateerd is aan de eischaaldikte.
Bij de kuikens die in het laboratorium uit het ei gekomen zijn geen ziekte verschijnselen geconstateerd zoals in het veld waargenomen. Bij een vergelijking tussen de beide kolonies op basis van de lichaamsgewichten en de maten van kop, dijbeen, scheenbeen, handwortelbeen, humerus, en ulna van de kunstmatig uitgebroede kuikens zijn geen verschillen waargenomen. Wel bleken de snavellengte van de Terneuzen kuikens 7% langer ($p \leq 0.01$). Omdat mannelijke individuen gemiddeld een langere snavel hebben dan vrouwelijke en de geslachtsverhoudingen in de onderzochte groepen niet bekend zijn, kan aan dit resultaat geen conclusie verbonden worden.

Afwijkingen in de hersenen.

Bij beschouwing van de asymmetrie tussen de linker en rechter hersenhelft bleek een toenemende absolute asymmetrie in de volgorde Oesterdam - Terneuzen uitgekomen - Terneuzen niet uitgekomen. Dit verschil is niet waargenomen op basis van het nominale verschil. Dit duidt dus op een toenemende asymmetrie zonder dat er sprake is van een vervorming van een bepaalde hersenhelft. De afwijkingen kwamen gelijkmatig voor bij de linker en de rechter hersenhelft. Deze resultaten duiden op een neurotoxisch effect waarbij afwijkingen in de hersenen mogelijk verband houden met het slechte broedsucces in de Terneuzen kolonie. Door Henshel en medewerkers (1993, 1996) is aangetoond dat onder invloed van TCDD een asymmetrische ontwikkeling van de hersenen optreedt. Zij vond echter wel een links-rechts specifiek effect.
Wanneer er sprake is van blootstelling aan TCDD of structuurverwante stoffen zoals PCDD's, PCDF's en PCB's wordt op grond van resultaten van voorgaand onderzoek aan natuurlijke populaties van visetende vogels verwacht dat een inductie van de cytochroom P450 1A geassocieerde EROD activiteit in de lever optreedt (Bellward 1994, Bosveld *et al.* 1995, Sanderson *et al.* 1994a,b). Een dergelijke verhoging is echter niet geconstateerd bij de Terneuzen kuikens ten opzichte van de Oesterdam kuikens waar de gemiddelde EROD activiteit respectievelijk 3.1±1.6 en 4.0±2.2 pmol/min.mg was. De in dit onderzoek gemeten EROD activiteit is echter tot 100 x lager dan de EROD activiteit die in vergelijkbaar materiaal in eerder onderzoek aan visdieven gemeten is. De oorzaak van deze geringe activiteit is niet bekend. Inhibitie van de enzymactiviteit door milieuverontreinigende stoffen is een mogelijkheid, maar is niet waarschijnlijk omdat in zowel de Terneuzen als de Oesterdam visdieven de activiteit laag was. Dit laatste duidt mogelijk op een procedure fout.

Afwijkingen in het immuunsysteem.

Uit de microscopische beoordeling van weefsels van vroegtijdig overleden embryo's en normaal uitgekomen kuikens bleek dat in de bursa fabricius bij de Terneuzen vogels een aantal afwijkingen optraden ten opzichte van de referentie kolonie. Deze vertoonden significant kleinere follikels en significant minder apoptose in de follikelkernen. Dit beeld duidt op een relatief onderontwikkeld immuunsysteem. De waargenomen (maar niet significant aantoonbare) afname in lymfocyten infiltratie ($p = 0.06$) en ontbrekende cortexformatie ($p = 0.08$) in de follikels van de dieren uit Terneuzen wijst eveneens in deze richting. De verhoogde aantallen granulocyten in de Terneuzen kuikens duiden op de aanwezigheid van een (ongewenste) grond voor afweer/opruimingsreacties.

Naast de afwijkingen in de mate van ontwikkeling van het immuunsysteem zijn er geen duidelijke (histo)pathologiën waargenomen in de dieren uit Terneuzen. De levers van de Terneuzen Visdieven vertoonden geen macroscopisch waarneembare pathologiën en waren ook niet afwijkend in gewicht. Microscopische beoordeling van de levers duidde ook niet op afwijkingen behalve een marginale ($p=0.1$) toename van vacuolisatie in de levercellen. Ook in de thymus en in de botten zijn geen afwijkende structuren aangetoond.

CONCLUSIE

In de visdiefkolonie bij Terneuzen was het broedsucces in 1997, evenals in 1996 en 1994 nihil. Een groot deel van de gelegde eieren kwam niet uit. De eieren die wel uitkwamen resulteerden veelal in kuikens met afwijkingen zoals evenwichtsstoornissen, verkleefde veren, ontstekingen aan ogen en (inwendige) bloedingen aan vleugels, poten en kop. Ook was bij een aantal uitgekomen kuikens de dooier nog niet geheel ingesloten in de buikholte. Infectieziekten lijken niet de oorzaak van de waargenomen verschijnselen.

Kunstmatige bebroeding van eieren was voor de Terneuzen kolonie significant minder succesvol dan voor de Oesterdam kolonie. De vereiste broedduur was 2.4 dagen langer en er kwamen uiteindelijk 46% minder eieren uit. Eieren uit de Terneuzen kolonie vertoonden significant meer schaalbreuk, maar de eischaal en het eivlies van deze eieren was dikker.

Uit de resultaten van de kunstmatige bebroeding kan geconcludeerd worden dat het slechte broedsucces zoals waargenomen in de kolonie bij Terneuzen gedeeltelijk veroorzaakt wordt door afwijkingen in de eischaal of embryotoxische effecten van in het ei aanwezige verbindingen.

De afwijkingen in de eischaal die een verhoogde kans op schaalbreuk en mogelijk problemen met de gasuitwisseling veroorzaken berusten niet op een afwijkende schaaldikte of afwijkend calciumgehalte.

Uit (histo)pathologisch onderzoek bleek een mogelijk verminderde immuunfunctie uit afwijkingen in de bursa fabricius. Deze verminderde immuunfunctie kan echter niet gerelateerd worden aan een verhoogd optreden van infecties bij vogels uit Terneuzen. In de overige organen, lever, nieren, schildklier, GALT, thymus, en bot, zijn geen afwijkingen gebleken die verklarend voor het lage broedsucces kunnen zijn. Wel is een sterkere mate van hersendimorfie gevonden bij de kuikens uit Terneuzen. Dit duidt op een verstoorde ontwikkeling van het centrale zenuwstelsel met mogelijke gevolgen voor de sturing van fysiologische processen die de ontwikkeling en het uitkomen van eieren induceren.

De door het cytochroom P450 1A gekatalyseerde EROD activiteit in de microsomale fracties van de lever bleken niet verhoogd in de Terneuzen kuikens. Een dergelijke verhoging wordt meestal wel waargenomen wanneer er sprake is van een verhoogde blootstelling aan dioxine-achtige stoffen. Aan deze resultaten kan echter geen conclusie verbonden worden daar een fout in de procedure niet uitgesloten kan worden.
Uit de hierboven samengevatte resultaten kan geconcludeerd worden dat de oorzaak van het slechte broedsucces bij Visdieven in de Terneuzen kolonie gezocht moet worden in de samenstelling van de eischaal en de mogelijke aanwezigheid van nog onbekende milieuvreemde stoffen in het ei.

AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK

Om een duidelijker beeld van eventuele chemische oorzaken van het slechte broedsucces bij de Visdieven uit Terneuzen te krijgen wordt voorgesteld om het reeds verzamelde materiaal van lever, dooier en plasma te analyseren. In eerste instantie moet hierbij gekeken worden naar bekende stoffen zoals PCDD's, PCDF's, PCB's, PAK's, organochloor pesticiden (o.a. HCB, DDT en derivaten) en zware metalen. In tweede instantie moet gezocht worden naar sterke afwijkingen in concentraties van (mogelijk nog onbekende) stoffen in het materiaal uit Terneuzen. Daarnaast wordt voorgesteld om extracten van de biologische fracties te analyseren in verschillende bioassays. Enerzijds in stofgerichte bioassays die specifiek zijn voor Ah-receptor agonisten (bijv. DRE-CALUX assay) en voor estrogeen-receptor agonisten (bijv. ER-CALUX assay). Anderzijds in algemene toxiciteit assays zoals de kippenembryo assay waarbij het extract ingespoten wordt in een ei en het effect op de embryonale ontwikkeling beoordeeld wordt. Met dit laatste assay valt uitsluitsel te geven over de vraag of de fitness van het embryo rechtstreeks door lichaamsvreemde stoffen verzwakt wordt, of dat de oorzaak van het niet uitkomen gelegen is in bijv. (de aanleg van) de eischaal.

In de studie zoals nu uitgevoerd konden essentiële effectparameters zoals enzymfuncties en histopathologische afwijkingen alleen bij de uitgekomen kuikens gemeten worden. Hierdoor is de onderzoeksgroep beperkt tot de 'sterkste' individuen uit de groep. Dit geeft mogelijk een verkeerd beeld van de gemiddelde status van de kuikens uit een kolonie. Om dit te vermijden en omdat het merendeel van de niet uitgekomen kuikens wel volgroeid waren, wordt voorgesteld om in een volgend effectonderzoek bij kunstmatig uitgebroede vogels een deel van de embryo's aan het eind van de ontwikkeling maar vóór het uitkomen uit het ei te halen om eventuele effecten te kunnen beoordelen.

Daar de resultaten van het onderzoek duiden op problemen met de gasuitwisseling bij embryo's in de eieren van Terneuzen, wordt voorgesteld om in het broedseizoen van 1998 een vergelijkende studie uit te voeren waarin de O_2/CO_2 uitwisseling en het vochtverlies van de eieren gemeten wordt en de concentratie-effect relatie geanalyseerd wordt voor deze effecten en de concentratie van de stof die als mogelijke veroorzaker geïdentificeerd is met bioassays en chemische analyses zoals hierboven voorgesteld.

LITERATUUR

Bellward, G.D., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., Elliott J.E., Bandeira, S.M., Dworschak, C., Chang, T., Forbes, S., Cadario, B., Hart, L.E. & Cheng, K.M. 1990b.

Comparison of polychlorinated dibenzodioxin levels with hepatic mixed-function oxidase induction in great blue herons. J.Toxicol. Environ. Health 30:33-52.

Bosveld A.T.C., de Bie P.A.F., Weggemans J., Jansman H.A.H. & Immerzeel J. 1997

Altered cytochrome P450 activities and testosterone metabolism in white toothed shrews (Crocidura russula) exposed to benzo[a]pyrene. Chemosphere in press.

Bosveld, A.T.C., Gradener, J., Murk, A.J., Brouwer, A., Van Kampen, M., Evers, E.H.G. & Van den Berg, M. 1995.

Effects of PCDDs, PCDFs and PCBs in common tern (Sterna hirundo) breeding in estuarine and coastal colonies in the Netherlands and Belgium. Environ. Toxicol. Chem. 14:99-115.

Brunström, B. 1990.

Toxicity and EROD-inducing potency of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in avian embryos. *Comp. Biochem. Physiol. 100C*:241-243.

Brunström, B. & Andersson, L. 1988

Toxicity and 7-ethoxyresorufin O-deethylase-inducing potency of coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in chick embryos. Arch. Toxicol. 62:263-264.

Brunström, B. & Reutergardh, L. 1986.

Differences in sensitivity of some avian species to the embryotoxicity of a PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, injected into the eggs. Environ. Pollut. Ser. A. 42:37-45.

Fox, G.A., Gilman, A.P., Peakall, D.P. & Anderka, F.W. 1978.

Behavioral abnormality of nesting Lake Ontario herring gulls. J. Wildl. Manage. 42:477-483.

GENSTAT. 1987.

GENSTAT 5 Reference Manual. GENSTAT 5 Committee. Clarendon Press, Oxford, UK. 749 p.

Henshel, D.S., Cheng, K.M., Norstrom, R.J., Whitehead, P. & Steeves, J.D. 1993.

Morphometric and histological changes in brains of great blue heron hatchlings exposed to PCDDs: preliminary analysis. In: Landis, W., Hughes, W. and Lewis, M.A., eds. First Symposium on Environmental Toxicology and Risk Assessment: Aquatic, Plant, Terristrial. ASTM STP No. 1179:288-303.

Henshel D.S., Martin J.W., Best D, Cheng K.M., Elliott J.E. Rosenstein D & Sikarskie J. 1996.

Evaluating gross brain asymmetry: A potential biomarker for 2,3,7,8-TCDD related neurotoxicity. Environmental Toxicology and Risk Assessment: Biomarkers and Risk Assessment - Fifth volume, ASTM STP 1306, David A. Bengston and Diane S. Henshel, Eds., American Society for Testing and Materials, 1996.

Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Sileo, L., Docherty, D. & Kubiak, T.J. 1987.

Embryotoxicity, teratogenicity, and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in forster's terns on Green Bay, Lake Michigan. Environ. Res. 42:176-184.

Hoffman, D.J., Smith, G.J. & Rattner, B.A. 1993.

Biomarkers of contaminant exposure in common terns and black-crowned night herons in the Great Lakes. Environ. Toxicol. Chem. 12:1095-1103.

Kubiak, T.J., Harris, H.J., Smith, L.M., Schwartz, T.R., Stalling, D.L., Trick, J.A., Sileo, L., Docherty, D.E. & Erdman, T.C. 1989.

Microcontaminants and reproductive impairment of the forster's tern on Green Bay, Lake Michigan-1983. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18:706-22.

Murk, A.J., Spenkelink, A., Brouwer, A., Van Kampen, M., Bosveld, A.T.C., Gradener, J. & Van den Berg M. 1993.

Effects of PCBs, PCDDs and PCDFs on reproductive success, and morphological, physiological and biochemical parameters in chicks of the Common tern (Sterna hirundo): Part II, laboratory study. Report no. DGW-93.011. Ministery of Transport, Public Works and Water Management, National Institute for Coastal and Marine Management/RIKZ, The Hague, the Netherlands.

Peakall, D.B. & Peakall, M.L. 1973.

Effects of a polychlorinated biphenyl on the reproduction of artificially and naturally incubated dove eggs. J. Appl. Ecol. 10:863-868.

Reijnders P.J.H. 1986.

Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. Nature 324: 456-457.

Ross, P.S., De Swart, R.L., Reijnders, P.J.H., Van Loveren H., Vos, J.G., & Osterhaus, A.D.M.E. 1995.

Contaminant-related suppression of delayde-type hypersensitivity and antibody responses in harbour seals fed herring from the Baltic Sea. Environ Health perspect 103:162-167.

Rossaert, G., Dirksen, S., Boudewijn, T.J., Meire, P.M., Ysebaert, T., Evers, E.H.G. & Meininger, P.L.. 1993.

Effects of PCBs, PCDDs and PCDFs on reproductive success and morphological, physiological and biochemical parameters in chicks of the Common tern (Sterna hirundo): Part I, field study. Tidal Waters Division, Report DGW-93.010. The Hague, The Netherlands.

Sanderson, J.T., Elliott, J.E., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., Hart, L.E., Cheng, K.M. & Bellward G.D. 1994a.

Monitoring biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in great blue herons chicks (Ardea heroidias). J. Toxicol. Env. Health 41:435-450.

Sanderson, J.T., Norstrom, R.J., Elliott, J.E., Hart, L.E., Cheng, K.M. & Bellward G.D. 1994b.

Biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in double-crested cormorant chicks (Phalacrocorax auritus). J. Toxicol. Env. Health 41:247-265.

Bijlagen

1. Chronologisch overzicht van de veldactiviteiten en waarnemingen in het broedseizoen van 1997.

TERNEUZEN:

14 mei (FA): c. 40 Visdieven aanwezig in de kolonie. Vogels zittend in kuiltjes, maar nog geen nesten met eieren. Diverse baltsende paren (aanbieden visjes).

21 mei (PAW): 30 1e Visdiefeieren gemerkt. Drie nesten van Kokmeeuw aanwezig, waarbij twee dode, gepredeerde adulten (blijkbaar op het nest gevangen en gedood, rug sterk aangevreten; ook hersens opgegeten; mogelijk door [Rans?]uil.

28 mei (PAW): Enkele tientallen nesten van Visdief aanwezig. Controle reeds gemerkte nesten. 17 nog resterende 1e eieren verzameld en vervoerd naar IBN-DLO te Arnhem. De overige 1e eieren bleken verdwenen, vermoedelijk door predatie door Kokmeeuw (3 nesten aanwezig).

3 juni (PAW, FA, PLM, Rob Strucker, Cor Berevoets, Aylin Erkman): Volledige controle + nieuwe nesten gemerkt. Nu 145 nesten aanwezig. Nog geen jongen. Kolonie ingegaasd en enclosure aangebracht. Geen indicatie voor predatie.

12 juni (PAW, FA, PLM, Nico van den Brink IBN-DLO). Alleen controle van enclosure. In 2 rondes met 12 kooien totaal 15 volwassen vogels gevangen t.b.v. bloedmonsters. Eieren gemeten in enclosure.

18 juni (PAW & PLM): Volledige controle + nieuwe nesten gemerkt. De eerste 12 jongen geringd. Drie kleine dode jongen in enclosure. Van de 15 levende jongen (alle <3 dagen) hadden er drie kleine onderhuidse bloedingen op tarsus en/of plekjes op de tenen, één jong met bloedend wondje op de bovenrug. Veel kleine Kleverig kruiskruid plantjes. De jongen voelen een beetje kleverig.

20 juni (PAW): Vrijwel volledige controle. Algemene indruk slecht: veel blijkbaar verlaten legsels, veel jongen dood of met gebreken, met name kleine onderhuidse bloedingen aan poten en vleugels. Veel jongen stervend of zwak met evenwichtstoornissen, ontstoken ogen etc. Na telefonisch overleg (per mobiele telefoon) tussen PAW, PLM, Dick Vethaak en Bart Bosveld besloten dat PAW direct stervende jongen (20) en enkele kippende eieren (6) verzamelt en naar IBN-DLO in Arnhem brengt. Enkele nesten lijken het wel goed te doen.

24 juni (PAW): Enclosure en grootste deel van de kolonie gecontroleerd. Wederom veel dode pullen (14 verzameld), niet-uitgekomen eieren. Vijf slechte jongen geringd. In de enclosure drie geringde jongen van bekende nesten gewogen en gemeten.

1 juli (PAW): Volledige controle (enclosure en kolonie) 5 nieuwe legsels. In de kolonie slechts 1 jong (1 dag oud). Veel 'verdacht oud' uitziende eieren. In en rond de kolonie zijn nog c. 150 adulten aanwezig, vele met kleine vis en regelmatig baltsend naar andere adulten. In de kolonie 1 vliegvlugge juveniele Kokmeeuw.

4 juli (PLM, Dick Vethaak e.a.): Onvolledige controle. Enkele relatief verse eieren verzameld. Eén net uitgekomen pullus met gezwel aan achterlijf verzameld.

10 juli (PAW): Volledige controle (enclosure en kolonie) 15 nieuwe legsels. Ook ditmaal slechts 1 jong (1 dag oud). Meerdere rotte of verdacht oud uitziende eieren. In en rond de kolonie zijn nog c 60 adulten aanwezig. De begroeing is inmiddels 40 cm hoog en alle nieuwe nesten liggen in het kale middendeel of langs de onbegroeide randen.

19 augustus (PAW): Kolonie geheel verlaten. Geen dode jongen of andere sporen gevonden.

17 september (PAW, PLM, FA): Gaas opgeruimd en afgevoerd. Ondanks enig zoekwerk geen oude dode jongen in de kolonie aangetroffen.

OESTERDAM:

13 mei (PAW & PLM). Vier nesten van Visdief gevonden; tientallen baltsende exemplaren.

16 mei (PAW): slechts twee 1e eieren gemerkt.

19 mei (PAW): 10 1e eieren gemerkt; tevens vijf 2-legsels aanwezig.

20 mei (PAW): nog 9 1e eieren gemerkt; 1e controle van gemerkte nesten.

28 mei (PAW & FA). Twaalf 1e eieren verzameld en door PAW naar IBN-DLO in Arnhem gebracht. Volledige controle van nesten en in totaal nu 96 gemerkte nesten aanwezig. Enkele honderden jonge Kluten van enkele dagen oud aanwezig. Enkele Kauwen (4) aanwezig in kolonie.

30 mei (PAW & PLM). Ruim 50 jonge Kluten geringd. Predatie van jonge Kluten door Zilvermeeuw waargenomen.

2 juni (PAW, FA, PLM, Cor Berrevoets, Rob Strucker, Fred Cottaar). Volledige controle. 38 nieuwe Visdieflegsels gemerkt + nog 83 niet-gemerkt. In totaal 217 legsels aanwezig. In hart van Visdiefkolonie hebben zich recentelijk c. 45 paar Kokmeeuwen 'ingevochten'. Nog weinig sporen van predatie op eieren. Wel weer predatie van Zilver- en Kleine Mantelmeeuw op jonge Kluten.

9 juni (PLM, FA, Nico van de Brink). 14 Volwassen vogels gevangen voor bloedmonsters. De eerste 4 jongen geringd. Sinds het begin nu in totaal 77 legsels mislukt. Nog 45 gemerkte nesten met inhoud, waarvan 7 nieuwe. In het (zuidelijk) deel met Kokmeeuwen veel gepredeerde visdiefeieren (schalen en struif in nesten).

13 juni (PLM & FA). Alle gemerkte nesten in zuidelijke deel zijn nu gepredeerd, met struif en schalen in of nabij nest. Enkele tientallen kokmeeuwnesten met eieren en/of kleine pulli (maximaal 1 week). Ook bij Kokmeeuw duidelijk predatie. Predatie mogelijk

door Kauw en Zwarte Kraai. Op noordelijke deel ('kluteneiland') weinig predatie van Visdieven, daar c 25 pullen. Een deel van de eerder mislukte vogels lijkt zich nu hier te hebben gevestigd.

16 juni (FA, PLM, PAW). Floor Arts nam tussen 11:30 en 14:00 waar nabij kolonie. Twee Zwarte Kraaien vlogen direct weg om niet terug te komen. Enkele visdiefnesten met eieren en kleine jongen. Waargenomen dat Kokmeeuw eieren predeerde. Op de oostpunt van noordelijke deel ('kluteneiland) nu ook gepredeerde visdiefnesten.

26 juni (FA). Visdief en Kokmeeuw: alle nesten en jongen zijn gepredeerd. Daarnaast enkele nesten (met name van Strandplevier en Dwergstern) weggespoeld door zware regen. Nu ook geen Visdieven meer aanwezig.

NB. Gebruikte initialen voor personen verantwoordelijk voor observaties: FA= Floor Arts, (Bureau Waardenburg), PLM= Peter Meiniger (RIKZ), NvdB= Nico van den Brink (IBN-DLO), PAW= Pim Wolf (DPM).

2.Lijst van figuren en tabellen

Figuren

1 Locatie van de Terneuzen kolonie. 10
2 Morfometrie van de hersenen. 13
3 Broedsucces. 19
4 Relaties tussen *broedduur en eigrootte*. 19
5 Hersendimorfie. 20
6 Frequentieverdeling histopathologische afwijkingen 23

Tabellen

1 Aantallen broedparen en broedsucces van de visdief in de belangrijkste kolonies langs de Westerschelde. 7
2 Clasificatie van histopathologische waarnemingen. 15
3 Broedbiologische parameters. 17
4 Eieren: volume, gewicht, schaaldikte, vliesdikte en calciumgehalte. 18
5 Biometrie van de uitgekomen kuikens van kunstmatig bebroede eieren. 19
6 Hersenen. 20
7 Histopathologische effecten 22
8 EROD activiteit. 24

Het bestellen van IBN-rapporten

IBN-rapporten kunnen besteld worden door overschrijving van het verschuldigde bedrag op gironummer 94 85 40 of banknummer 53.91.05.988 van het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN-DLO) te Wageningen.
Vermeld op de overschrijving het nummer van het gewenste IBN-rapport (en naam en afleveradres als die afwijken van de naam en adres op de overschrijving).
Gebruik geen verzamelgiro omdat het adres van de besteller anders niet op onze bijschrijving komt. Het bestelde kan dan niet worden toegezonden.
Onderstaande lijst vermeldt alleen de rapporten die in 1997 en 1998 zijn verschenen. Een volledige lijst is op aanvraag gratis verkrijgbaar.

255 G.W.W. Wamelink, H.F. van Dobben, J.R.M. Alkemade & J. Wiertz 1997. Maaigevoeligheid van de Nederlandse flora; aanvulling van de door Briemle & Ellenberg (1994) geschatte indicatiegetallen. 55 p. f 41,50
256 G.J. Nabuurs, K. Kramer & G.M.J. Mohren 1997. Effecten van klimaatverandering op het Nederlandse bos en bosbeheer. 55 p. f 48,-
257 M.E.A. Broekmeyer & A.P.P.M. Clerkx 1997. Vegetatie en bosstructuur van het bosresevaat De Zwarte Bulten. 77 p. f 45,-
258 W.K.R.E. van Wingerden, F.A. Bink, D.A. Jonkers, F.J.J. Niewold & A.L.J. Wijnhoven 1997. Gedomesticeerde grote grazers in natuurterreinen en bossen: een bureaustudie. II. De effecten van begrazing. 128 p. f 51,50
259 J. Verboom, P.C. Luttikhuizen & J.T.R. Kalkhoven 1997. Minimumarealen voor dieren in duurzamepopulatienetwerken. 49 p. f 31,50
260 P.A.M. Visschedijk 1997. Kaarten recreatiegebieden compensatiebeginsel. 72 p. f 41,50
261 G.M. Dirkse 1997. Vegetatiekartering van de Schinveldse bossen en de Brunssummerheide in 1996. 100 p. f 47,50
262 P.J.M. Bergers 1997. Versnippering door railinfrastructuur; een verkennende studie. 68 p. f 40,-
263 T. Schavemaker, N. Brink, J.W.M. Langeveld, E. Murris, J. Nieuwenhuis & K. Vos 1997. Onderzoek naar de plaats van het groene vakgebied binnen de gemeentelijke organisatie. 35 p. f 31,50
264 A.H.J. Segeren & P.A.M. Visschedijk 1997. Het recreatief gebruik van SBB-terreinen in de regio Brabant-West. 79 p. f 40,-
265 J. van Asten, A. Augustijn-van Buren, B.J. Galjaard, D.A. van der Heij, C. Jochemsen, H.D. van der Kamp & J. van Reijendam 1997. Groencompensatie in de gemeenten; startnotitie. 31 p. f 31,50

266 M.E. Sanders, A.M. Schmidt, A.J. Griffioen & G. van Wirdum 1997. Kartering van de vegetatiestructuur van de Weerribben. 78 p. f 57,-

267 H. Koop, L.J. van Os & A.P.P.M. Clerkx 1997. Start monitoring omvormingsbeheer Staphorst. 55 p. f 42,-

268 N.H. Edelenbosch & R.A.M. Schrijver 1997. Ex-ante-evaluatie van bosuitbreiding door agrariërs; de haalbaarheid van het bebossingsbeleid op landbouwbedrijven. 125 p. f 50,-

269 H.J.M. Goverde, J. Wisserhof, E.K. Dijkstra & R.A.M. Tilmans 1997. Bestuurlijke Evaluatie Strategische Groenprojecten Natuurontwikkeling. 118 p. f 50,-

270 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van de Grove den en de Corsicaanse den in Nederland. 91 p. f 40,-

271 J.K. van Raffe, P.J.W. Hinssen, N.W.J. Borsboom & H.G. Six Dijkstra 1997. Instrumentarium bosbedrijfsvoering; een onderzoek naar de beschikbaarheid van en de behoefte aan computerprogrammatuur ter ondersteuning van de bedrijfsvoering van Nederlandse bosbedrijven. 71 p. Supplement. 56 p. Deze twee delen zijn niet afzonderlijk te bestellen. f 50,-

272 J.B. den Ouden, M.E.A. Broekmeyer & H.G.J.M. Koop 1997. A-locatie bossen in Overijssel; kenschets, beoordeling en adviezen met betrekking tot behoud en ontwikkeling van relicten van inheemse bosgemeenschappen in de provincie Overijssel. 229 p. f 70,-

273 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van Japanse lariks, Abies grandis en Tsuga heterophylla in Nederland. 68 p. f 40,-

274 D.M. Pronk, T.A. de Boer & H.W.J. Boerwinkel 1997. Aantrekkingskracht van parken op stadsniveau. 129 p. f 53,-

275 K.S. Dijkema, N.M.J.A. Dankers, G.J.M. Wintermans, J.C.A.M. Bervaes & D.C. van der Werf 1997. Compensatie voor gaswinning in het grensgebied met de Waddenzee: visie op een rol voor natuurontwikkeling. 55 p. f 41,50

276 K.S. Dijkema, N.M.J.A. Dankers, G.J.M. Wintermans, J.C.A.M. Bervaes & D.C. van der Werf 1997. Bodemdaling en waterhuishouding in Groningen: visie op een grotere rol voor natuurontwikkeling. 41 p. f 31,50

277 F.J.J. Niewold 1997. De fauna van het Dwingelderveld: recente ontwikkelingen en een faunabeheerplan. 98 p. f 40,-

278 C.L.M. Spinnewijn & T.A. de Boer 1997. 'Water trekt'; een kwalitatief onderzoek naar gebruik en beleving van het water in de Waterwijk in Almere. 75 p. f 50,-

279 A.P.P.M. Clerkx & M.E.A. Broekmeyer 1997. Bosdynamiek in Noordhout; tien jaar monitoring van een Wintereiken-Beukenbos. 95 p. f 50,-

280 J.K. van Raffe 1997. Handleiding Tactic; een computerprogramma voor de tactische bosbedrijfsplanning. 46 p. f 30,-

281 P.A. Slim & H.F. van Dobben 1997. De baten van vegetatiebeheer. 59 p. f 41,50

282 J.C.A.M. Bervaes, D.M. Pronk & T.A. de Boer 1997. Recreatie in de Dordwijkzone. 115 p. f 51,50

283 I.M. Bouwma & A.F.M. Olsthoorn 1997. Weerstandsverhogende maatregelen in bossen. 67 p. f 40,-

284 I.M. Bouwma & A.F.M. Olsthoorn (red.) 1997. Trends in het ecologisch functioneren van bossen. 77 p. f 45,-
285 C.B. Bussink, E.A.P. Wieman & A.F.M. Olsthoorn 1997. Verwachting en knelpunten van kleinschalig bosbeheer; een enquête onder boseigenaren en bosbeheerders. 144 p. f 51,50
286 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van de fijnspar en de Sitkaspar in Nederland. 79 p. f 41,50
287 J.G. de Molenaar, D.A. Jonkers & R.J.H.G. Henkens 1997. Wegverlichting en natuur; I. Een literatuurstudie naar de werking en effecten van licht en verlichting op de natuur. 293 p. f 70,-
288 A.P.P.M. Clerkx, M.E.A. Broekmeyer & P.J. Szabo 1997. Bosstructuur en vegetatie van het bosreservaat Drieduin 1. 55 p. f 43,-
289 W.C. Ma, H. Siepel & J.H. Faber 1997. Onderzoek naar mogelijke ecotoxicologische effecten van bodemverontreiniging in de uiterwaarden op de terrestrische invertebratenfauna. 79 p. f 42,-
290 P. Filius 1997. Institutioneel draagvlak voor natuur. 87 p. f 49,-
291 W. Kuindersma, G.J. Zweegman & J.P.P. Hinssen 1997. Van beleidsprestaties naar oorzaken; natuurbeleid is mensenwerk. 185 p. f 61,50
292 H. Schekkerman 1997. Graslandbeheer en groeimogelijkheden voor weidevogelkuikens. 92 p. f 40,-
293 J.W.M. Langeveld, S.P. Tjallingii & L. Bus 1997. Stromenland; Netwerken van verkeer en water als dragers voor ruimtelijke ontwikkeling. 99 p. f 50,-
294 R. Pouwels 1997. Effecten van habitatverarming op het broedsucces van insectenetende vogels: het stoelpotenmodel. 53 p. f 40,-
295 P.A. Slim 1997. Vooronderzoek duindoornsterfte duingebied Oost-Ameland. 61 p. f 41,50
296 P.J. Szabo 1997. De bosstructuur en samenstelling van bosreservaat Meerdijk 1991 (Flevoland); luchtfoto's en steekproefcirkels. 60 p. f 40,-
297 G.F.C. van Leiden 1997. Openstelling en toegankelijkheid van het agrarisch gebied. 108 p. f 53,-
298 G. van Wirdum & V. Joosten 1997. De proef 'Grondwater als bron' in De Weerribben; Basisrapport over de periode 1989-1995. 145 p. f 56,-
299 J.B. den Ouden & M.E.A. Broekmeyer 1997. A-locatie bossen in Utrecht; kenschets, beoordeling en adviezen met betrekking tot behoud en ontwikkeling van relicten van inheemse bosgemeenschappen in de provincie Utrecht. 83 p. f 40,-
300 J.B. den Ouden 1997. A-locatie bossen in Drenthe; kenschets, beoordeling en adviezen met betrekking tot behoud en ontwikkeling van relicten van inheemse bosgemeenschappen in de provincie Drenthe. 101 p. f 50,-
301 M.E.A. Broekmeyer & J.B. den Ouden 1997. A-locatie bossen in Noord-Holland; kenschets, beoordeling en adviezen met betrekking tot behoud en ontwikkeling van relicten van inheemse bosgemeenschappen in de provincie Noord-Holland. 85 p. f 40,-
302 A. Brenninkmeijer & E.W.M. Stienen 1997. Migratie van de grote stern Sterna sandvicensis in Denemarken en Nederland. 57 p. f 40,-

303 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van de beuk in Nederland. 60 p. f 40,-

304 C.J. Grashof 1997. Verbindingszones en algemene natuurwaarden in het middengebied van de Achterhoek; een verkenning van enkele scenario's 57 p. f 48,-

305 A.P.P.M. Clerkx, M.E.A. Broekmeyer & P.J. Szabo 1997. Bosstructuur en vegetatie van het bosreservaat Drieduin 2. 64 p. f 47,-

306 J.F. Jonkhof (red.) 1997. Landschapspark De Graven; ecologisch onderzoek voor een geïntegreerde ontwikkelingsvisie. 123 p. f 65,-

307 P.A. Slim 1997. Vooronderzoek meidoornsterfte duingebied Oost-Ameland. 25 p. f 31,50

308 M.H.A. van den Ham, E. Hoogendam, C.L.M. Spinnewijn & R.H.M. Peltzer 1997. Bos zonder slagbomen; een kwalitatief onderzoek naar de openstelling en toegankelijkheid van bos. 114 p. f 50,-

309 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van de Zwarte els en van de Witte els in Nederland. 57 p. f 40,-

310 J. van den Burg 1997. Groei en groeiplaats van de zomereik, de wintereik en de Amerikaanse eik in Nederland. 104 p. f 40,-

311 A. Oosterbaan, C.A. van den Berg & A.F.M. Olsthoorn 1997. Ontwikkelingen in mengverhouding en groei van enkele gemengde beplantingen. 40 p. f 31,50

312 G.W.W. Wamelink, C.J.F. ter Braak & H.F. van Dobben 1997. De Nederlandse natuur in 2020: schatting van de potentiële natuurwaarde in drie scenario's. 79 p. f 48,-

313 C.A. van den Berg & A. Oosterbaan 1997. Natuurlijke verjonging van grove den (Pinus sylvestris); zaadval en de invloed van grondbewerking, afrasteren en een scherm op de opkomst en ontwikkeling van zaailingen. 38 p. f 31,50

314 P.J. Szabo 1997. De bosstructuur en bossamenstelling van bosreservaat Lheebroek bij Dwingeloo in 1988; luchtfoto's en steekproefcirkels. 57 p. f 40,-

315 A.H. Prins 1997. Natuurwaarden van het populierenbos ten noordoosten van het Van Tuyll sportpark in Zoetermeer. 25 p. f 30,-

316 G.W.T.A. Groot Bruinderink, H.G.J.M. Koop, A.T. Kuiters & D.R. Lammertsma 1997. Herstel van het ecosysteem Veluwe-IJsseluiterwaarden; gevolgen voor bosontwikkeling, edelherten en wilde zwijnen. 27 p. f 34,-

317 E.P.A.G. Schouwenberg & G. van Wirdum 1997. Effectgerichte maatregelen tegen verzuring in De Weerribben; monitoring van kraggenvenen in de periode 1991-1996. 172 p. f 61,50

320 L.G. Moraal 1997. Eikenprachtkever, Agrilus biguttatus, en eikensterfte: een literatuurstudie over aantastingen, levenswijze en verspreiding. 24 p. f 30,-

321 H.F. van Dobben, M.J.M.R. Vocks, I.M. Bouwma, G.W.W. Wamelink & V. Joosten 1997. Eerste opname van de ondergroei in het Meetnet-Bosvitaliteit. 29 p. f 31,50,-

322 W. Kuindersma & G.J. Zweegman 1997. Grondverwerving voor natuur: het rijk van provincies?; de provinciale oriëntaties op grondverwerving voor bosuitbreiding in de Randstad, natuurontwikkelingen reservaatvorming. 89 p. f 41,50

323 R.P.B. Foppen & W. Nieuwenhuizen 1997. Probleemanalyse ten behoeve van het soortbeschermingsplan hazelmuis Muscardinus avellanarius. 70 p. f 40,-

324 J.K. van Raffe, R.A.M. Schrijver, N.H. Edelenbosch, P.J.W. Hinssen, J. Hekman & H. Verbeek 1997. Informatieplan Databank Gemeentelijk Groenbeheer. 53 p. f 41,50

325 P.A. Slim, H.F. van Dobben & R.M.A. Wegman 1997. Maatregelen voor vernatting in de landgoederen Smalenbroek en Groot Brunink. 47 p. f 42,-

326 W.E. van Duin, K.S. Dijkema & J. Zegers 1997. Veranderingen in bodemhoogte (opslibbing, erosie en inklink) in de Peazemerlannen. 104 p. f 65,-

327 I.M. Bouwma, A.P.P.M. Clerkx & A.F.M. van Hees 1997. Bosdynamiek in het Vijlnerbos. 37 p. f 36,-

328 R.J. Bijlsma, J.T.R. Kalkhoven & H.G.J.M. Koop 1997. Natuurboszones; een procedure voor aanwijzing. 30 p. f 31,50

329 C.A. van der Kooij 1997. Abiotiek in oude elzenbroekbossen; een beschrijving van gradiënten in bodemprofiel en waterkwaliteit in de Oude Kooi en de Otterskooi. 103 p. f 54,50-

330 H. Koop 1997. Pilotstudie A-lokaties; beschrijving van 10 (complexen van) A-lokaties en diagnosemethode voor mate van natuurlijkheid 92 p. f 40,-

331 H. Schekkerman, A.J. Beintema & L.M.J. van den Bergh 1997. Mobiliteit van grutto's in de ruime jas. 33 p. f 30,-

333 A. Oosterbaan, J.P. Peeters & C.A. van den Berg 1997. De historie van een beukenopstand bij Garderen. 23 p. f 30,-

334 H.J. Hekhuis, M.N. van Wijk & C.J.M. van Vliet 1997. Effectiviteit regeling Functiebeloning Bos en Natuurterreinen; een stap op weg naar realisatie van het Bosbeleidsplan. 161 p. f 61,50

336 J.G. de Molenaar & D.A. Jonkers 1997. Wegverlichting en natuur; haalbaarheidsstudie aanvullend onderzoek. 106 p. f 41,50

337 I.M. Bouwma, A.P.P.M. Clerkx & P.J. Szabo 1998. Bosstructuur en vegetatie van het bosreservaat Drieduin 3. 57 p. f 47,50

338 P.A.M. Visschedijk & A.H.J. Segeren 1998. Ontwerp monitoringmodel recreatie SGP Schouwen. 34 p. f 31,50

339 G.W.T.A. Groot Bruinderink, D.R. Lammertsma & E. Hazebroek 1998. Zelfredzaamheid van edelherten en wilde zwijnnen op de Veluwe. 44 p. f 31,50

340 J.G. de Molenaar & D.A. Jonkers 1998. Birkhoven-Bokkeduinen; bouwstenen voor de toekomstige ontwikkeling van een Amersfoorts bosgebied. 121 p. f 51,50

341 F.A. Bink, A.J. Beintema, H. Esselink, J. Graveland, H. Siepel & A.H.P. Stumpel 1998. Fauna-aspecten van effectgerichte maatregelen; preadvies fauna. 191 p. f 60,-

342 H.J. Hekhuis, A. Oosterbaan, M.N. van Wijk & C.A. van den Berg 1998. Voorbeeldbedrijven geïntegreerd bosbeheer Gelderland: I Start en opzet van voorbeeldbedrijven, II Beschrijving van de beheervarianten per voorbeeldbedrijf. 107 p. f 50,-

345 J.G. de Molenaar 1998. Een verkennende beschouwing over grondhoudingen, natuurbeelden en natuurvisies in relatie tot draagvlak voor natuur. 111 p. f 55,-

346 J. van den Burg 1998. Groei en groeiplaats van de populier en de esp in Nederland; Resultaten van 35 jaar onderzoek. 261p. f 71,50
347 J. Graveland 1998. Beheersvisie Zwarte Meer. 67 p. f 40,-
348 J. van den Burg 1998. Groeiplaatseisen van enkele loofboomsoorten: Tamme kastanje, noot, boskers, robinia en bergesdoorn. Een verkenning. 82 p. f 40,-
349 J.K. van Raffe, F.T.J. Hoksbergen, A.A.J.M. Leenaars, A.H. Schaafsma & C.M. van Schagen 1998. Houtoogst bij kleinschalig bosbeheer. 105 p. f 50,-
350 H.J. Hekhuis, H.G.J.M. Koop, M.N. van Wijk, I.M. Bouwma, C.B. Bussink & A.F.M. Olsthoorn 1998. Beheer en beleidsinstrumentarium voor A-locaties. 123 p. f 52,-
351 C.A. van der Kooij, K.W. van Dort, R. Kwak, A. H.F Stortelder & R.W. de Waal 1998. Vernatting Randmeerbossen Flevoland; Mogelijkheden, referenties, voorbeeldprojecten en sleutelfactoren. 83 p. f 47,50
352 N.H. Edelenbosch, P.J.W. Hinssen & E.A.P. Wieman 1998. Verkenning van de toekomstige bosontwikkeling met behulp van het model HOPSY. 31 p. f 31,50
353 A.P.P.M. Clerkx, I.M. Bouwma & A.F.M. van Hees 1998. Het bosreservaat Vijlnerbos; bijlagerapport. 136 p. f. 53,50
355 A.P.P.M. Clerkx & A.F.M. van Hees 1998. Bosdynamiek in Tussen de Goren. 30 p. f 34,-
356 I.M. Bouwma 1998. Beheersvisie A-lokatie Edese bos. 37 p. f. 30,-
357 H.N. Siebel & R.J. Bijlsma 1998. Patroonontwikkeling en begrazing in boslandschappen: New Forest en Fontainebleau als referenties. 62 p. f 40,-
360 J.A. Sinkeldam, R.C. Nijboer & P.F.M. Verdonschot 1998.Typologie van diatomeeëngemeenschappen in Overijssel.135 p. f 70,-
361 A.T.C. Bosveld, G.M. Dorrestein & P.L. Mieninger 1998. Visdieven in gevaar. Een pilot-studie naar oorzaken van verminderd broedsucces van Visdieven *(Sterna hirundo)* broedend op het sluiscomplex bij Terneuzen. 34p. f 38,-