

ONDERZOEK NAAR EEN GESCHIKTE COMBINATIE
TOETSMETHODEN TER BEPALING VAN DE
AQUATISCHE TOXICITEIT VAN MILIEU-
GEVAARLIJKE STOFFEN

Het onderzoek is uitgevoerd in opdracht van
Het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne



rijksinstituut voor de volksgezondheid



rijksinstituut voor drinkwatervoorziening



toegepast natuurwetenschappelijk onderzoek

Rapport nr.: CL 81/100
RIV 627905 001
RID CBH 81/11
Datum: : 1981-08-12
Opdrachtnr.: 36750/36760

ONDERZOEK NAAR EEN GESCHIKTE COMBINATIE TOETSMETHODEN TER BEPALING
VAN DE AQUATISCHE TOXICITEIT VAN MILIEUGEVAARLIJKE STOFFEN

Auteurs : Mw. D.M.M. Adema (MT-TNO)
Drs. J.H. Canton (RIV)
Drs. W. Slooff (RID)
Drs. A.O. Hanstveit (MT-TNO)

Het onderzoek is uitgevoerd in opdracht van
Het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne

Verzendlijst

Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne

Secretaris-Generaal van het Ministerie van Volksgezondheid
en Milieuhygiëne

Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne

plv. Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne, tevens de
Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid, belast met het
toezicht op de hygiëne van het milieu

Hoofd van de afdeling Algemene coördinatie

Directeur voor Ecologische, Toxicologische en Planologische
aspecten

Directeur voor Bestuurlijke en Juridische aspecten

Dr J.G. Wessels Boer

Dr C.L.C. Meijer

Drs A.C. ten Thij

Dr W.H. Könemann

Reserve-exemplaren (ca 15)

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid

Directie

Drs G.J. van Esch

Dr P.A. Greve

Drs C.A. van der Heijden

Prof Dr A.N.P. van Heijst

Dr M.J. van Logten

Drs R.C.C. Wegman

Dr P. Wester

Drs J.H. Canton

Directiesecretariaat

Projectenregistratie

Rapportenregistratie

Administratie

Reserve-exemplaren (ca 15)

Rijksinstituut voor Drinkwatervoorziening

Directie

Dr Ir B.C.J. Zoeteman

Dr H.A.M. de Kruijff

Drs H.J. Kool

Drs F.I. Kappers

Hr G.J. Piet

Drs W. Slooff

Directiesecretariaat

Projectenregistratie

Rapportenregistratie

Administratie

Reserve-exemplaren (ca 15)

Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie TNO

Directie

Dr H.J. Hueck

Dr C.J. Pries

Ir G.J. Vink

Drs W.Chr. de Kock

Ir J.F. de Kreuk

Mw D.M.M. Adema

Drs A.O. Hanstveit

Dr S.A.L.M. Kooijman

Hr H. Oldersma

Werkgroep Milieutoxicologie

Archief (ca 5 ex.)

Reserve-exemplaren (ca 15)

SAMENVATTING	1
1. INLEIDING	3
2. MATERIALEN EN METHODEN	5
2.1. Modelstoffen	5
2.2. Organismen	6
2.3. Methoden	7
2.4. Verwerking van de gegevens	8
2.4.1. Algentoetsen	8
2.4.1.1. EC50- en NEC-waarden	8
2.4.1.2. NOEC-waarden	12
2.4.2. Toetsen met proefdieren	14
2.4.2.1. LC50/EC50- en NEC-waarden	14
2.4.2.2. NOEC-waarden	16
2.5. Raadpleging van de literatuur	16
3. UITGEVOERD ONDERZOEK	18
3.1. Reproduceerbaarheid van toetsen	18
3.2. Invloed van de visleeftijd op de resultaten van toxiciteitstoetsen met jonge vissen	29
3.3. Verschil in gevoeligheid voor stoffen tussen verschillende soorten algen en vissen	33
3.4. Verschil tussen geschatte en berekende "no (observed) effect concentration"	40
3.5. Invloed van de bepalingmethode van de toetscriteria op de resultaten van de toxiciteitstoetsen	44
3.6. Vergelijking tussen kort- en langdurende toetsen; invloed van subletale effecten als criteria op de NOEC-waarden	53
3.7. Vergelijking van de gevoeligheid van algen, <i>Daphnia magna</i> en vissen	66
4. CONCLUSIES	75
4.1. Toetsen met algen	75
4.2. Toetsen met kreeftachtigen	76
4.3. Toetsen met vissen	76
4.4. NOEC versus NEC bepalingen	77
4.5. Reproduceerbaarheid	77
4.6. Gevoeligheid van toetsorganismen	78
4.7. Kortdurend versus langdurend onderzoek	78
4.8. Voorstel voor een combinatie van toetsen	78
5. KOSTEN-BATEN-ANALYSE	80
6. DISCUSSIE BETREFFENDE DE MODELSTOFFEN	85
6.1. Kaliumbichromaat $K_2Cr_2O_7$	85
6.1.1. Chemische aspecten	85
6.1.2. Biologische aspecten	85
6.2. Diisopropylamine (DIPA)	86
6.2.1. Chemische aspecten	86
6.2.2. Biologische aspecten	87
6.3. Di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)	88
6.3.1. Chemische aspecten	88
6.3.2. Biologische aspecten	88
6.4. 2,4-Dinitrotolueen (2,4-DNT)	90
6.4.1. Chemische aspecten	90
6.4.2. Biologische aspecten	90

6.5. 2,6-Dimethylquinoline (2,6-DMQ)	91
6.5.1. Chemische aspecten	91
6.5.2. Biologische aspecten	91
6.6. 2,4-Dichlooraniline (2,4-DCA)	92
6.6.1. Chemische aspecten	92
6.6.2. Biologische aspecten	92
6.7. Tricresylfosfaat (TCP)	93
6.7.1. Chemische aspecten	93
6.7.2. Biologische aspecten	94
6.8. Tetrapropyleenbenzeensulfonaat (TPBS)	95
6.8.1. Chemische aspecten	95
6.8.2. Biologische aspecten	96
7. AANBEVELINGEN	97
7.1. Algen	97
7.2. <i>Daphnia magna</i>	97
7.3. Vissen	98
7.4. Bereiding van toetsoplossingen	99
7.5. Langdurende toetsen in het algemeen	99
7.6. Modelstoffen met specifieke werking	100
DANKBETUIGING	101
LITERATUUR	102
BIJLAGE A	Stoffen welke niet in aanmerking kwamen voor verder onderzoek.
BIJLAGE B	Onderzoek met menadion; toxiciteit en afbreekbaarheid.
BIJLAGE C	Wijzigingen in het toetsprogramma met de algen
BIJLAGE D	Samenstelling en bereiding van de media gebruikt voor de algentoetsen.
BIJLAGE E	Overzicht analysemethoden.
BIJLAGE F	Langdurende toetsen met eierleggende vissen.
BIJLAGE G	<i>Euglena gracilis</i> en <i>Stephanodiscus hantzschii</i> als toetsorganismen voor toxiciteitsonderzoek.
BIJLAGE H	Voorwaarden voor het bepalen van de NEC (no effect concentration) in algentoetsen.
BIJLAGE I	De relevantie van de toetsduur voor toxiciteitsbepalingen met algen.
BIJLAGE J	De bepaling van de effecten in toxiciteitstoetsen met algen.
BIJLAGE K	Enige overwegingen betreffende de meetmethoden gebruikt bij het onderzoek met algen.

SAMENVATTING

In opdracht van het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne werd, ten behoeve van het onderbouwen van wettelijke regelingen, onderzoek verricht naar een geschikte combinatie van toetsmethoden ter bepaling van de aquatische toxiciteit van potentieel milieugevaarlijke stoffen.

Aan dit onderzoek namen deel:

De Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie TNO,
het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en
het Rijksinstituut voor de Drinkwatervoorziening.

Het hoofddoel van het project was, een antwoord te geven op de vraag welke toetsorganismen en welke toetscriteria nodig zijn om een indruk te krijgen omtrent de mogelijke effecten van chemicaliën op het aquatisch milieu.

Het onderzoek werd beperkt tot beantwoording van de volgende vraagstellingen:

- 1) Geven toxiciteitstoetsen met eenzelfde organisme en methode, uitgevoerd door verschillende instituten (in dit geval RIV en TNO), hetzelfde resultaat.
- 2) Heeft de leeftijd van vissen bij het begin van de proef invloed op de resultaten.
- 3) Verschilt de gevoeligheid voor chemicaliën bij verschillende soorten algen en bij verschillende soorten vissen.
- 4) Beïnvloedt de methode waarmee de te meten effecten bepaald worden de resultaten.
- 5) Hoe groot is de invloed van de expositieduur en van de beoordelingscriteria op de resultaten.
- 6) Bestaan er grote verschillen in gevoeligheid tussen algen, kreeftachtigen en vissen.

Als toetsorganismen werden drie verschillende groene algen (*Scenedesmus pannonicus*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Selenastrum capricornutum*), een groene flagellaat (*Euglena gracilis*), een blauw-groene alg (*Microcystis aeruginosa*) en een diatomee (*Stephanodiscus hantzschii*), de kreeftachtige *Daphnia magna* (watervlo) en de vissen *Poecilia reticulata* (gup), *Jordanella floridae* (blokkarper) en *Oryzias latipes* (rijstvis) gekozen.

De toetsduur per proef werd bij dit onderzoek beperkt tot maximaal zes weken; de toetsen werden uitgevoerd volgens, of in analogie met, de bestaande NEN-normen.

Tot het onderzoek behoorde uiteraard ook chemische analyse (van de waterfase), terwijl bepaalde evaluaties van toetsresultaten werden uitgevoerd volgens in TNO ontwikkelde wiskundige modellen.

Het onderzoek werd verricht aan de hand van acht modelstoffen:

Kaliumbichromaat, diisopropylamine, di(2-ethylhexyl)-ftalaat, 2,4-dinitrotolueen, 2,6-dimethylquinoline, 2,4-dichlooraniline, tricresylfosfaat en tetrapropyleenbenzeensulfonaat.

Uit het onderzoek bleek dat langdurende proeven met meerdere organismen noodzakelijk zijn om een redelijke indruk te krijgen over de mogelijke effecten van een stof op het aquatisch milieu.

Uit de onderzochte toetsmethoden lijkt een combinatie van de volgende toetsen een maximum aan zekerheid te geven voor het schatten van een "no observed effect concentration", bij een minimum aan inspanning:

- 1) Een vierdaagse toets met groeisnelheid als criterium, met een eencellige groene alg b.v. *Scenedesmus pannonicus* eventueel aangevuld met een dergelijke toets met de blauwgroene alg *Microcystis aeruginosa* en een vertegenwoordiger van de diatomeeën b.v. *Stephanodiscus hantzschii*.
- 2) Een twee weekse toets met één generatie van *Daphnia magna* met als criteria sterfte en kwantitatief bepaalde reproductie. De toetsduur dient eventueel verlengd te worden tot er tenminste in de blanco culturen driemaal een volledige worp jongen is geboren én tot de LC50. ∞ ("threshold concentration") is benaderd.
- 3) Een toets met een eierleggende vissoort met als criteria effecten op de embryonale ontwikkeling en op de sterfte en kwantitatief bepaalde groei van de visjes gedurende twee weken na het uitkomen van de eieren; deze periode dient, afhankelijk van de groeisnelheid, eventueel verlengd te worden tot ca vier weken.

1. INLEIDING

Met het toenemen van de bezorgdheid t.a.v. de schadelijke effecten van stoffen welke in het aquatisch milieu terecht (kunnen) komen, stijgt de behoefte aan nationaal en internationaal aanvaardbare standaardtoetsen voor het vaststellen van de schadelijkheid van dergelijke stoffen.

De meest toegepaste toetsprocedure is het bepalen van de toxiciteit van de stoffen voor waterorganismen gedurende 48 of 96 uren. De resultaten van dergelijke toetsen dienen vooral als indicatie omtrent het niveau van de acute toxiciteit en voor de keuze van de concentratiebereiken voor meer uitgebreide langdurende toxiciteitstoetsen.

Het onderhavige onderzoekprogramma had tot doel een pakket toxiciteitstoetsen op te stellen dat minimaal nodig geacht moet worden om chemische waterverontreinigingen toxicologisch te kunnen beoordelen. Dit houdt in dat gezocht diende te worden naar zo eenvoudig en goedkoop mogelijke toxiciteitstoetsen waarmee met een redelijke zekerheid de toxiciteit van een stof voor het aquatisch milieu aangegeven kan worden. Het lag voor de hand voor een dergelijk onderzoek organismen van verschillende trofische niveau's te kiezen. Gezien het feit dat in een aantal (inter)nationale wettelijke regelingen overeenstemming is bereikt over de keuze: alg, kreeftachtige en vis, zal in dit onderzoek uitsluitend aandacht besteed worden aan vertegenwoordigers van deze groepen. Om een advies te kunnen geven over de samenstelling van een minimum-pakket toxiciteitstoetsen zal in dit rapport aan de hand van onderzoek aan 8 modelstoffen aandacht besteed worden aan de volgende vragen:

- 1) Geven toxiciteitstoetsen met eenzelfde organisme, uitgevoerd door verschillende instituten (in dit geval RIV en TNO), volgens dezelfde technieken, hetzelfde resultaat.
- 2) Heeft de leeftijd van vissen bij het begin van de proef invloed op de resultaten.
- 3) Verschilt de gevoeligheid voor chemicaliën bij verschillende soorten algen en bij verschillende soorten vissen.
- 4) Beïnvloedt de methode waarmee de te meten effecten bepaald worden de resultaten.
- 5) Hoe groot is de invloed van de expositieduur en van de beoordelingscriteria op de resultaten.

6) Welke toetsorganismen en welke toetscriteria zijn er nodig om een goede indruk omtrent de werking van chemicaliën op het aquatisch milieu te verkrijgen.

Bovenstaande vraagstellingen zijn ruim; het onderzoek werd echter beperkt tot min of meer gebruikelijke toetsmethoden en proeforganismen, waarmee bovendien reeds enige ervaring in de deelnemende instituten bestond. Ook de maximaal toegelaten proefduur was tevoren vastgesteld op ca zes weken.

Het onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne door de Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie TNO, het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en het Rijksinstituut voor de Drinkwatervoorziening.

Het uit te voeren onderzoek was beschreven in de projectbeschrijving nr.: 36750/36760 (TNO) /CBS VI 261 (RIV)/ CBH-MHGC 6 (RID), getiteld: "Onderzoek ten behoeve van het vaststellen van een pakket toxiciteitstoetsen dat minimaal nodig geacht wordt om chemische waterverontreinigingen toxicologisch te kunnen beoordelen in het kader van wettelijke regelingen".

2. MATERIALEN EN METHODEN

2.1. MODELSTOFFEN

Bij de keuze van de modelstoffen werd ervan uitgegaan dat deze moesten behoren tot de "Non-Regulated Chemicals" en minstens drie dagen stabiel in water zouden zijn. Bovendien werd getracht voorbeelden te kiezen uit verschillende chemische klassen.

Een aantal oorspronkelijk gekozen stoffen bleek in oriënterend onderzoek niet in aanmerking te komen voor verder onderzoek; zie hiervoor de Bijlagen A en B. Uiteindelijk werden de stoffen vermeld in onderstaand schema gekozen.

Schema 1 : Gegevens over de modelstoffen.

Stof	Herkomst	Zuiverheid	Soort	Afkorting
Kaliumbichromaat	Merck	99,9%	anorganische metaalverbinding	$K_2Cr_2O_7$
Diisopropylamine	Fluka	99,9%	alifatisch amine	DIPA
Di(2-ethylhexyl)-ftalaat	Merck	97 %	ftaalzure ester (aromatisch)	DEHP
2,4-Dinitrotolueen	Merck	98 % (op droge stof)	met NO_2 gesubstitueerde aromatische verbinding	2,4-DNT
2,6-Dimethylquinoline	Aldrich	98 %	aromatische verbinding	2,6-DMQ
2,4-Dichlooraniline	Fluka	99 %	met Cl gesubstitueerde aromatische amine	2,4-DCA
Tricresylfosfaat	Fluka	pract.	fosforzure ester (aromatisch) (tri-arylfosfaat)	TCP
Tetrapropyleenbenzeensulfonaat	Merck	-	anionische oppervlakte-actieve stof	TPBS

Kaliumbichromaat en tetrapropyleenbenzeensulfonaat werden gekozen omdat ze gebruikt zijn in het EEG ringonderzoek (1978) en bij verschillende toetsmethoden reeds als referentiestof in gebruik zijn of hiervoor zijn aanbevolen.

Di(2-ethylhexyl)-ftalaat werd gekozen wegens de extreme toxiciteit voor *Daphnia magna* beschreven in de literatuur (Sanders e.a. 1973) en omdat zeer grote hoeveelheden van deze stof in de kunststoffenindustrie gebruikt worden als weekmaker.

2,4-Dinitrotolueen, 2,6-dimethylquinoline en 2,4-dichlooraniline werden gekozen omdat aromatische verbindingen, vooral indien ze gesubstitueerd zijn met halogeen- of nitrogroepen, vaak toxisch zijn. 2,4-Dichlooraniline werd bovendien gekozen omdat 3,4-dichlooraniline bijzonder toxisch was gebleken bij langdurend onderzoek met waterorganismen (Adema en Vink, 1981).

Tricresylfosfaat werd gekozen wegens het geringe aantal gegevens over de toxiciteit in aquatisch milieu, terwijl de stof een hoge toxiciteit voor zoogdieren heeft.

Di(2-ethylhexyl)-ftalaat en tricresylfosfaat zijn slecht oplosbaar in water, respectievelijk ca $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ en ca 1 mg.l^{-1} .

Zij werden aan de media toegevoegd uit geconcentreerde oplossingen in dimethylsulfoxide (DMSO), waarbij als verhouding DMSO : water = 1 : 10^4 werd aangehouden, tenzij anders vermeld.

2,4-Dinitrotolueen bleek uitsluitend verkrijgbaar in combinatie met een (onbekende) hoeveelheid water, toegevoegd omdat de stof in droge vorm explosief is. Van deze verbinding werd een geconcentreerde oplossing in DMSO bereid welke 164 g/l bevatte, berekend op droge stof. Uit deze oplossing werden de geconcentreerde oplossingen, benodigd voor de toetsen, bereid. De andere stoffen werden direct in de waterige media gedoseerd zonder gebruik van organische oplosmiddelen.

Diisopropylamine beïnvloedde de pH van de media; deze werd vóór de toetsen op de waarde van het medium (blanco) gebracht.

2.2. ORGANISMEN

Voor de keuze van de organismen werd uitgegaan van één of meer vertegenwoordigers van de algen, de kreeftachtigen en de vissen (zie par. 1.). Toxiciteitstoetsen met algen zijn binnen Nederland nog onvoldoende gestandaardiseerd en de keuze van de meest geschikte algensoort is nog niet voldoende onderbouwd. Daarom werden in dit onderzoek meerdere algensoorten, een groene flagellaat en een diatomee met elkaar vergeleken.

Bij onderzoek met kreeftachtigen blijkt *Daphnia magna* (watervlo) algemeen geaccepteerd te zijn, zowel voor acute toetsen als voor reproductie-onderzoek; deze crustacee werd daarom als enige bij dit onderzoek betrokken.

Bij onderzoek met vissen zijn in Nederland alleen 4-daagse toetsen met *Poecilia reticulata* (gup) gestandaardiseerd; deze vis werd daarom voor dit onderzoek gekozen. *Poecilia reticulata* is echter een levendbarende vissoort; om ook de invloed op de embryonale ontwikkeling te betrekken bij de oordeelsvorming over de invloed van de chemicaliën werden bij dit onderzoek tevens de eierleggende vissen *Jordanella floridae* (blokkarper) en *Oryzias latipes* (rijstvis) gebruikt. Deze vissoorten worden veel in de Verenigde Staten respectievelijk in Japan gebruikt.

Een overzicht van de gebruikte organismen is gegeven in de schema's bij par. 2.3.

2.3. METHODEN

De toetsen werden zoveel mogelijk uitgevoerd volgens NEN-normen; indien deze niet bestonden werden de betreffende toetsen uitgevoerd volgens de principes van NEN-normen.

Overzichten van de uiteindelijk uitgevoerde toetsen worden, met de belangrijkste gegevens omtrent de proefopzet en de te meten parameters, gegeven in de schema's 2, 3, en 4. Deze schema's wijken op een aantal punten af van die vermeld in de projectbeschrijving; de redenen voor deze afwijkingen bij de algentoetsen zijn vermeld in bijlage C.

Alle toetsen met de vis *Pimephales promelas* kwamen te vervallen wegens kweekproblemen met deze vissoort in het RID. De helft van de langdurende toetsen met *Oryzias latipes* (RIV) werd bekort tot ca één week na uitkomen van de eieren, wegens hoge sterfte-percentages van de controlevissen.

Volgens de projectbeschrijving zouden de toetsen met een proefduur van maximaal 4 dagen uitgevoerd worden met ca 5 concentraties en een controle, met een concentratiereeks met een rede $1,8 (\sqrt[4]{10})$ (1,0 - 1,8 - 3,2 - 5,6 - 10 mg.l^{-1} enz). In de toetsen met dieren werden bij TNO echter in enkele gevallen, wanneer de concentratie-effect-relatie zeer steil was, reeksen met een rede $1,3 (\sqrt[8]{10})$ gebruikt; bij het RIV werden in enkele gevallen, wanneer de concentratie-effect-relatie zeer vlak was, reeksen met een rede $3,2 (\sqrt{10})$ gebruikt. Ook werden in beide instituten vaak meer dan 5 concentraties getoetst.

De vier-weekse toetsen zouden worden uitgevoerd met een concentratiereeks met een rede 3,2. Bij TNO werden hier in enkele gevallen reeksen met een rede 1,8 gebruikt.

Indien deze afwijkingen invloed hadden op de vergelijking tussen de resultaten van TNO en RIV is dit vermeld bij de tabellen.

Bij elke toets werden 1 à 3 maal (afhankelijk van de proefduur) van enkele toetsoplossingen monsters genomen ter bepaling van de gehalten aan toetsverbinding. Voor de bepalingsmethoden wordt verwezen naar bijlage E.

2.4. VERWERKING VAN DE GEGEVENS

2.4.1. Algentoetsen

2.4.1.1. EC50- en NEC-waarden

Het effect van chemische stoffen op de groei van algen wordt meestal gegeven als een EC50-waarde. Dit is de concentratie van een stof waarbij een grootheid zoals de groeisnelheid of de opbrengst aan biomassa de helft is van die in de culturen waaraan geen stof is toegevoegd. (Standard Methods, 1976).

De "no effect concentration" (NEC) is de hoogste concentratie stof waarbij de groei gelijk is aan die in de blanco.

In dit onderzoek werden de EC50- en de NEC-waarden berekend m.b.v. een parametrisch model dat ontwikkeld werd bij TNO (Kooijman e.a., 1981).

De belangrijkste aannamen in dit model zijn de volgende:

1. Het aantal cellen in de cultuur neemt toe volgens een logistische groeikromme.
2. De ent en/of groeisnelheid en/of de opbrengst aan biomassa (yield) verminderen volgens een logistische functie naarmate de logaritme van de concentratie van de toetsverbinding toeneemt.
3. Daar waar een NEC-waarde berekend is, is verondersteld dat de hoeveelheid stof boven de NEC-waarde werkzaam is volgens punt 2.

De parameters van dit model werden uit de waarnemingen geschat op grond van een gewogen kleinste-kwadraten-aanpassing van het model aan de waarnemingen. De berekeningen en het uitzetten van de grafieken werden uitgevoerd met behulp van een hiervoor ontwikkeld computerprogramma op apparatuur van het IWIS-TNO, Den Haag.

Schema 2
Toetsomstandigheden en toetscriteria bij het onderzoek met algen, alsmede de uitvoerende instituten.

Toetsorganisme	Leeftijd	Blootstellings- tijd in dagen	Aantal org. per groep $t = 0h$	Toetsvolume per groep in l	Voedings- medium 1)	Temp. in °C	Belichting	Dosering	Criteria	Methode	Instituut
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	log-fase	4	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_1	23+2	ca 5000 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer)	NEN 6506	RIV
		4	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_1	23+2	ca 5000 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en/of Coulter counter)	NEN 6506	RIV+TNO
<i>Scenedesmus pannonicus</i>	log-fase	4	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_1	23+2	ca 5000 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en/of Coulter counter)	NEN 6506	RIV+TNO
		14	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_1	23+2	ca 5000 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en/of Coulter counter)	NEN 6506	TNO
<i>Microcystis aeruginosa</i>	log-fase	4	ca $5 \cdot 10^5$ cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_2/M_3	23+2	ca 2500 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en/of Coulter counter)	Analoog aan NEN 6506	RID
		7 à 8	ca $5 \cdot 10^5$ cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_2/M_3	23+2	ca 2500 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en/of Coulter counter)	Analoog aan NEN 6506	RID
<i>Selenastrium capricornutum</i>	log-fase	4	ca $5 \cdot 10^4$ cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_1	23+2	ca 2500 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: spectrofotometer en Coulter coun- ter	NEN 6506	RID
<i>Euglena gracilis</i>	log-fase	4	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	$M_1 +$ $0,1 g.l^{-1}$ gistextract	23+2	ca 5000 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: Coulter counter)	Analoog aan NEN 6506	TNO
		7	ca 10^4 cellen per ml (in duplo)	150 ml in 250 ml er- lenmeyers	M_4	17+2	ca 1500 lux	eenmalig	groei (visueel en gemeten: Coulter counter)	Analoog aan NEN 6506	TNO

1) zie bijlage D.

Schema 3
Toetsomstandigheden en toetscriteria bij het toxiciteitsonderzoek met *Daphnia magna*, alsmede de uitvoerende instituten.

Leeftijd	Blootstellings- tijd in dagen	Aantal org. per groep	Toetsvolume per groep in l	Voeding	Temp. in °C	Toetsmedium	Dosering	Criteria	Methode	Instituten
< 1 dag	2	25 (in duplo)	1	geen	19+1	DSW	eenmalig	mortaliteit verlamming	NEN 6501	
< 1 dag	14	25 (in duplo)	1	Chlorella	19+1	DSW	3x per week ¹⁾	mortaliteit verlamming groei (visueel) reproductie (kwalitatief en kwantitatief)	NEN 6502 bekort tot 2 w.	
< 1 dag	21	25 (in duplo)	1	Chlorella	19+1	DSW	3x per week	mortaliteit verlamming groei (visueel) reproductie (kwalitatief en kwantitatief)	NEN 6502	RIV + TNO
< 1 dag	21 (Pgen.) 14 (Fgen.)	25 (in duplo)	1	Chlorella	19+1	DSW	3x per week	mortaliteit verlamming groei (visueel) reproductie (kwalitatief en kwantitatief)	NEN 6502 aangevuld met F ₁ generatie	

1) De dieren werden op maandag, woensdag en vrijdag overgezet in versbereide toetsoplossingen.

Schema 4
Toetsomstandigheden en toetscriteria bij het toxiciteitsonderzoek met vissen, alsmede de uitvoerende instituten.

Toetsorganisme	Leeftijd	Blootstellings- tijd in dagen	Aantal org. per groep	Toetsvolume in l	Voeding	Temp. in °C	Toetsmedium	Dosering	Criteria 4)	Methode	Instituut
<i>Oryzias latipes</i>	1 à 2 dagen	4	10 (in duplo)	1	geen	23+2	DSW	elke 48 uur	mortaliteit verlamming	Analoog aan NEN 6504	RIV <i>O. latipes</i>
	4 à 5 weken										
<i>Jordaniella floridæ</i>	eieren <36 uur oud	max. 28 dagen na "gemiddeld" uitkomen	min. 25 (in enkel- voud)	1 ¹⁾	zie bijlage F	23+2	DSW	3x per week	mortaliteit (ei + vis) dagen van uit- komen macroscopische afwijkingen groei (meten + wegen)	Zie bijlage F	TNO <i>J. floridæ</i>
<i>Poecilia reticulata</i>	3 à 4 weken	4	10 (in duplo)	1	geen	23+2	DSW	elke 48 uur	mortaliteit verlamming	NEN 6504	RIV + TNO
		max. 28	25 (in enkel- voud)	2 ¹⁾	zie ²⁾	23+2	DSW	3x per week	mortaliteit verlamming groei (meten + wegen)	NEN 6504 gecontinuu- eerd tot 4 weken met groei als criterium	

1) Opgegeven is het volume op t=0; afhankelijk van de grootte van de vissen wordt dit volume aangepast.

2) Canton en Slooff (1978).

3) De dieren werden op maandag, woensdag en vrijdag overgezet in versbereide toetsoplossingen.

4) Indien dit mogelijk was, werd ook het gedrag van de vissen beoordeeld.

Meestal is het effect van de toetsverbinding in de toetsen, zoals die zijn uitgevoerd, niet in de ent, de groeisnelheid en de opbrengst tegelijk waar te nemen, maar slechts in één of twee van deze grootheden. Dit leidt tot verschillende varianten van het model. De definitieve EC50-waarde werd gekozen aan de hand van die variant die de beste aanpassing aan de experimentele waarden gaf. Bij gelijkwaardigheid van varianten werd de voorkeur gegeven aan die met de groeisnelheid als parameter.

Op grond van bovenstaande regels werden in dit project in bijna alle gevallen EC50-waarden m.b.t. de remming van de groeisnelheid gekozen. Alleen voor de 4-daagse toets met *M. aeruginosa* en 2,4-DCA en bij de toets met *C. pyrenoïdosa* en TCP werden EC50-waarden m.b.t. de remming van de opbrengst gekozen.

2.4.1.2. NOEC-waarden

De NOEC-waarde ("no observed effect concentration") werd uit de waarnemingen bepaald met de methode beschreven in NEN 6506. De NOEC is de hoogste getoetste concentratie waarvan het gemeten effect niet meer dan ca 10% afwijkt van de blanco-waarde.

Hoewel dit criterium voor een groot deel van de toetsresultaten toegepast kon worden, bleken grote variaties in de tellingen in parallelle blanco-culturen en in de laagste concentraties te kunnen leiden tot moeilijkheden met dit empirisch vaststellen van de NOEC (zie b.v. fig. 1., t = 120,5 h).

In dit geval werd een andere methode gevolgd. Hierbij werd uitgegaan van de uit het model berekende groeikrommen. De hoogste concentratie waarvoor de berekende groeikromme weinig afweek van die van de blanco werd dan als NOEC aangenomen (zie fig. 2.).

De NOEC-waarden zoals berekend voor dit project volgens NEN 6506 hebben betrekking op de gemeten hoeveelheid biomassa in de culturen. Deze kunnen verschillend zijn van die bepaald m.b.t. de groeisnelheid (zie verder bijlage J).

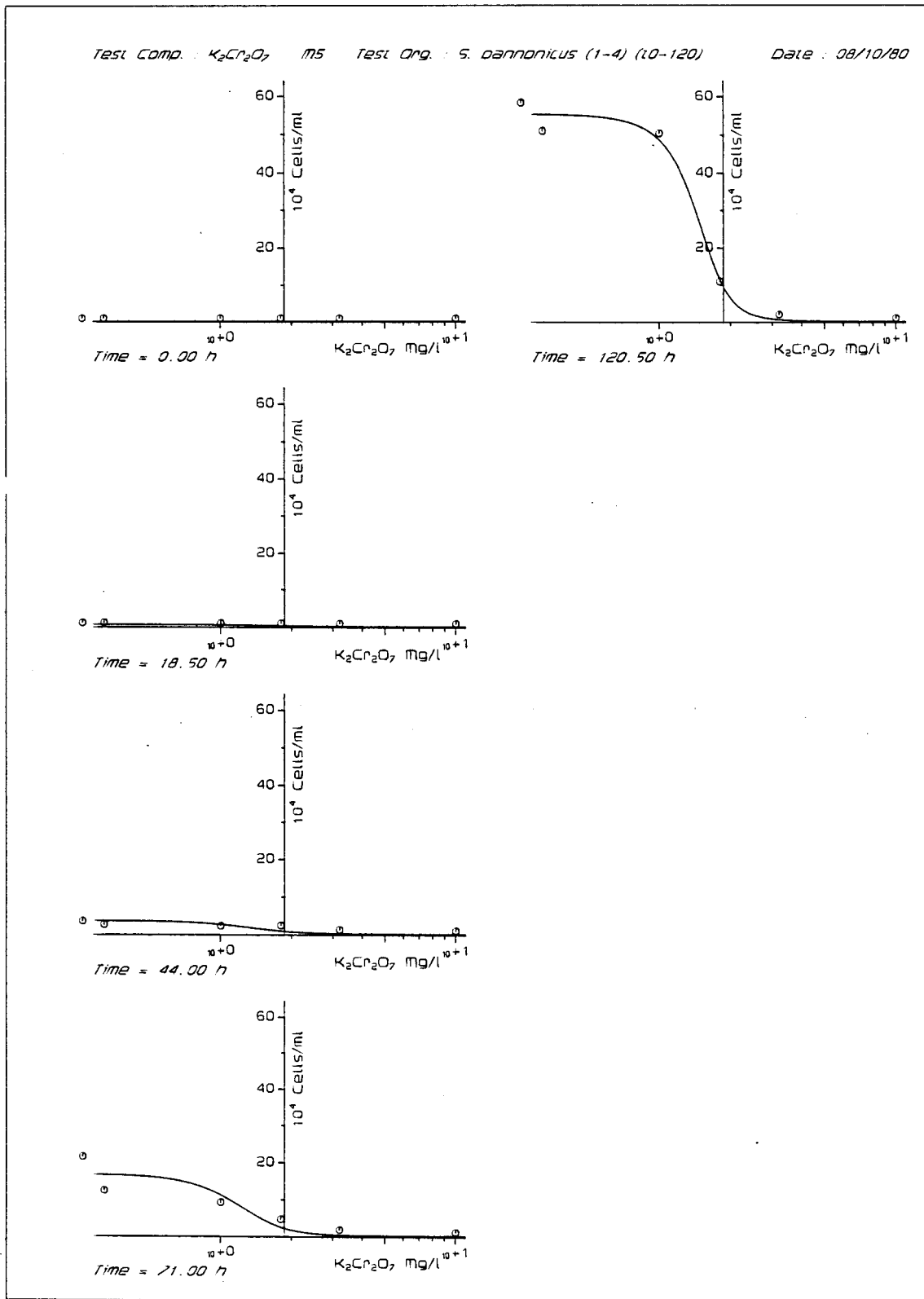


Fig. 1. Concentratie-effect krommen van een van de toetsen met een effect op de groeisnelheid.
(De ordinaat is geplaatst op de betreffende EC50-waarde).

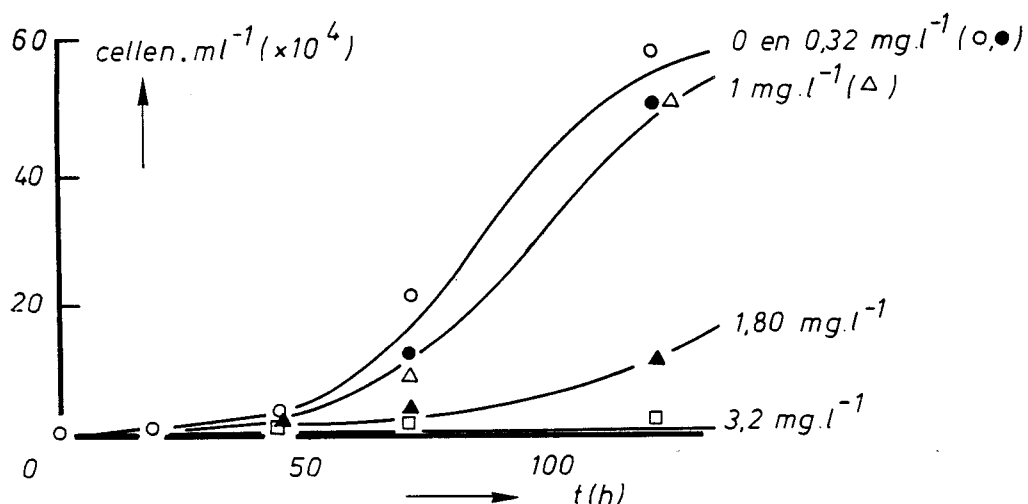


Fig. 2. Voorbeeld van de bepaling van de NOEC d.m.v. de berekende waarden. De groeikrommen bij de blanco (0) en $0,32 \text{ mg.l}^{-1}$ (o, ●) vallen op elkaar. De groeikromme bij 1 mg.l^{-1} (Δ) ligt hieronder, dus is de NOEC $0,32 \text{ mg.l}^{-1}$. (Zelfde proef als in fig. 1).

2.4.2. Toetsen met proefdieren

2.4.2.1. LC50/EC50- en NEC-waarden

De aantallen dode dieren per concentratie en waarnemingstijd werden verwerkt tot LC50-waarden; alleen in de tweedaagse toetsen met *D. magna* werden dode en verlamde dieren geteld en werden deze waarnemingen verwerkt tot EC50-waarden (E = onbeweeglijkheid). De LC50.t-waarde is die concentratie waarbij na een expositietijd t de overlevingskans half zo groot is als die in de blanco. De LC50(EC50)-waarden en hun betrouwbaarheidsintervallen werden voor alle toetsen berekend door TNO. De berekeningen werden uitgevoerd volgens bepaalde modellen, ontwikkeld door Kooijman (1981); voor dit project werden 4 (van de 8 ter beschikking zijnde) modellen gebruikt:

- a) model 1, uitgaande van de veronderstelling dat de maximale helling van de logistische ln concentratie-effect-kromme, bepaald op verschillende tijdstippen, voor al deze tijdstippen gelijk is. Voor gebruik van dit model is het nodig dat deze helling op minstens één tijdstip bepaald is; met andere woorden er moet minstens één waarnemingstijd zijn met een gedeeltelijke sterfte van de proefdieren bij minimaal 2 concentraties. Het model past meestal, maar doet geen vooronderstellingen over het LC50-verloop in de tijd. Met andere woorden een $\text{LC50.}\infty$ kan niet berekend worden met dit model.

- b) model 3, uitgaande van dezelfde vooronderstelling als gesteld in model 1, waarbij echter tevens wordt verondersteld dat de \ln LC50-tijdrelatie een hyperbool is.

Deze veronderstelling is vooral voor onbekende stoffen en dieren moeilijk hard te maken en berust slechts op empirische basis; toch past het model vaak goed. Het voordeel van model 3 boven model 1 is dat de $LC50_{\infty}$ berekend kan worden.

- c) model 5, uitgaande van dezelfde vooronderstellingen als gesteld in model 1 met als extra vooronderstellingen:
- de opnamesnelheid van de toetsverbinding in de proefdieren is evenredig met de concentratie in de waterfase en
 - de uitscheidingsnelheid van de toetsverbinding uit de proefdieren is evenredig met de concentratie in de proefdieren.

Ook met dit model is het mogelijk de $LC50_{\infty}$ te berekenen.

- d) model 6, gelijk aan model 5, waarbij echter extra wordt aangenomen dat er een "no effect concentration" bestaat (NEC), welke met dit model dan ook berekend kan worden met het bijbehorende betrouwbaarheidsinterval. Zo'n NEC is de hoogste concentratie waarvoor het effect niet verschilt van de controle.

Voor elke proef werd een keuze gemaakt uit deze 4 modellen voor de berekening van de LC50-waarden en eventueel de NEC-waarden.

Deze keuze werd bepaald door de volgende feiten:

- Niet elk model is bruikbaar voor elke set waarnemingen.
(De bruikbaarheid wordt beperkt door het aantal concentraties met gedeeltelijke of totale sterfte bij bepaalde waarnemingstijden).
- Niet elk model past even goed op een bepaalde set waarnemingen.
- Indien 2 toetsen met elkaar vergeleken werden, werden de LC50-waarden bij voorkeur via één en hetzelfde model vergeleken.
- Indien meerdere modellen goed pasten en er geen andere redenen waren om aan een bepaalde keus de voorrang te geven, werd als voorkeursvolgorde voor de berekening van de LC50-waarden aangehouden: model 5 (wegens de biologische achtergrond van zijn vooronderstellingen én de mogelijkheid van extrapolatie naar $t = \infty$); model 3 (wegens de mogelijkheid tot extrapolatie naar $t = \infty$); model 1.

De NEC-waarden werden voor zover dat mogelijk was berekend met model 6.

Indien geen enkel model bruikbaar was of paste op de waarnemingen, werd de LC50.t-waarde vermeld als groter dan de concentratie met 0% sterfte en kleiner dan de concentratie met 100% sterfte.

2.4.2.2. NOEC-waarden

Naast berekening van de LC50 (EC50)- en NEC-waarden na verschillende expositietijden werden "no observed effect concentration" (NOEC)-waarden bepaald na verschillende expositietijden.

De NOEC-waarden (of NOLC-waarden, indien het bepaalde effect uitsluitend de sterfte was) werden door de auteurs geschat uit de waarnemingen.

De NOEC is de hoogste getoetste concentratie waarbij ten opzichte van de controle geen afwijkingen zijn gevonden wat betreft een tevoren vastgesteld effect. Het is vanzelfsprekend een tamelijk subjectieve parameter, voor het gebruik waarvan goede onderlinge afspraken gemaakt moeten worden.

Bij het criterium sterfte en een steile concentratie-effect-relatie zullen er in het algemeen geen problemen optreden; bij een vaag criterium als bv. "traag zwemmen" en bij een vlakke concentratie-effect-relatie echter, ligt het voor de hand dat er tussen beoordelaars grote verschillen in de geschatte NOEC-waarden kunnen optreden.

2.5. RAADPLEGING VAN DE LITERATUUR

Een recherche naar literatuur over de aquatische toxiciteit van de stoffen kaliumbichromaat, diisopropylamine, di(2-ethylhexyl)ftalaat, 2,4-dinitrotolueen, 2,6-dimethylquinoline, 2,4-dichlooraniline, tricresylfosfaat en tetrapropyleenbenzeensulfonaat is uitgevoerd in de volgende bestanden:

Chemical Abstracts 1967-1980 of 1969-1980	(CAS)
Biosis 1974-1980	(BIO)
Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts 1978-1980	(AQS)
Aqualine 1974-1980	(AQL)
Toxline ca 1974-1980	(TOX)

Verder is nog gezocht in:

Oil en Hazardous Materials-Technical Assistance Data System (OHM-TADS)	
Registry of Toxic Effects of Chemical Substances	(RTECS)

Over diisopropylamine, 2,4-dinitrotolueen en 2,4-dichlooraniline werd géén of alleen zeer oude literatuur gevonden. Ook over 2,6-dimethylquinoline werden weinig gegevens gevonden.

Betreffende deze vier stoffen is verder gezocht in CBAC (1965-1980), zonder dat nog nieuwe relevante gegevens werden gevonden; er kwamen weer dezelfde referenties naar voren als al eerder via CAS waren gevonden.

3. UITGEVOERD ONDERZOEK

De resultaten zijn per vraagstelling of per onderdeel samengevat in tabellen, welke voorafgegaan worden door een korte omschrijving van de bijbehorende toetsen. De conclusies en opmerkingen welke uit de tabellen volgen zijn direct achter elke tabel vermeld.

De 95% betrouwbaarheidsintervallen worden, voorzover ze berekend konden worden en nog niet in een eerdere tabel vermeld zijn, telkens onder de betreffende LC50/EC50- en NEC-waarden vermeld.

Alle resultaten zijn betrokken op de nominale gehalten aan toetsverbinding, tenzij anders vermeld. De in de toetsoplossingen door chemische analyse bepaalde gehalten waren in het algemeen redelijk in overeenstemming met de nominale gehalten, tenzij anders vermeld. Op deze aspecten wordt ingegaan in par. 6. Bij TNO werden van de toetsen met algen alléén die met *S. hantzschii* begeleid door chemische analyse.

3.1. REPRODUCEERBAARHEID VAN TOETSEN

Om de reproduceerbaarheid van toetsen tussen RIV en TNO na te gaan werd een aantal veel gebruikte en reeds nauwkeurig omschreven toetsen volgens hetzelfde voorschrift uitgevoerd in beide instituten. Het betrof de volgende toetsen:

- een 4-daagse groeitoets met de eencellige groene alg *S. pannonicus*, waarbij de groei werd gemeten met een spectrofotometer.
- een 2-daagse toets met *D. magna*, met onbeweeglijkheid als criterium.
- een 3-weekse toets met *D. magna* (P. generatie), met sterfte en reproductie als criteria, gevolgd door een 2-weekse toets met de F₁-generatie, met dezelfde criteria. (Het aantal jongen werd nauwkeurig geteld).
- een 4-daagse toets met *P. reticulata*, met sterfte en gedrag als criteria.
- een 4-weekse toets met *P. reticulata*, met sterfte en groei (de laatste bepaald door wegen van de visjes) als criteria.

De resultaten van deze toetsen zijn samengevat respectievelijk in de tabellen 1a, 1b, 1c, 1d en 1e.

Table 1a Comparison, between RIV and TNO, of results (mg.l^{-1}) of four-day tests with *Scenedesmus pannonicus*; measurements with spectrophotometer.

Compound	EC 50 ¹⁾		NOEC ¹⁾	
	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	1.8 1.6-2.0	2.8 2.6-3.0	0.32	1.0
DIPA	230 220-240	170 160-180	56	100
DEHP ²⁾	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	1.6 1.5-1.6	2.1 2.0-2.3	0.56	< 1.0
2,6-DMQ	31 29-33	19 17-21	18	< 10
2,4-DCA	15 14-16	11 9-14	3.2	5.6
TCP	3.8 2.9-4.9	1.3 1.2-1.5	0.56	0.32
TPBS	64 42-100	75 61-92	1.0	10 ³⁾

1) E: growth.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

3) Calculated by means of model (see section 2.4.1.2).

Conclusies en opmerkingen bij tabel 1a.

Vier-daagse groeitoetsen met *S. pannonicus* bleken in het algemeen goed reproduceerbaar tussen RIV en TNO.

De reproduceerbaarheid van de EC50-waarden was beter dan die van de NOEC-waarden.

De gebruikte methode, NEN 6506, is echter vooral gericht op een nauwkeurige EC50-bepaling. Aan de NOEC-bepaling kleven nog zoveel onzekerheden dat de NOEC voor vergelijkingsdoeleinden minder geschikt is; de vergelijking tussen RIV en TNO kan daarom beter vooral gericht worden op de EC50-waarden.

Het grootste verschil in EC50-waarden tussen RIV en TNO, een factor 3, trad op bij TCP; dit was echter een slecht oplosbare, ook in andere toetsen slecht reproduceerbaar te toetsen, stof (zie par. 6.7.).

De verschillen tussen RIV en TNO bij de overige stoffen waren gering (factor 1,2 tot 1,6). Aangezien elk instituut voor ca een helft van de stoffen de hoogste waarde had waren er dus geen systematische afwijkingen.

Table 1b Comparison, between RIV and TNO, of results (mg.l^{-1}) of two-day tests with *Daphnia magna*.

Compound	24 h EC 50 ¹⁾		48 h EC 50 ¹⁾		NOEC ¹⁾	
	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	1.5 1.4-1.7	2.0 1.9-2.2	1.0 0.95-1.1	1.3 1.2-1.4	0.56	0.56
DIPA	>180 <560	>180 <560	>180 <320	>180 <320	180	180
DEHP ²⁾	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	>10 <16	>10 <16	>10 <16	>10 <16	10	10
2,6-DMQ	>18 <32	30 27-32	>10 <32	18 17-20	10	10
2,4-DCA	1.7 1.4-1.9	5.3 4.8-5.8	1.3 1.1-1.5	4.0 3.6-4.4	0.32	1.0
TCP ³⁾	9.1 7.2-11.3	> 3.2	3.6 2.9-4.5	ca 5.6	ca 1.0 ⁴⁾	ca 0.18 ⁴⁾
TPBS	19 18-20	24 23-25	17 16-18	21 20-22	10	10

1) E: immobilization.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

3) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

4) The NOEC for all effects, including colour and swimming behaviour, was 0.1 mg.l^{-1} in both institutes.

It was very difficult to count the number of immobile animals, because both the portion of animals swimming normally and the swimming speed of the remaining animals decreased with concentration. The test was repeated in both institutes using more stringent criteria for immobilization; these are the results of the latter test.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 1b.

- 1) Twee-daagse toetsen met *D. magna* bleken in principe goed reproduceerbaar tussen RIV en TNO. Hiervoor was nodig dat de te beoordelen effecten tevoren goed werden afgesproken en dat deze effecten door ervaren medewerkers beoordeeld werden.
- 2) Problemen kunnen optreden indien een effect zeer geleidelijk steeds sterker wordt en/of zeer geleidelijk een steeds groter aantal dieren wordt aangetast. De invloed van de persoon die beoordeelt wordt dan gemakkelijk groot.
- 3) Ook indien de te beoordelen effecten optreden in het concentratiegebied waar de oplosbaarheid in water bereikt wordt kunnen problemen optreden, daar de homogeniteit van oververzadigde oplossingen dan mede een rol speelt.
- 4) De onder 2 en 3 genoemde problemen traden te zamen op bij het toetsen van TCP. Nadere afspraken en herhalen van de toets bleken nodig om tot enigszins vergelijkbare resultaten te komen.
- 5) Sterfte van 1 dag oude *D. magna* is - tenzij overduidelijk wegens gedeeltelijke ontbinding - alleen vast te stellen door de dieren bij een zodanige vergroting te bekijken dat te zien is of het hart klopt. Dit is zeer tijdrovend. Ook onbeweeglijkheid, zoals gedefinieerd door de ISO, bleek niet altijd gemakkelijk reproduceerbaar vast te stellen. Dit laatste criterium werd gebruikt in de hier beschreven toetsen. Zodra er echter meerdere problemen optraden, zoals bij TCP, bleek de NOEC afhankelijk van de beoordeelaar.

Table 1c Comparison, between RIV and TNO, of results ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of three-week tests with *Daphnia magna*; P generation (P) after two and three weeks and F₁ generation (F₁) after two weeks.

Compound	2 w LC 50		3 w LC 50		1) NOLC, P, 2 w		1) NOLC, P, 3 w		1) NOLC, F ₁ , 2 w		2) NOEC, P, 2 w		2) NOEC, P, 3 w		2) NOEC, F ₁ , 2 w	
	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.79	0.70	0.41	0.50	0.32	0.32	0.1	0.1	0.1	0.32	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.32
DIPA	0.20-3.3	0.62-0.79	0.32-0.53	0.44-0.56	10	32	10	32	32	100	3.2	1.0	10	10	32	100
DEHP	76-110	130-180	65-98	120-180	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	0.032	0.032	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
2,4-DNT	> 10	20	> 10	19	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	1.0	0.32	1.0	1.0	0.32	0.32
2,6-DMQ	12	14	11	12	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2,4-DCA	2-68	13-16	3-40	11-13	0.1	0.1	0.032	0.032	0.1	0.1	0.032	0.1	0.032	0.1	0.032	0.032
TCP	0.4	1.3	0.2	0.6	0.1	0.1	0.032	0.032	0.1	0.1	0.032	0.1	0.032	0.1	0.032	0.032
TPBS	0.2-0.7	0.9-1.7	0.1-0.3	0.5-0.8	>0.1	>0.32	>0.32	<1.0	0.1	0.32	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	>10	<32	>10	<32	10	10	10	10	3.2	3.2	3.2	1.0	3.2	1.0	1.0	3.2
		18-20		17-19												

1) L: mortality.
 2) E: quantitative reproduction only, unless marked with asterisk; in the latter case the condition of the young is included.
 3) Solubility in water: approximately $0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.
 4) In both institutes some doubtful mortality occurred at concentrations of 0.1 and $0.32 \text{ mg DEHP}\cdot\text{l}^{-1}$ with the F₁ generation. Repeatedly no mortality occurred at $0.032 \text{ mg DEHP}\cdot\text{l}^{-1}$.
 5) The condition of the F₂ generation was slightly worse than that of the F₁ generation.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 1c.

Toetsen met *D. magna*, met sterfte en reproductie als criteria, bleken redelijk goed reproduceerbaar tussen RIV en TNO.

Het grootste verschil in de resultaten bedroeg een factor 3,2. Aangezien dit de rede van de concentratiereeks was, konden kleinere verschillen in NOLC/NOEC-waarden niet voorkomen.

Table 1d Comparison, between RIV and TNO, of results (mg.l^{-1}) of four-day tests with *Poecilia reticulata*.

Compound	2 d LC 50		4 d LC 50		NOEC ¹⁾	
	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	260 210-310	290 230-360	230 190-280	160 130-190	56	56
DIPA	>1000	2400 2100-2700	>1000	1700 1500-1900	100	56
DEHP ²⁾	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	> 16	33 31-34	> 16	25 23-27	1.8	3.2
2,6-DMQ	>5.6 <10	>5.6 <18	>5.6 <10	>5.6 <18	1.0	3.2
2,4-DCA	24 20-29	17 15-19	22 19-27	16 15-19	5.6	5.6
TCP ³⁾	8.0 6.8-9.3	5.7 5.2-6.3	5.5 4.8-6.4	4.0 3.6-4.4	1.0	1.0
TPBS	>18 <32	18 17-19	>10 <32	18 16-19	10	10

1) E: mortality and behaviour.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

3) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij tabel 1d.

- 1) Vier-daagse toetsen met *P. reticulata*, met sterfte en gedrag als criteria, bleken goed reproduceerbaar tussen RIV en TNO.
- 2) Moeilijk kwantificeerbare effecten zoals "traag zwemmen", welke bovendien over een groot concentratiegebied geleidelijk in sterkere mate optraden, bleken hier, evenals bij *D. magna*, het moeilijkst reproduceerbaar te beoordelen. Dit trad vooral op bij 2,6-DMQ en in mindere mate bij 2,4-DNT.

Table 1e Comparison, between RIV and TNO, of results (mg.l^{-1}) of four-week tests with *Poecilia reticulata*.

Compound	1 w LC 50		2 w LC 50		4 w LC 50		NOLC ¹⁾		NOEC ²⁾	
	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	100	110	63	74	46	58	10	32	10	10
	77-130	95-130	48-83	58-94	35-62	45-74				
DIPA	>1000	>320	1130	300	190	120	32	32	32	32
			770-1700	230-380	150-260	94-160				
DEHP ³⁾	> 0.32	>0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	22	19	16	12	6.5	5.8	3.2	1.8 ⁴⁾	3.2	1.8 ⁴⁾
	12-39	17-22	14-17	11-13	4.7-8.9	5.2-6.4				
2,6-DMQ	> 3.2	7.3	>3.2 <10	7.2	>3.2 <10	7.1	3.2	3.2	3.2	1.8 ⁴⁾
		6.5-8.2		6.4-8.1		6.3-8.0				
2,4-DCA	13	13	8.5	8.5	6.5	6.7	3.2	3.2	1.0	0.56 ⁴⁾
	10-16	11-15	6.9-10.4	7.5-9.8	5.1-8.3	5.8-7.6				
TCP ⁵⁾	3.7	3.5	2.8	2.5	2.6	2.2	1.0	1.0	1.0	1.0
	3.0-4.4	3.0-4.2	2.3-3.5	2.2-2.9	2.1-3.2	2.0-2.5				
TPBS	>10 <32	>10 <32	>10 <32	>10 <32	>10 <32	>10 <32	10	10	10	10

1) L: mortality after 28 d exposure.

2) E: mortality and quantitative growth after 28 d exposure.

3) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

4) At TNO 2,4-DNT, 2,6-DMQ and 2,4-DCA were tested with concentrations varying by a factor of 1.8.

5) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij tabel 1e.

- 1) Vier-weekse toetsen met *P. reticulata*, met sterfte en kwantitatief bepaalde groei als criteria bleken goed reproduceerbaar tussen RIV en TNO.
- 2) Bij DIPA was reeds binnen enkele dagen te zien dat de guppen bij concentraties $\geq 100 \text{ mg.l}^{-1}$ niet gezond waren. Sterfte van de duidelijk ongezonde dieren liet echter lang op zich wachten en trad wat eerder op bij TNO dan bij het RIV. Na vier weken waren de verschillen tussen beide instituten nog slechts gering.

3.2. INVLOED VAN DE VISLEEF TIJD OP DE RESULTATEN VAN TOXICITEITSTOETSEN MET JONGE VISSSEN

Toetsen met guppen (*P. reticulata*) zijn reeds gestandaardiseerd binnen Nederland (zie NEN 6504); zij dienen te worden uitgevoerd met 3 à 4 weken oude visjes.

Toetsen met eierleggende vissen worden echter nog niet routinematig binnen Nederland uitgevoerd. Daar deze in andere landen juist veel gebruikt worden, werd in dit project een begin gemaakt met de introductie in Nederland van twee van zulke vissoorten als proefdier voor routinetoetsen, nl. in het RIV de rijstvis (*O. latipes*) en bij TNO de blokkarper (*J. floridae*).

In dit project werd de invloed van de leeftijd van jonge visjes op de toetsresultaten onderzocht. Hiertoe werden de resultaten verkregen met 1 à 2 dagen oude visjes vergeleken met die van visjes van 4 à 5 weken.

De resultaten zijn samengevat in de tabellen 2a en 2b.

Table 2a Comparison between 1-2 day old fish larvae and 4-5 week old fish (*Jordanella floridae*) in four-day tests; results in mg.l^{-1} .

Compound	2 d LC 50		4 d LC 50		NOEC ¹⁾	
	1-2 d	4-5 w	1-2 d	4-5 w	1-2 d	4-5 w
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	420 320-550	470 400-560	220 190-260	250 220-280	56	56
DIPA	1100 980-1300	2500 2100-2900	490 440-560	1600 1400-1900	100	100
DEHP ²⁾	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	\geq 0.32	\geq 0.32
2,4-DNT	25 ³⁾ 22-28	>16 <32	22 ³⁾ 19-25	>16 <32	10	5.6
2,6-DMQ	20 17-24	11 10-13	16 13-18	11 10-13	5.6	3.2
2,4-DCA	16 14-19	11 10-13	6.9 5.9-8.2	8.7 7.4-10	5.6	5.6
TCP ⁴⁾	3.1 2.8-3.5	6.7 5.4-8.2	2.1 1.8-2.4	5.0 4.1-6.1	0.56	1.0
TPBS	22 20-23	20 19-22	21 20-22	20 19-21	5.6	5.6

1) E: mortality and behaviour.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

3) At TNO concentrations greater than 16 mg.l^{-1} were tested by adding more DMSO than the agreed 0.1 ml.l^{-1} .

4) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Table 2b Comparison between 1-2 day old fish larvae and 4-5 week old fish (*Oryzias latipes*) in four-day tests; results in mg.l^{-1} .

Compound	2 d LC 50		4 d LC 50		1) NOEC	
	1-2 d	4-5 w	1-2 d	4-5 w	1-2 d	4-5 w
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	340 280-420	220 170-270	140 120-170	160 120-190	18	32
DIPA	>1000	500 430-580	>1000	480 420-560	100	180
DEHP ²⁾	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	> 16	> 16	> 16	> 16	1.8	1.8
2,6-DMQ	69 57-84	>3.2 <32	39 34-46	>3.2 <32	1.8	1.0
2,4-DCA	> 32	24 21-28	31 23-42	20 18-23	3.2	3.2
TCP ³⁾	53 38-72	>3.2 <10	13 10-18	>3.2 <10	0.32	1.8
TPBS	20 17-23	23 20-27	18 16-21	16 14-18	5.6	5.6

1) E: mortality and behaviour.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

3) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij de tabellen 2a en 2b.

- 1) In het algemeen waren de verschillen in gevoeligheid tussen de 1 à 2 dagen oude dieren en de 4 à 5 weken oude dieren in deze 4-daagse toets gering. (factor kleiner dan of gelijk aan 1,8, de rede van de concentratiereeks).

Alleen voor DIPA en TCP traden in de LC50-waarden grotere verschillen op. Voor DIPA is dit vermoedelijk te wijten aan de traagheid waarmee duidelijk ongezonde dieren stierven (zie ook tabel 1e), waardoor resultaten betreffende mortaliteit in principe slecht reproduceerbaar bleken. (zie par. 6.2.).

Voor TCP zijn de jonge larven vermoedelijk gevoeliger dan de oudere dieren; de stof werkt n.l. vooral in op de embryonale ontwikkeling (zie tabellen 6d en 6e). Overigens waren de toetsen met TCP ook bij andere organismen slecht reproduceerbaar. (zie par. 6.7.).

- 2) Voor vier-daagse toetsen met jonge dieren van eierleggende vissen verdienen de 4-5 weken oude dieren echter de voorkeur om secundaire redenen:

- 1e. een eventuele slechte conditie bij de geboorte ("een slecht nest") is bekend.

- 2e. Er kunnen meer effecten waargenomen worden aan de reeds vrijzwemmende, zichzelf voedende, dieren.

3.3. VERSCHIL IN GEVOELIGHEID VOOR STOFFEN TUSSEN VERSCHILLENDE SOORTEN ALGEN EN VISSSEN

Algen

Een keuze van een geschikte algensoort voor toxiciteitstoetsen is binnen Nederland nog niet gemaakt.

In dit project werden de gevoeligheden van de volgende soorten met elkaar vergeleken:

S. pannonicus, *C. pyrenoïdosa*, *S. capricornutum* (groene algen), *M. aeruginosa* (blauw-groene alg), *E. gracilis* (groene flagellaat) en *S. hantzschii* (diatomee). Met *S. pannonicus* en *C. pyrenoïdosa* was reeds veel ervaring in RIV en TNO en met *S. capricornutum* en *M. aeruginosa* in het RID. *E. gracilis* en *S. hantzschii* werden speciaal voor dit project geïntroduceerd in TNO (zie bijlage G).

De resultaten zijn samengevat in tabel 3a.

Wegens het ontbreken van de resultaten met 4 stoffen en *M. aeruginosa* in een langdurende toets zijn uitsluitend de resultaten van de vier-daagse toetsen bij dit onderwerp betrokken.

Vissen

De levendbarende vissoort *P. reticulata* is in Nederland reeds als standaardtoetsvis voor kortdurend onderzoek gekozen. Toevoeging van eierleggende soorten als mogelijke toetsorganismen wordt echter overwogen, omdat daarmee de invloed op de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling van vissen kan worden onderzocht. Hierbij werden de recente bevindingen van McKim (1977) als uitgangspunt gekozen. Bij vergelijking van de gevoeligheid van 56 levenscyclus-toetsen (200 à 300 dagen) met de corresponderende 30 dagen durende toetsen met vissen in het embryo- en vroeg-juveniele stadium, bleek dat in de meeste gevallen (ca 96%) de minder kostbare 30-dagen toets maximaal slechts een factor 2 minder gevoelig was dan een volledige levenscyclustoets. In dit project werd daarom alleen aandacht besteed aan toetsen met eierleggende vissen in het embryo- en vroeg-juveniele stadium.

Naast vergelijking van de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling van de twee eierleggende vissoorten met de groei van *P. reticulata* gedurende een overeenkomstige proeftijd, werden de drie genoemde vissoorten ook vergeleken in kortdurend onderzoek (4 dagen) met mortaliteit en gedrag als criteria.

De resultaten zijn samengevat in de tabellen 3b en 3c.

Table 3a Comparison of results ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of four-day tests with different algal species.

Compound	EC 50 1)						NOEC 1)					
	<i>S. pann.</i>	<i>C. pyr.</i>	<i>S. capri.</i>	<i>M. aerug.</i>	<i>E. grac.</i>	<i>S. hantz.</i>	<i>S. pann.</i>	<i>C. pyr.</i>	<i>S. capri.</i>	<i>M. aerug.</i>	<i>E. grac.</i>	<i>S. hantz.</i>
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2.6	2.0	5.1	2.2	1.5/0.66 1.1-1.9/ 0.0027-	0.0029	0.32	0.18	0.56	< 0.56	0.10 ⁴⁾	0.001
DIPA	2.5-2.8 190	1.8-2.1 360	4.4-5.9 48	1.8-2.8 4.6	0.56-0.79 > 1000	0.0030 27	100	56	< 5.6	< 3.2	> 1000	1.6
DEHP ²⁾	170-210 > 0.32	270-480 > 0.32	30-77 > 0.32	3.3-6.2 > 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32
2,4-DNT	2.3	3.8	1.6	0.08	9.6	6.2	0.32	0.56	< 0.056	1.0	1.0	1.0
2,6-DMQ	2.2-2.5 25	3.5-4.1 19	1.5-1.8 17	0.07-0.10 15/5.8 13-17/	8.8-11 26	5.8-6.8 30	3.2 ⁴⁾	1.8	< 1.0	1.0	1.0 ⁴⁾	10
2,4-DCA	22-27 11	2.6-140 14	16-18 12/5.6	4.6-7.4 3.9/0.69	20-32 23	25-36 2.2	1.0	1.8	< 3.2	< 0.56	3.2	0.032
TCP ³⁾	10-12 1.5 1.3-1.6	13-15 > 1.0	4.6-6.7 > 1.0	0.21-2.2 > 1.0	21-25 > 1.0	1.5-3.6 0.29 0.25-0.34	0.32	> 1.0	< 1.0	> 1.0	> 1.0	0.056 ⁴⁾
TPBS	42 31-59	19 17-21	113 76-170	61 52-72	119 65-220	41 37-45	10	5.6	< 32	< 32	32	3.2

1) Except for *Chlorella pyrenoidosa*, results of Coulter counter measurements are given. In general the discrepancy between Coulter counter and spectrophotometric measurements was small; if it was greater than a factor 1.8, both results are given, the first being from spectrophotometric measurements and the second from Coulter counter measurements.
For *Chlorella pyrenoidosa* results from spectrophotometric measurements are given (no Coulter counter measurements were made with this species).

2) Solubility in water: approximately $0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

3) Solubility in water: approximately $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

4) Calculated by means of model (see section 2.4.1.2.).

Conclusies en opmerkingen bij tabel 3a.

1) Er waren geen grote verschillen in gevoeligheid voor de onderzochte stoffen tussen de drie groene algen *S. pannonicus*, *C. pyrenoïdosa* en *S. capricornutum*. De blauw-groene alg *M. aeruginosa* was voor 3 van de getoetste stoffen gevoeliger dan de groene algen; deze stoffen bevatten alle het element stikstof. De groene flagellaat *E. gracilis* was even gevoelig of ongevoeliger dan de groene algen.

De diatomee *S. hantzschii* was ook voor 3 van de getoetste stoffen gevoeliger dan de groene algen; voor 2,4-DCA waren zowel *M. aeruginosa* als *S. hantzschii* gevoeliger dan de andere algen.

Bovenstaande conclusies zijn voornamelijk betrokken op de EC50-waarden; in de tabel betreffende de NOEC-waarden komt vaak > of < voor, hetgeen het beoordelen bemoeilijkt. Bovendien is het bepalen van NOEC-waarden onzekerder dan het bepalen van EC50-waarden (zie par. 3.1.). NOEC-waarden behoeven niet gelijk te zijn, indien de EC50-waarden dit zijn; zie hiervoor de onderstaande figuur.

2) Indien aquatische toxiciteitstoetsen met algen en dergelijke organismen uitsluitend met groene algen worden uitgevoerd, zal in vele gevallen de toxiciteit van een stof voor eencellige, autotrofe organismen onderschat worden.

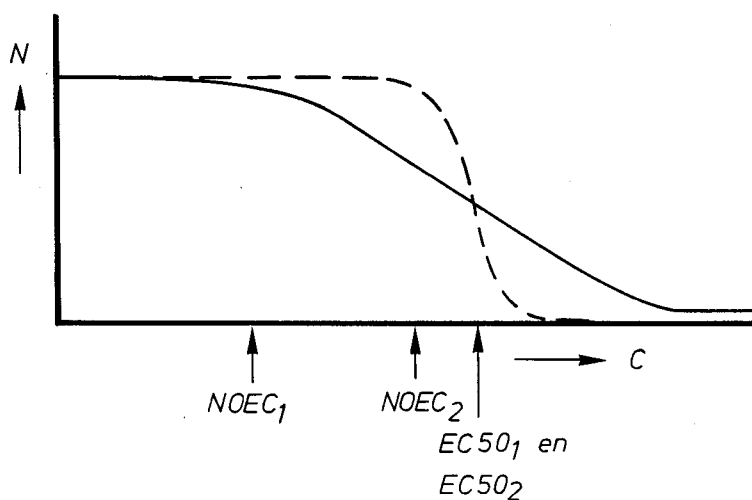


Table 3b Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-day tests with three different fish species; fish of about 4 weeks old.

Compound	2 d LC 50 ⁶⁾		4 d LC 50 ⁶⁾		NOEC ³⁾	
	<i>P. reticulata</i> ¹⁾	<i>J. floridae</i>	<i>P. reticulata</i> ¹⁾	<i>J. floridae</i>	<i>F. reticulata</i> ²⁾	<i>J. floridae</i>
	<i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	290	470	160	250	56	56
DIPA ⁴⁾	2400	2500	1700	1600	100/56	100
DEHP	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	33	>16 <32	25	>16 <32	1.8/3.2	5.6
2,6-DMQ	>5.6 <18	11	>5.6 <18	11	1.0/3.2	3.2
2,4-DCA	17	11	16	8.7	5.6	5.6
TCP ⁵⁾	5.7	6.7	4.0	5.0	1.0	1.0
TPBS	18	20	18	20	10	5.6

1) Results of TNO are given here. They were in agreement with those of RIV (see table 1d), but usually more precise, due to the greater number of concentrations tested at TNO.

2) In case of any discrepancy between TNO and RIV in the NOEC-values, both are given.

3) E: mortality and behaviour; dark pigmentation is not included. Only in the case of DIPA the NOEC for pigmentation was estimated 32 mg.l^{-1} for *Poecilia reticulata*.

4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

5) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

6) For confidence intervals see tables 1d, 2a and 2b.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 3b.

1) In het algemeen waren de verschillen in gevoeligheid tussen de drie vissoorten gering.

Grote verschillen (groter dan een factor 1,8) in LC50- en NOEC-waarden traden op bij DIPA; zie voor een verklaring hiervoor tabel 1e.

Grote verschillen, uitsluitend in de NOEC-waarden, traden op bij 2,4-DNT en 2,6-DMQ; zie hiervoor de verklaring gegeven bij tabel 1d.

2) Voor eenvoudige, vier-daagse, toetsen met vissen is *P. reticulata* (gup) even bruikbaar als de eierleggende soorten *J. floridae* en *O. latipes*.

Table 3c Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-week tests with three different fish species; tests with *Poecilia reticulata* were started with 3-4 week old animals, those of the other fish with eggs, less than 36 h old.

Compound	7 d LC 50			4 w LC 50			NOLC ¹⁾			NOEC ²⁾		
	P.ret. ³⁾	J.flor.	O.lat.	P.ret. ³⁾	J.flor.	O.lat.	P.ret. ³⁾	J.flor.	O.lat.	P.ret. ³⁾	J.flor.	O.lat.
K ₂ Cr ₂ O ₇	110	77	65	58	39	24	32/10	10	10	10	3.2	10
DIPA	90-113	58-101	51-84	40-68	30-49	19-32	32	32	32	32	32	32
	> 320	220	170	120	80	-						
DEHP ⁴⁾	> 0.32	170-290	110-260	94-160	60-110	-	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32	> 0.32
	19	6.9	2.0	5.8	4.9	-	1.8/3.2 ⁵⁾	1.0	1.0	1.8/3.2 ⁵⁾	1.0	1.0
2,4-DNT	17-22	5.4-8.9	1.5-2.7	5.2-6.4	3.8-6.1	-	3.2	3.2	3.2	1.8/3.2 ⁵⁾	0.1	6)
2,6-DMQ	7.3	> 3.2	> 3.2 < 32	7.1	> 3.2 < 10	-	3.2	3.2	3.2	0.56/1.0 ⁵⁾	0.32	0.32
2,4-DCA	6.5-8.2	13	4.0	6.7	0.65	1.0	3.2	3.2	3.2	1.0	0.01	0.01
TCP	11-15	0.51-1.0	2.4-6.8	5.8-7.6	0.46-0.93	0.8-1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3.5	~ 0.1	0.08	2.2	> 0.01	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
TPBS	3.0-4.2	> 3.2 < 32	0.05-0.13	2.0-2.5	< 0.032	-	10	10	10	10	10	10
	> 10 < 32	> 3.2 < 32	> 3.2 < 32	> 10 < 32	> 3.2 < 32	> 3.2 < 32	10	10	10	10	10	10

1) L: mortality after 28 days exposure.
 2) E: mortality and quantitative growth after 28 days exposure.
 3) Results of TNO are given here. They were in agreement with those of RIV (see table 1e). If there was any discrepancy between TNO and RIV in the NOLC/NOEC, both values are given.
 4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .
 5) At TNO 2,4-DNT, 2,6-DMQ and 2,4-DCA were tested with concentrations varying by a factor of 1.8.
 6) Slight, concentration dependent, growth retardation. At 0.1 mg.l^{-1} the growth was not significantly less than that of the control (95% level). The test, however, was carried out only once, and the results have not been verified in *Oryzias latipes*.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 3c.

- 1) Door het ontbreken van gegevens betreffende *O. latipes* bij de helft van de stoffen wordt het oordelen bemoeilijkt.
- 2) Voor 2 à 3 van de onderzochte stoffen, nl. 2,4-DCA, TCP en wellicht ook 2,6-DMQ, bleek de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling van de eierleggende vissen een gevoeliger criterium dan de groei van guppen.
- 3) Voor vergelijking van de criteria sterfte, groei enz. en voor de meest geschikte proefduur wordt verwezen naar de opmerkingen bij de tabellen 6d, 6e en 6f.
- 4) Het verdient de voorkeur langdurende toetsen met vissen uit te voeren met een eierleggende vissoort daar de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling een gevoelig criterium bleek te kunnen zijn.

3.4. VERSCHIL TUSSEN GESCHATTE EN BEREKENDE "NO (OBSERVED) EFFECT CONCENTRATION"

In par. 2.4.1.2. zijn de problemen bij het schatten van NOEC-waarden uit algentoetsen uiteengezet en in par. 2.4.2.2. die voor toetsen met dieren. Het via modellen berekenen van NEC-waarden met betrouwbaarheidsintervallen maakt deze waarde objectief; zo'n NEC kan vanzelfsprekend uitsluitend berekend worden uit gekwantificeerde effecten.

NEC-waarden (verder NLC-waarden genoemd indien het waargenomen effect uitsluitend sterfte was) konden echter niet voor alle uitgevoerde toetsen berekend worden omdat het desbetreffende model niet altijd toepasbaar bleek op de waarnemingen.

Van alle uitgevoerde algentoetsen bleken er slechts vijf geschikt voor het bepalen van NEC-waarden; deze zijn daarom niet gebruikt voor de vergelijking van NOEC- met NEC-waarden. Voorwaarden waaraan algentoetsen dienen te voldoen om een NEC te kunnen berekenen worden gegeven in bijlage H.

Voor geen van de langdurende toetsen met *D. magna* en *O. latipes* konden NLC-waarden berekend worden; ook deze toetsen konden dus niet dienen voor een vergelijking van NOLC- met NLC-waarden. De overige resultaten betreffende kortdurende en langdurende toetsen zijn samengevat in de tabellen 4a respectievelijk 4b.

Table 4a Comparison of NLC-¹⁾ with NOLC-values²⁾ in short-term tests with several animals³⁾; results in mg.l⁻¹.

Compound	<i>Daphnia magna</i> ⁴⁾ (2 d test)			<i>Poecilia reticulata</i> (4 d test)			4 d tests with 1-2 d old larvae			4 d tests with 4-5 w old fish				
	RIV		TNO	RIV		TNO	<i>O. latipes</i>		<i>J. floridae</i>		<i>O. latipes</i>		<i>J. floridae</i>	
	NLC	NOLC	NLC	NLC	NOLC	NLC	NOLC	NLC	NOLC	NLC	NOLC	NLC	NOLC	
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.56	180	0.56	44	56	17	56	32	32	15	32	100		
DIPA		180	180	+61	320	+8	560	≥1000	100	128	180	100		
DEHP ⁵⁾	≥0.32		≥0.32	≥0.32	≥0.32	≥0.32	≥0.32	≥0.32	≥0.32	+282	≥0.32	≥0.32		
2,4-DNT	10		10	≥16	≥16	10	10	≥16	10		≥16	16		
2,6-DMQ	10		10	5.6	5.6	5.6	5.6	18	9.7		3.2	5.6		
2,4-DCA	0.32		1.0	18	10	16	10	+43	+1.4		5.6	5.6		
TCP	0.2	ca 1.0	ca 0.18	+3	1.8	0.64	1.0	3.2			3.2	0.82	1.8	
TPBS	+0.3	4.7	10	+2.7	10	+1.9	10	5.6	5.6		5.6	+1.5	5.6	
	+290		+5.7											

1) No lethal concentration.
 2) No observed lethal concentration.
 3) Almost no NLC values could be calculated from tests with algae.
 4) In tests with *Daphnia magna* L = immobilization.
 5) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l⁻¹.

Table 4b Comparison of NLC-¹⁾ with NOLC-values²⁾ in long-term tests with two fish species³⁾; results in mg.l⁻¹.

Compound	<i>Poecilia reticulata</i>				<i>Jordanella floridae</i>	
	RIV		TNO		NLC	NOLC
	NLC	NOLC	NLC	NOLC		
K ₂ Cr ₂ O ₇	19	10	28	32		10
	<u>+22</u>		<u>+42</u>			
DIPA	32	32	31	32	16	32
	<u>+43</u>		<u>+491</u>		<u>+27</u>	
⁴⁾ DEHP		≥0.32		≥0.32		≥0.32
2,4-DNT		3.2		1.8	2.7	1.0
					<u>+0.6</u>	
2,6-DMQ		3.2		3.2		3.2
2,4-DCA	2.5	3.2		3.2		0.32
	<u>+1.2</u>					
TCP	0.2	1.0		1.0		0.01
	<u>+1.3</u>					
TPBS		10		10		3.2

1) No lethal concentration.

2) No observed lethal concentration.

3) No NLC values could be calculated from long-term tests with *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*.

4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l⁻¹.

Conclusies en opmerkingen bij de tabellen 4a en 4b.

- 1) De "no lethal concentration" (NLC) kon in vele gevallen niet via een model berekend worden voor toxiciteitstoetsen met de gebruikelijke concentratiereeksen.
- 2) Indien een NLC berekend kon worden is de waarde hiervan in het algemeen weinig verschillend van de "no observed lethal concentration" (NOLC). Deze laatste werd wel door de betrokken auteurs in nauw onderling overleg vastgesteld uit de waarnemingsreeksen.

3.5. INVLOED VAN DE BEPALINGSMETHODE VAN DE TOETSCRITERIA OP DE RESULTATEN VAN DE TOXICITEITSTOETSEN

Sommige toetscriteria kunnen op meerdere manieren bepaald of geschat worden; voorzover dergelijke methoden in gebruik waren in de aan het project deelnemende instituten zijn zij met elkaar vergeleken:

- De groei (celvermeerdering) van eencellige algen werd op drie manieren bepaald nl. door meting met een spectrofotometer (absorptiemeting), door meting met een Coulter counter (deeltjesteller) en door visuele schatting van de celdichtheid op basis van de kleurintensiteit.

Niet bij alle algentoetsen werden op meerdere manieren groeimetingen uitgevoerd (zie voor keuze meetmethode bijlage C ad. d en bijlage K); een samenvatting van de toetsen waarbij dit wel gebeurde wordt gegeven in de tabellen 5a en 5b resp. betreffende EC50-waarden en NOEC-waarden.

- Het aantal jonge daphnia's, geboren tussen twee verversingen van de toetsoplossing, werd op twee manieren bepaald nl. door tellen (met de hand) en visueel schatten van de aantallen ten opzichte van het aantal geboren in de controle.

Zowel op grond van de getelde als de geschatte aantallen jongen werd een NOEC voor het criterium reproductie bepaald, voor de P-generatie na 2 weken en 3 weken expositie en voor de F_1 -generatie na 2 weken expositie.

De resultaten zijn samengevat in tabel 5c.

- De groei van vissen werd op drie manieren bepaald bij het einde van de langdurende toetsen, nl. door meten en wegen van de vissen en door visueel schatten van hun grootte ten opzichte van die van de controlevissen.

Via twee van deze methoden, visueel schatten en wegen, werden voor de drie gebruikte vissoorten NOEC-waarden voor het criterium groei bepaald. De resultaten zijn samengevat in tabel 5d. Aangezien het bepalen van de lengte van de vissen in het algemeen eenzelfde NOEC opleverde als het wegen van de vissen, zijn deze waarden niet opgenomen in tabel 5d.

Table 5a Comparison of EC-50 values (mg.l^{-1}) of three different algal species, obtained by two different measuring methods, in four-day tests.

Compound	<i>S. parmonicus</i>		<i>M. aeruginosa</i>		<i>S. capricornutum</i>	
	sp ¹⁾	cc ²⁾	sp ¹⁾	cc ²⁾	sp ¹⁾	cc ²⁾
K ₂ Cr ₂ O ₇	2.8	2.6	2.9	2.2	3.9	5.1
	2.6-3.0	2.5-2.8	2.5-3.2	1.8-2.8	3.0-5.0	4.4-5.9
DIPA	170	190	4.3	4.6	59	48
	160-180	170-210	3.1-5.9	3.3-6.2	46-77	30-77
DEHP ³⁾	> 0.32	> 0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32
2,4-DNT	2.1	2.3	0.11	0.08	1.5	1.6
	2.0-2.3	2.2-2.5	0.09-0.13	0.07-0.10	1.4-1.6	1.5-1.8
2,6-DMQ	19	25	15	5.8	18	17
	17-21	22-27	13-17	4.6-7.4	17-19	16-18
2,4-DCA	11	11	3.9	0.69	12	5.6
	9-14	10-12	3.1-4.8	0.21-2.2	10-14	4.6-6.7
TCP ⁴⁾	1.3	1.5	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TPBS	1.2-1.5	1.3-1.6				
	75	42	72	61	470	110
	61-92	31-59	61-85	52-72	180-1200	76-170

1) sp: spectrophotometer.

2) cc: Coulter counter.

3) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

4) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij tabel 5a.

Het verschil in EC50-waarden, bepaald uit metingen met een spectrofotometer respectievelijk een Coulter counter, was in het algemeen gering, vooral voor *S. pannonicus*. Bij de algen *M. aeruginosa* en *S. capricornutum* werd voor 2 stoffen een verschil gevonden met een factor > 1,8.

Spectrofotometrische metingen hebben echter een aantal beperkingen; zie hiervoor bijlage K.

Table 5b Comparison of NOEC-values (mg.l^{-1}) of four different algal species, obtained by three different measuring methods, in four-day tests.

Compound	<i>Scenedesmus pannonicus</i>						<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			<i>Selenastrum capricornutum</i>			<i>Microcystis aeruginosa</i>		
	TNO		RIV		RIV		RIV			RIV			RID		
	sp ¹⁾	cc ²⁾	vis ³⁾	sp ¹⁾	vis ³⁾	sp ¹⁾	vis ³⁾	sp ¹⁾	vis ³⁾	sp ¹⁾	cc ²⁾	vis ³⁾	sp ¹⁾	cc ²⁾	vis ³⁾
K ₂ Cr ₂ O ₇	1.0	0.32	1.0	0.32	1.0	0.18	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	1.0	0.56	< 0.56	
DIPA	100	100	100	56	180	56	100	< 5.6	< 5.6	< 5.6	< 5.6	10	< 3.2	< 3.2	3.2
DEHP	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	< 1.0	0.32	1.0	0.56	1.0	0.56	1.8	0.56	0.56	0.56	1.8	1.8	< 0.056	< 0.056	< 0.056
2,6-DMQ	< 10	3.26)	< 10	18	18	1.8	5.6	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	1.0	1.0	3.2
2,4-DCA	5.6	1.0	5.6	3.2	10	1.8	10	3.2	< 3.2	< 3.2	< 3.2	< 3.2	< 0.56	< 0.56	
TCP ⁵⁾	0.32	0.32	0.32	0.56	1.8	> 1.0	> 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	> 5.6	> 1.0	> 1.0	> 1.0
TPBS	106)	106)	< 10	1.0	3.2	5.6	10	< 32	< 32	< 32	< 32	32	< 32	< 32	32

1) sp: spectrophotometer.

2) cc: Coulter counter.

3) vis: visual.

4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

5) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

6) Calculated by means of model (see section 2.4.1.2.).

Conclusies en opmerkingen bij tabel 5b.

Bij het bepalen van NOEC-waarden met verschillende meetmethoden traden grote verschillen op. Vooral de visuele waarnemingen gaven aanleiding tot een onderschatting van de invloed van de stoffen op de algen.

Een verschil tussen de bepalingen met de spectrofotometer en die met de Coulter counter is moeilijk aan te geven wegens het geringe aantal waarnemingen met de Coulter counter en de vele "kleiner dan" waarden in de tabellen.

Voor vergelijkingsdoeleinden verdienen de EC50-waarden echter de voorkeur, daar de bepaling van de NOEC-waarde minder betrouwbaar is (bijlage K).

Table 5c Comparison of results (mg.l^{-1}) for number of young (reproduction) with *Daphnia magna*, obtained by visual estimation and accurate counting.

Compound	NOEC, 14 d, P ¹⁾				NOEC, 21 d, P ¹⁾				NOEC, 14 d, F ₁ ¹⁾			
	TNO		RIV		TNO		RIV		TNO		RIV	
	visual count.	count.	visual count.	count.	visual count.	count.	visual count.	count.	visual count.	count.	visual count.	count.
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.01	0.1	0.032	0.1	0.01	0.1	0.032	0.1	0.32	0.32	0.032	0.1
DIPA	< 1.0	1.0	3.2	3.2	< 1.0	10	3.2	10	100	100	10	32
DEHP	0.1	0.32	0.01	0.32	0.1	0.32	0.01	0.32	0.32	0.32	0.01	0.32
2,4-DNT	< 0.32	0.32	1.0	1.0	< 0.32	1.0	1.0	1.0	0.32	0.32	1.0	1.0
2,6-DMQ	< 1.0	1.0	0.32	1.0	1.0	1.0	0.32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2,4-DCA	0.01	0.1	0.032	0.032	< 0.01	0.1	< 0.032	0.032	0.032	0.032	< 0.032	0.032
TCP	0.1	0.1	0.01	0.1	0.1	0.1	0.01	0.1	0.1	0.1	< 0.032	0.1
TPBS	1.0	1.0	3.2	3.2	1.0	10	3.2	3.2	3.2	3.2	0.32	1.0

1) E: reproduction.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 5c.

1) Er konden grote verschillen optreden tussen de NOEC bepaald via visuele waarnemingen en de NOEC bepaald via tellingen van het geboren aantal jongen. De NOEC "visueel" bleek altijd kleiner dan - of gelijk aan - die bepaald via tellingen.

Er zijn verschillende oorzaken aan te wijzen voor deze verschillen:

a. Indien de getelde aantallen bij een bepaalde concentratie niet meer dan 30% afweken van die van de controle werd dit als "no effect" beschouwd, dergelijke verschillen werden echter soms visueel wel waargenomen en als "duidelijk minder dan de controle" aangemerkt.

b. De schattingsprocedure was niet tevoren nauwkeurig afgesproken, hetgeen tot misverstanden aanleiding heeft gegeven.

c. Het visueel schatten bleek achteraf moeilijk en zeer subjectief.

2) Om een NOEC met voldoende zekerheid te kunnen vaststellen bleek het noodzakelijk bij reproductietoetsen met *D. magna* het geboren aantal jongen objectief vast te stellen door tellingen.

3) De reproductietoetsen met *D. magna* gaven verder aanleiding tot de volgende opmerkingen:

a. Automatisering van de tellingen zou bijzonder arbeidsbesparend werken.

b. De proefopzet dient zodanig veranderd te worden dat de resultaten betreffende de reproductie statistisch te verwerken zijn.

c. Reeds lang bestaat bij RIV en TNO de indruk dat het aantal ♀♀ per volume-eenheid de reproductie beïnvloedt. Ook bij deze proefseries werd soms een grotere reproductie dan in de controle gezien bij concentraties waarbij veel ♀♀ gestorven waren en het aantal per l dus < 25 was. Ook aan dit aspect dient aandacht te worden besteed om te komen tot een betere proefopzet.

Table 5d Comparison of results (mg.l^{-1}) for growth with three fish species, obtained by visual estimation and weighing.

Compound	NOEC ¹⁾							
	<i>Poecilia reticulata</i>				<i>Jordanella floridae</i>		<i>Oryzias latipes</i>	
	TNO		RIV		visual	weigh.	visual	weigh.
	visual	weigh.	visual	weigh.				
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	32	10	32		10	3.2	10	10
DIPA	32	100	320	320	32	100		
DEHP ²⁾	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	1.8	3.2	10	10	3.2	3.2		
2,6-DMQ	3.2	1.8	3.2	3.2	1.0	0.1		
2,4-DCA	0.56	0.56	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
TCP	1.0	1.0	3.2	3.2	≥ 0.01	≥ 0.01		
TPBS	10	10	10	10	10	10	10	10

1) E: growth.

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij tabel 5d.

- 1) In het algemeen bleek de visuele schatting van de groei in overeenstemming met de door weging objectief bepaalde groei.
Slechts waar de groeiafname zeer gering was over een groot concentratiegebied traden grote verschillen op tussen beide methoden (2,6-DMQ).
- 2) In het algemeen zal een visuele schatting van de groei voldoende zijn in 4-weekse toetsen, vooral daar de NOEC uiteindelijk tevens bepaald wordt op basis van mortaliteit, wat vaak een even gevoelig criterium bleek als groei. Uit wetenschappelijk oogpunt verdient weging (of meten) de voorkeur. De tijd die dit kost is gering ten opzichte van de voor 4 weken durende toetsen toch al benodigde tijd, terwijl de resultaten van de wegingen statistisch verwerkbaar zijn.

3.6. VERGELIJKING TUSSEN KORT- EN LANGDURENDE TOETSEN; INVLOED VAN SUB- LETALE EFFECTEN ALS CRITERIA OP DE NOEC-WAARDEN

Het bepalen van een optimale proefduur voor de verschillende toetsen was een van de belangrijkste aspecten van dit project. Twee- à vierdaagse toetsen worden nog altijd het meest gebruikt, zijn b.v. als enige vereist in het basis-dossier van de richtlijn 67/548/EEG van de EEG (6e amendement) en zijn in de meeste landen het best gestandaardiseerd. Toetsen met algen worden vrijwel overal gedurende 4 dagen uitgevoerd met celvermeerdering als criterium. Het meeste gebruikte criterium in de "kortdurende" of "acute" toetsen (beide benamingen komen voor) met dieren is sterfte (bij vissen) en onbeweeglijkheid (bij *D. magna*). Daarnaast wordt met name bij toetsen met vissen aanbevolen "alle andere waargenomen afwijkingen ten opzichte van de controle" te vermelden.

Zowel door onderzoekers als ambtelijke beoordelaars wordt echter betwijfeld of kortdurende toetsen wel voldoende zijn om een indruk te krijgen omtrent de mogelijk aquatische toxiciteit van chemicaliën. Daar echter het uitvoeren van langdurende, meer gecompliceerde toetsen met subletale effecten als criteria de kosten van het onderzoek doet stijgen ligt het voor de hand te streven naar een zeker minimum in aantal toetsen, hun proefduur en te meten criteria, waarbij dan toch voldoende zekerheid wordt verkregen omtrent de potentiële effecten van chemicaliën op het aquatisch milieu.

In dit verband werd in dit project onderzoek verricht naar 4 aspecten:

a) Wat is de invloed van verlenging van de proefduur van algentoetsen op de hieruit berekende EC50- en NOEC-waarden. Dit onderzoek werd uitgevoerd met *S. pannonicus* in TNO (voor 7 van de 8 stoffen) en met *M. aeruginosa* in het RID (voor 4 van de 8 stoffen).

De resultaten zijn samengevat in de tabellen 6a en 6b respectievelijk voor *S. pannonicus* en *M. aeruginosa*.

b) Wat is de invloed van verlenging van de proefduur van toetsen met *D. magna* op de met dit organisme te bepalen parameters.

De meest eenvoudige toets met *D. magna* is een zg. acute toxiciteitstoets gedurende 24 à 48 h (afhankelijk van het toetsvoorschrift) (uitgevoerd met dieren die < 24 h oud zijn). Als criterium wordt meestal "onbeweeglijkheid¹⁾" gebruikt, daar sterfte van deze kleine dieren vaak alleen microscopisch is vast te stellen.

1) ISO-definitie (ISO-DIS 6341).

Zodra men de proefduur langer maakt dan 48 h moeten de dieren gevoerd worden (anders sterven ze door voedselgebrek), ze gaan dan groeien en zijn in ca 7 dagen in staat tot productie van jongen. Het ligt dus voor de hand dat in langdurende proeven naast sterfte (in langdurende proeven is dit goed waarneembaar) reproductie wordt bepaald, hetgeen bovendien een belangrijk criterium is.

De dieren krijgen elke 2 à 3 dagen een worp jongen; na 2 weken totale proeftijd zijn er dus ca 3 worpen geboren, terwijl er vervolgens per week ca 3 bijkomen. Daar het tellen van deze jongen zeer arbeidsintensief is worden de kosten van reproductietoetsen voor een groot deel bepaald door het aantal worpen dat geteld moet worden. Daar wegens de spreiding in aantallen jongen per worp en het tijdstip waarop de worpen geboren worden het tellen van minstens drie worpen (of een totale proefduur van 2 weken) een minimum lijkt, werden in dit project de NOEC na 2 weken en de NOEC na 3 weken, beide met sterfte en reproductie als criteria, met elkaar vergeleken en met de NOEC na 2 dagen met onbeweeglijkheid als criterium. Bovendien kan men zich afvragen of een 2e generatie dieren (F_1), geboren in de toetsoplossingen uit ouders (P) die daarin vanaf hun eerste dag verbleven, een andere gevoeligheid heeft dan de eerste generatie. Daarom zijn de NOEC-waarden verkregen met de P-generatie tevens vergeleken met die van de F_1 -generatie na 2 weken proeftijd, beide met sterfte en reproductie als criteria.

Tevens werden de $EC_{50.\infty}$ waarden berekend uit de gegevens van een 2-daagse proef vergeleken met de $LC_{50.\infty}$ waarden berekend uit de gegevens van een 3-weekse proef. Daar deze geëxtrapoleerde waarden lang niet in alle gevallen berekend konden worden, werden tevens de $EC_{50.2d}$ - en $LC_{50.3w}$ -waarden met elkaar vergeleken.

De resultaten zijn samengevat in tabel 6c; voor de conclusies en opmerkingen bij deze tabel is tevens tabel 1c gebruikt.

- c) Wat is de invloed van verlenging van de proefduur van toetsen met de levendbarende vissoort *P. reticulata* (gup) op de met dit organisme te bepalen parameters.

De meest eenvoudige toets met visjes is een z.g. acute toxiciteitstoets gedurende 2 à 4 dagen (afhankelijk van het toetsvoorschrift). In Nederland is hiervoor een 4-daagse toets met guppen (*P. reticulata*), welke 3 à 4 weken oud zijn, gekozen en gestandaardiseerd (NEN 6504).

Sterfte en andere visueel waarneembare afwijkingen van normaal gedrag zijn hierbij de toetscriteria.

Bij verlenging van de proefduur worden de vissen gevoerd; in langdurende toetsen is daarom naast sterfte ook de groei een meetbaar en belangrijk criterium.

Met elkaar werden vergeleken:

de $LC50_{\infty}$ bepaald uit 4-daagse en 4-weekse toetsen; de $LC50_{4d}$ en $LC50_{4w}$; de NOEC na 4 dagen met sterfte en gedrag als criteria en de NOEC na 4 weken met sterfte en groei als criteria, en de NOLC (L = sterfte) na 1, 2, 3 en 4 weken proeftijd.

De resultaten zijn samengevat in tabel 6d.

- d) Wat is de invloed van verlenging van de proefduur van toetsen met eierleggende vissen op de met deze vissen te bepalen parameters.

Bij eierleggende vissen kan een meer op chronische effecten gerichte toets principieel anders van opzet zijn dan de kortdurende toetsen met jonge vissen. Op vrij eenvoudige wijze kan n.l. de embryonale en vroegjuvenile ontwikkeling van de visjes bij de beoordeling betrokken worden. Dergelijke toetsen worden begonnen met zo jong mogelijke eieren (in ieder geval jonger dan 36 h). Allereerst wordt dan de sterfte van de eieren, het tijdstip van uitkomen en het uiterlijk van jonge vissen beoordeeld. Vervolgens zet men de proef voort met de jonge visjes en beoordeelt sterfte en groei, eventueel aangevuld met zwemgedrag en voedselopname. Ook de hartslagfrequentie tijdens de embryonale ontwikkeling kan gemeten worden en kan een gevoelig criterium zijn.

In dit project werd onderzoek verricht aan de rijstvis *O. latipes* door het RIV en de blokkarper *J. floridae* door TNO.

Vergeleken werden de $LC50_{\infty}$, $LC50_{4d}$ en NOEC-waarde berekend uit een 4-daagse toets met jonge vissen met respectievelijk de $LC50_{\infty}$, $LC50_{4w}$ en NOEC-waarde berekend uit een toets met eieren en jonge vissen met een proefduur tot vier weken na het uitkomen van de eieren (in de tabellen genoemd 4-weekse toets).

Tevens werden bepaald de NOEC voor de embryonale ontwikkeling en de NOLC van de jonge vissen (L = sterfte) na 1, 2, 3 en 4 weken. De resultaten zijn samengevat in de tabellen 6e en 6f, respectievelijk voor *J. floridae* en *O. latipes*.

Table 6a Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-day tests and fourteen-day tests with *Scenedesmus pannonicus*; results from TNO, measured with Coulter counter.

Compound	EC 50		NOEC	
	4 d test	14 d test	4 d test	14 d test
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2.6 2.5-2.8	1.8 1.6-2.0	0.32	0.32 ¹⁾
DIPA	190 170-210	490 450-540	100	100
DEHP ²⁾	> 0.32		\geq 0.32	
2,4-DNT	2.3 2.2-2.5	0.75 0.65-0.87	0.32	0.32
2,6-DMQ	25 22-27	11 10-11	3.2 ¹⁾	3.2
2,4-DCA	11 10-12	11 10-12	1.0	< 1.0
TCP	1.5 1.3-1.6	1.5 1.4-1.6	0.32	0.32
TPBS	42 31-59	33 30-36	10	10 ¹⁾

1) Calculated by means of model (see section 2.4.1.2.)

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

Table 6b Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-day tests and eight-day tests with *Microcystis aeruginosa*; results from RID, measured with spectrophotometer.

Compound	EC 50		NOEC	
	4 d test	8 d test	4 d test	8 d test
K ₂ Cr ₂ O ₇	2.9 2.5-3.2	2.5 2.1-2.8	0.56	0.56 ¹⁾
DIPA	4.3 3.1-5.9	2.7 2.2-3.2	< 3.2	< 3.2 ¹⁾
DEHP ²⁾	> 0.32		≥ 0.32	
2,4-DNT	0.11 0.09-0.13	0.12 0.11-0.14	< 0.056	0.056 ¹⁾
2,6-DMQ	15 13-17	17 15-20	1.0	1.0 ¹⁾
2,4-DCA	3.9 3.1-4.8		< 0.56	
TCP	> 1.0		≥ 1.0	
TPBS	72 61-85		32	

1) Calculated by means of model (see section 2.4.1.2.).

2) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij de tabellen 6a en 6b.

- 1) Het zonder meer verlengen van de proefduur van algentoetsen is niet zinvol. Voor discussie betreffende een optimale proefduur van algentoetsen wordt verwezen naar bijlage I.
- 2) De verschillen in NOEC-waarden tussen 4-daagse en 14-daagse toetsen met *S. pannonicus* bleken gering. Bij de EC50-waarden traden soms verschillen op, welke echter altijd kleiner dan een factor 3 waren. Met *M. aeruginosa* werden slechts 4 stoffen langdurend getoetst. Ook hier waren de verschillen in NOEC-waarden gering, terwijl de verschillen in EC50-waarden ten hoogste een factor 2 bedroegen.

Table 6c Comparison of results (mg.l^{-1}) of two-day tests and three-week tests with *Daphnia magna*.

Compound	∞ EC 50 ¹⁾ 2 d test		∞ LC 50 ¹⁾ 3 w test, P		2 d EC 50 ¹⁾ 8)		3 w LC 50, P ¹⁾ 8)		NOEC									
	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	2 d test ²⁾		2 w test ³⁾		3 w test ⁴⁾		2 w test F ₁ ⁵⁾			
									RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.67	0.78	0.12	0.16	1.0	1.3	0.41	0.50	0.56	0.56	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.32	
DIPA	0.58-0.77	0.55-1.1	0.09-0.16	0.04-0.6	>180 <320	>180 <320	80	140	180	180	3.2	1.0	10	10	32	100		
DEHP ⁶⁾			73	140	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.032 ⁷⁾	0.032 ⁷⁾		
2,4-DNT			55-98	120-180	>10 <16	>10 <16	>10	19	10	10	1.0	0.32	1.0	1.0	1.0 ⁹⁾	0.32		
2,6-DMQ			11 9-15	9.3 8.7-10	>10 <32	18	12	10	10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 ⁹⁾		
2,4-DCA	1.0	3.6		0.16	1.3	4.0	0.2	0.6	1.0	0.032	0.1	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032		
TCP	0.85-1.2	3.1-4.2		0.11-0.23	ca 5.6	3.6	>0.1 <0.32	>0.32 <1.0	1.0	0.18	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
TPBS	17 16-18	20 19-21			17	21	>10 <32	18	10	10	3.2	1.0	3.2	10	1.0	3.2		

1) E: immobilization; L: mortality.

2) E: immobilization.

3) E: mortality + quantitative reproduction after two-week exposure of P generation.

4) E: mortality + quantitative reproduction after three-week exposure of P generation.

5) E: mortality + quantitative reproduction after two-week exposure of F₁ generation.

6) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

7) Some doubtful mortality at higher concentration, see table 1c.

8) For confidence intervals see tables 1b and 1c.

9) At 1.0 mg.l^{-1} condition of F₂ generation worse than that of the control; including condition of F₂ was the NOEC 0.32 mg.l^{-1} .

Conclusies en opmerkingen bij tabel 6c, in combinatie met 1c.

- 1) De NOEC-waarden na 3 weken waren meestal veel lager (maximaal een factor 30) dan na 2 dagen; de LC50-waarden verschilden minder (maximaal een factor 7). Dit feit werd veroorzaakt door de invloed van de stoffen op de reproductie.
- 2) Uit tabel 1c en 6c blijkt, dat de NOEC vaak kleiner was dan de NOLC, dus reproductie was vaak een gevoeliger criterium dan sterfte.
De NOEC voor het criterium reproductie bleek voor alle stoffen na twee weken kleiner dan of gelijk aan die na drie weken te zijn; met andere woorden, het lijkt voldoende om de eerste 3 à 4 worpen jongen te tellen (deze worden binnen 2 weken geboren in normaal verlopende toetsen) om een effect op de reproductie te vinden.
De NOLC na twee weken bleek voor zes van de acht stoffen gelijk aan die na drie weken (P-generatie). Bij $K_2Cr_2O_7$ en 2,4-DCA trad nog veel sterfte op in de derde proefweek.
In beide instituten trad bij DEHP en TPBS in de toets gedurende twee weken met de F_1 -generatie sterfte op bij een lagere concentratie dan bij de P-generatie.
Voor 6 van de 8 stoffen was na 2 weken toetsen (P-generatie) met mortaliteit en reproductie als criteria de minimum NOEC bereikt.
Voor DEHP en 2,4-DCA was dit niet duidelijk het geval.
Bij DEHP trad in de F_1 -generatie nog wat sterfte op; zowel bij RIV als bij TNO bestaat echter enige twijfel hierover, daar deze sterfte gering was en onverwacht laat optrad.
Bij 2,4-DCA trad bij TNO nog in de 3e week (P-generatie) sterfte op. Toetsen met 2,4-DCA bleken slecht reproduceerbaar. 2,4-DCA is echter inderdaad een stof waarbij de effecten vaak pas in langdurende toetsen gezien worden. (zie par. 6.6.).
- 3) Een redelijke indruk omtrent de invloed van stoffen op *D. magna* werd verkregen in toetsen van 2 weken met mortaliteit en reproductie, kwantitatief bepaald (zie tabel 5c), als criteria. Verlenging van de proefduur met uitsluitend mortaliteit als criterium of voortzetting van de toets met de F_1 -generatie gaf in een enkel geval een lagere NOEC.

Table 6d Comparison of results ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of four-day tests and four-week tests with *Poecilia reticulata*.

Compound	∞ LC 50				4 d LC 50 ¹⁾ 4 w LC 50 ¹⁾				NOEC ²⁾				NOLC						
	4 d test		4 w test		RIV	TNO	RIV	TNO	4 d test		4 w test		1 w test	2 w test		3 w test		4 w test	
	RIV	TNO	RIV	TNO					RIV	TNO	RIV	TNO		RIV	TNO	RIV	TNO	RIV	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	220	46	41	53	230	160	46	58	56	56	10	32	32	32	32	10	32	10	32
	180-270	7-290	27-63	39-72	>1000	1700	190	120	32	56	32	>1000	>320	32	32	32	32	32	32
DIPA		1400	33	50															
		1100-1700	18-61	32-76															
DEHP ³⁾					>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32	>0.32
2,4-DNT					>16	25	6.5	5.8	1.8	3.2	3.25)	1.8	3.2	5.6	3.2	5.6	3.2	3.2	1.8
2,6-DMQ				7.0	>5.6	>5.6	>3.2	7.1	1.0	3.2	3.25)	1.8	3.2	5.6	3.2	5.6	3.2	3.2	3.2
				6.4-7.7	<10	<18	<10												
2,4-DCA	21	16	6.0	6.1	22	16	6.5	6.7	5.6	5.6	1.0	0.56	10	3.2	10	3.2	3.2	3.2	3.2
	17-25	14-18	4.3-8.2	5.2-7.3															
TCP ⁴⁾	4.4	3.3	2.6	2.2	5.5	4.0	2.6	2.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3.1-6.3	2.7-4.0	2.1-3.2	1.9-2.5															
TPBS		17			>10	18	>10	>10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		16-18			<32	<32	<32	<32											

1) For confidence intervals see tables 1d and 1e.

2) E: four-day test: mortality and behaviour; four-week test: mortality and quantitative growth.

3) Solubility in water: approximately $0.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

4) Solubility in water: approximately $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

5) These values are greater than those after four days, because behaviour is not included in the NOEC after four weeks.

Including behaviour the NOEC, after four weeks, is equal to that after four days.

Conclusies en opmerkingen bij tabel 6d.

- 1) De NOEC na 4 weken was vaak weinig verschillend van de NOEC na 4 dagen. Vooral het (zwem)gedrag van de vissen bleek een gevoelig criterium; de resultaten waren hier al snel zichtbaar. Het is echter wel een subjectief criterium, hetgeen de bruikbaarheid vermindert. Zeer goede onderlinge afspraken zijn nodig om tot reproduceerbare gegevens omtrent dit gedrag te komen. Bovendien leidden gedragsafwijkingen zelfs niet altijd tot een verminderde groei (zie bij RIV b.v. 2,4-DNT en 2,6-DMQ). Alleen voor $K_2Cr_2O_7$ en 2,4-DCA was de NOEC na 4 weken duidelijk lager dan na 4 dagen. De LC50.4w bleek in alle gevallen kleiner dan de LC50.4d.
- 2) Alleen voor 2,4-DCA was de NOEC na 4 weken (betrokken op sterfte en groei) bij het RIV en TNO lager dan de NOLC na 4 weken (alleen betrokken op sterfte). Voor $K_2Cr_2O_7$ was dit alleen bij TNO het geval.
- 3) Voor twee van de acht stoffen, 2,4-DCA en $K_2Cr_2O_7$, bleek langdurend toetsen dus zinvol om een indruk omtrent hun effect op guppen te krijgen; dit effect was bij 2,4-DCA vooral groeivermindering en bij $K_2Cr_2O_7$ voortgezette sterfte (delayed mortality). Voor de andere stoffen was bij langdurende toetsen sterfte een even gevoelig criterium als groei.
- 4) Voor de meeste gevallen lijkt 3 weken een voldoende lange proefduur voor langdurende toetsen met guppen met sterfte, groei en eventueel gedrag als criteria.

Table 6e Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-day tests with 4-5 week old fish¹⁾ and egg larval tests with *Jordanella floridae*.

Compound	∞ LC 50		4 d LC 50		4 w LC 50		NOEC ³⁾		NOEC egg develop- ment	NOLC			
	4 d test	4 w test	2)	2)	2)	2)	4 d test	4 w test		1 w test	2 w test	3 w test	4 w test
K ₂ Cr ₂ O ₇	34	30	250	39	56	3.2	≥ 1000	32	10	10	10	10	
DIPA	0.4-2700	24-37	1600	80	100	32	1000	100	32	32	32	32	
DEHP ⁴⁾	1200	50	790-1800	60-110	>0.32	>0.32	>0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	
2,4-DNT	790-1800	20-110	>0.32	>0.32	5.6	1.0	10	3.2	1.0	1.0	1.0	1.0	
2,6-DMQ	4.8	3.8-6.1	>16	4.9	3.2	0.1	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	
2,4-DCA	11	10-13	11	>3.2	3.2	0.1	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	
TCP	7.8	0.65	8.7	0.65	5.6	0.32	3.2	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	
TPBS	6.3-9.7	0.46-0.93	5.0	>0.01 <0.032	1.0	0.01	1.0	>0.01	<0.1	>0.01	<0.1	>0.01	
	4.5		20	>3.2	5.6	3.2	10	<0.01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	
	3.4-6.0		20	>3.2	5.6	3.2	10	10	3.2	3.2	3.2	3.2	
	18-21												

1) Based on conclusion of table 2a.
 2) For confidence intervals see tables 2a and 3c.
 3) E: four-day test: mortality and behaviour; four-week test: egg development, mortality and quantitative growth.
 4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

Table 6f Comparison of results (mg.l^{-1}) of four-day tests with 4-5 week old fish¹⁾ and egg-larval tests with *Oryzias latipes*.

Compound	∞ LC 50		4 d LC 50		4 w LC 50		NOEC ³⁾		NOEC egg develop- ment	NOELC			
	4 d test	4 w test	2)	2)	2)	2)	4 d test	4 w test		1 w test	2 w test	3 w test	4 w test
K ₂ Cr ₂ O ₇	110	17	160	24	32	10	32	10	> 100	10	10	10	10
DIPA	80-150	12-32	480	5)	180	≤ 100	100	100	100	100			
DEHP ⁴⁾	420-560		> 0.32	> 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT			> 16	5)	1.8	≤ 1.0	3.2	3.2	3.2	1.0			
2,6-DMQ			> 3.2	5)	1.0	≤ 1.0	1.0	1.0	1.0	3.2			
2,4-DCA	0.6		20	1.0	3.2	0.32	3.2	3.2	3.2	1.0	0.32	0.32	0.32
TCP		0.4-0.9	> 3.2	5)	1.8	≤ 0.032	0.1	0.1	0.1	0.032			
TPBS			16	> 3.2	5.6	3.2	10	10	10	3.2	3.2	3.2	3.2

1) Based on conclusion of table 2b.
 2) For confidence intervals see tables 2b and 3c.
 3) E: four-day test mortality and behaviour; four-week test: egg development, mortality and quantitative growth.
 4) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .
 5) For four compounds the test was terminated seven days after birth of young, due to excessive mortality in the controls.

Conclusies en opmerkingen bij de tabellen 6e en 6f.

- 1) De LC50.4w bleek in alle gevallen kleiner dan de LC50.4d, bij TCP werd zelfs een verschil met een factor 150 vastgesteld.
- 2) Het uitkomen van de eieren was meestal geen gevoeliger criterium dan sterfte van jonge visjes.
- 3) De NOLC na 2 weken was in alle gevallen gelijk aan de NOLC na 4 weken, m.a.w. voor het criterium sterfte is een proefduur van 2 weken na uitkomen van de eieren voldoende.
- 4) De NOEC na 4 weken (betrokken op sterfte en groei) van $K_2Cr_2O_7$ en 2,6-DMQ bleek voor *J. floridae* lager dan de NOLC (uitsluitend betrokken op sterfte) na 4 weken.
Voor *O. latipes* was in alle gevallen de NOEC gelijk aan de NOLC na 4 weken, maar met deze vissoort werden slechts 4 stoffen langdurend getoetst (waaronder $K_2Cr_2O_7$).
- 5) Een periode van twee weken na uitkomen van de eieren lijkt voldoende ter beoordeling van sterfte. Het is echter de vraag of de visjes dan voldoende gegroeid zijn om groeiverschillen te kunnen vaststellen en om ze nauwkeurig genoeg te kunnen wegen.

3.7 VERGELIJKING VAN DE GEVOELIGHEID VAN ALGEN, DAPHNIA MAGNA EN VISSSEN

Tot slot werd een vergelijking gemaakt tussen de gevoeligheden voor de stoffen van een aantal gebruikte organismen, zowel in kortdurend als in langdurend onderzoek.

In tabel 7a zijn de resultaten van kortdurend onderzoek (tot maximaal 4 d) samengevat; zowel EC50/LC50- als NOEC-waarden zijn hier gebruikt. Het aantal organismen bij deze vergelijking werd beperkt tot 4; de redenen hiervoor zijn vermeld bij de tabel.

In tabel 7b zijn de NOEC-waarden, bepaald voor alle gemeten effecten, uit langdurend (ca 4 weken) onderzoek samengevat. Het aantal organismen werd hier beperkt tot 5; de redenen hiervoor zijn vermeld bij de tabel.

Uit de tabellen 7a en 7b werden de tabellen 7c, 7d, 7e en 7f afgeleid. (Andere organismen dan die gebruikt in de tabellen 7a en 7b konden dus de tabellen 7c, 7d, 7e en 7f niet beïnvloeden.). Er wordt op gewezen dat de niet verwerkte resultaten welke zijn behaald met *S. hantzschii* in enkele gevallen de tabellen 7c t/m 7f en de conclusies bij de tabellen 7a t/m 7f zouden hebben beïnvloed (n.l. voor $K_2Cr_2O_7$, 2,4-DCA en voor TCP, stoffen waarvoor *S. hantzschii* bijzonder gevoelig was).

Table 7a Comparison of results (mg.l^{-1}) of short-term tests with two algal species¹⁾, *Daphnia magna* and the fish *Poecilia reticulata*²⁾.

Compound	<i>Scenedesmus pannonicus</i> ³⁾		<i>Microcystis aeruginosa</i> ³⁾		<i>Daphnia magna</i> ⁴⁾		<i>Poecilia reticulata</i> ⁴⁾	
	EC 50 ⁵⁾	NOEC ⁵⁾	EC 50 ⁵⁾	NOEC ⁵⁾	2 d EC 50 ⁶⁾	NOEC ⁶⁾	4 d LC 50	NOEC ⁷⁾
K ₂ Cr ₂ O ₇	2.6	0.32	2.2	< 0.56	1.3	0.56	160	56
DIPA	190	100	4.6	< 3.2	>180 <320	180	1700	56
DEHP ⁸⁾	> 0.32	≥ 0.32	> 0.32	≥ 0.32	> 0.32	≥ 0.32	> 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	2.3	0.32	0.08	< 0.056	>10 <16	10	25	3.2
2,6-DMQ	25	3.2	5.8	1.0	18	10	>5.6 <18	3.2
2,4-DCA	11	1.0	0.69	< 0.56	4.0	1.0	16	5.6
TCP ⁹⁾	1.5	0.32	> 1.0	> 1.0	ca 5.6	ca 0.18	4.0	1.0
TPBS	42	10	61	< 32	21	10	18	10

1) *Scenedesmus pannonicus* was chosen because there is international agreement about green algae as test organisms and no great discrepancies in sensitivity were found between the three green algae used (see table 3a).

Microcystis aeruginosa was chosen because this alga was in general the most sensitive one in these tests.

2) *Poecilia reticulata* was chosen because there was no great discrepancy in sensitivity between the three fishes used in short-term tests (see table 3b).

3) Results from Coulter counter measurements.

4) Results of TNO are given here; they were in general agreement with those of RIV (see table 1b).

5) E: growth.

6) E: immobilization.

7) E: mortality and behaviour.

8) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

9) Solubility in water: approximately 1 mg.l^{-1} .

Table 7b Comparison of results (mg.l^{-1}) of long-term tests with two algal species¹⁾, *Daphnia magna* and two fish species²⁾.

Compound	NOEC, 4 d ⁴⁾		NOEC, 3-4 w		
	<i>S. pannonicus</i> ³⁾	<i>M. aeruginosa</i> ³⁾	<i>D. magna</i> ⁵⁾	<i>J. floridae</i> ⁶⁾	<i>P. reticulata</i> ⁷⁾
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.32	< 0.56	0.1	3.2	10
DIPA	100	< 3.2	1.0/3.2	32	32
DEHP ⁸⁾	≥ 0.32	≥ 0.32	0.32	≥ 0.32	≥ 0.32
2,4-DNT	0.32	< 0.056	0.32/1.0	1.0	1.8/3.2
2,6-DMQ	3.2	1.0	1.0	0.1	1.8/3.2
2,4-DCA	1.0	< 0.56	0.032	0.32	0.56/1.0
TCP	0.32	> 1.0	0.1	0.01	1.0
TPBS	10	< 32	1.0/3.2	3.2	10

- 1) *Scenedesmus pannonicus* and *Microcystis aeruginosa* were chosen; for reasons see table 7a. Results of four-day tests were used, because these were more complete than those of eight/fourteen-day tests.
- 2) *Poecilia reticulata* and *Jordanella floridae* were chosen; *Poecilia reticulata* because this is already a frequently used fish and *Jordanella floridae* because the results with this egg-laying fish were more complete than those with *Oryzias latipes*.
- 3) Results from Coulter counter measurements.
- 4) E: growth.
- 5) E: mortality (three-week exposure) and reproduction (two-week exposure) (compare tables 1c and 6c).
Both results, from TNO and RIV, are given if there was any discrepancy.
- 6) E: embryonic development, mortality and growth (four-week exposure after birth of young).
- 7) E: mortality and growth (four-week exposure).
Both results, from TNO and RIV, are given if there was any discrepancy.
- 8) Solubility in water: approximately 0.3 mg.l^{-1} .

Table 7c Lowest NOEC-values in short-term and long-term tests ¹⁾
 All tests mentioned in tables 7a and 7b included

compound	short-term test		long-term test ²⁾		NOECs ³⁾
	NOEC	org.	NOEC	org.	NOEC1
K ₂ Cr ₂ O ₇	< 0.56	<i>M. aerug.</i>			
	0.32	<i>S. pann.</i>	0.1	<i>D. magna</i>	3.2
DIPA	< 3.2	<i>M. aerug.</i>	< 3.2	<i>M. aerug.</i>	
DEHP	≥ 0.32	4)	0.32	<i>D. magna</i>	≥ 1
2,4-DNT	< 0.056	<i>M. aerug.</i>	< 0.056	<i>M. aerug.</i>	
2,6-DMQ	1.0	<i>M. aerug.</i>	0.1	<i>J. floridae</i>	10
2,4 DCA	< 0.56	<i>M. aerug.</i>	0.032	<i>D. magna</i>	< 18
TCP	0.18	<i>D. magna</i>	0.01	<i>J. floridae</i>	18
TPBS	ca 10	5)	1.0	<i>D. magna</i>	10

1) For the algae results of 4-day tests were used in both cases (see Annex I).

2) For *D. magna* results of 3-week tests with the P generation were used.

3) "s" : short-term test; "l" : long-term test.

4) All NOEC-values ≥ 0.32 mg.l⁻¹ (the solubility of DEHP in water).

5) All NOEC-values about equal.

Table 7d Lowest NOEC-values in short-term and long-term tests ¹⁾,
exclusive of tests with *Microcystis aeruginosa*

compound	short-term test		long-term test		NOECs ²⁾
	NOEC	org.	NOEC	org.	NOEC1
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.32	<i>S. pann.</i>	0.1	<i>D. magna</i>	3.2
DIPA	56	<i>P. ret.</i>	1.0	<i>D. magna</i>	56
DEHP	≥ 0.32	3)	0.32	<i>D. magna</i>	≥ 1
2,4-DNT	0.32	<i>S. pann.</i>	0.32	<i>S. pann./D. magna</i>	1
2,6-DMQ	3.2	<i>S. pann./P. ret.</i>	0.1	<i>J. floridae</i>	32
2,4-DCA	1.0	<i>S. pann./D. magna</i>	0.032	<i>D. magna</i>	32
TCP	0.18	<i>D. magna</i>	0.01	<i>J. floridae</i>	18
TPBS	10	4)	1.0	<i>D. magna</i>	10

1) For the algae results of 4-day tests were used in both cases (see Annex I).

2) "s": short-term test ; "l": long-term test.

3) All NOEC-values ≥ 0.32 mg.l⁻¹ (the solubility of DEHP in water).

4) All NOEC-values about equal.

Table 7e Differences between least sensitive and most sensitive organisms in short-term tests (EC50-/LC50-values)

compound	exclusive of <i>M. aerug.</i>		inclusive of <i>M. aerug.</i>	
	$\frac{\text{highest L(E)C50}}{\text{lowest L(E)C50}}$	organisms	$\frac{\text{highest L(E)C50}}{\text{lowest L(E)C50}}$	organisms
$K_2Cr_2O_7$	$\frac{160}{1.3} = 120$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$	$\frac{160}{1.3} = 120$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$
DIPA	$\frac{1700}{190} = 9$	$\frac{P. retic.}{S. pann.}$	$\frac{1700}{4.6} = 370$	$\frac{P. retic.}{M. aerug.}$
2,4-DNT	$\frac{25}{2.3} = 11$	$\frac{P. retic.}{S. pann.}$	$\frac{25}{0.08} = 310$	$\frac{P. retic.}{M. aerug.}$
2,6-DMQ	$\frac{25}{7.4} = 3$	$\frac{S. pann.}{P. retic.}$	$\frac{25}{5.8} = 4$	$\frac{S. pann.}{M. aerug.}$
2,4-DCA	$\frac{16}{4} = 4$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$	$\frac{16}{0.69} = 20$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$
TCP	$\frac{5.6}{1.5} = 4$	$\frac{D. magna}{S. pann.}$		1)
TPBS	$\frac{42}{18} = 2$	$\frac{S. pann.}{P. retic.}$	$\frac{61}{18} = 3$	$\frac{M. aerug.}{P. retic.}$

1) Results of *M. aeruginosa* were given as >1.0.

Table 7f Differences between least sensitive and most sensitive organisms in long-term tests (NOEC-values)

compound	exclusive of <i>M. aerug.</i>		inclusive of <i>M. aerug.</i>	
	$\frac{\text{highest NOEC}}{\text{lowest NOEC}}$	organisms	$\frac{\text{highest NOEC}}{\text{lowest NOEC}}$	organisms
$K_2Cr_2O_7$	$\frac{10}{0.1} = 100$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$	$\frac{10}{0.1} = 100$	$\frac{P. retic.}{D. magna}$ 1)
DIPA	$\frac{100}{1.0} = 100$	$\frac{S. pann.}{D. magna}$	$\frac{100}{1.0} = 100$	$\frac{S. pann.}{D. magna}$ 1)
2,4-DNT	$\frac{3.2}{0.32} = 10$	$\frac{P. retic.}{S. pann.}$	$\frac{3.2}{<0.056} = > 56$	$\frac{P. retic.}{M. aerug.}$
2,6-DMQ	$\frac{3.2}{0.1} = 32$	$\frac{S. pann.}{J. flor.}$	$\frac{3.2}{0.1} = 32$	$\frac{S. pann.}{J. flor.}$
2,4-DCA	$\frac{1.0}{0.032} = 32$	$\frac{S. pann.}{D. magna}$	$\frac{1.0}{0.032} = 32$	$\frac{S. pann.}{D. magna}$ 1)
TCP	$\frac{10}{0.01} = 100$	$\frac{P. retic.}{J. flor.}$	$\frac{>1.0}{0.01} = >100$	$\frac{M. aerug.}{J. flor.}$
TPBS	$\frac{10}{1.0} = 10$	$\frac{P. retic./S. pann.}{D. magna}$	$\frac{10}{1.0} = 10$	$\frac{P. retic./S. pann.}{D. magna}$

1) Results of *M. aeruginosa* were given as "<"; they might have influenced the figure given.

Conclusies en opmerkingen bij de tabellen 7a t/m 7f

1. In kortdurende toetsen (met een maximale proefduur van 4 d) bleek voor bijna alle stoffen *M. aeruginosa* het gevoeligst te zijn (tabellen 7a en 7c).
2. In langdurende toetsen (met een maximale proefduur tot 6 weken) bleek *D. magna* viermaal, *J. floridae* tweemaal en *M. aeruginosa* tweemaal het gevoeligste organisme te zijn, gebaseerd op NOEC-waarden (tabellen 7b en 7c).
3. Bij beschouwingen omtrent de gevoeligheden van de verschillende organismen onderling (tabellen 7c t/m 7f) neemt *M. aeruginosa* dus een sleutelpositie in. Deze tabellen bevatten daarom zowel de resultaten mét als die zónder *M. aeruginosa*.

Deze indeling van de tabellen is gekozen, omdat de resultaten met *M. aeruginosa* slechts van één instituut afkomstig waren, waardoor niets over de reproduceerbaarheid bekend is, en de resultaten vaak waren opgegeven met "<".

4. De laagste NOEC uit langdurend onderzoek bleek voor de helft van de stoffen minstens tienmaal lager te zijn dan de laagste NOEC uit kortdurend onderzoek (tabel 7c), welke laatste vooral werd bepaald door de gevoeligheid van *M. aeruginosa*. Indien de toetsen met *M. aeruginosa* buiten beschouwing worden gelaten (tabel 7d) dan bleek in kortdurende toetsen voor vier van de stoffen de eencellige groene alg *S. pannonicus* het gevoeligst te zijn, waarvan éénmaal samen met *D. magna* en éénmaal samen met *P. reticulata*; éénmaal was *D. magna* het gevoeligst en éénmaal *P. reticulata*, terwijl in twee gevallen alle organismen ongeveer even gevoelig waren.

In langdurend onderzoek bleek *D. magna* zesmaal het gevoeligst te zijn, waarvan éénmaal samen met *S. pannonicus* terwijl *J. floridae* voor de overige twee stoffen het gevoeligst was.

5. Indien de resultaten met *M. aeruginosa* buiten beschouwing worden gelaten dan bleken de verschillen in gevoeligheid van de organismen onderling in kortdurend onderzoek vaak gering te zijn (\leq factor 10). Alléén voor $K_2Cr_2O_7$ bleek *D. magna* 100x gevoeliger te zijn dan de vissen (tabel 7e).

Indien ook *M. aeruginosa* bij deze beschouwing wordt betrokken bleken de verschillen voor een aantal stoffen toe te nemen (DIPA, 2,4-DNT en 2,4-DCA) (tabel 7e).

In tabel 7e werden EC50/LC50-waarden gebruikt daar deze nauwkeuriger bekend zijn dan de NOEC-waarden.

6. In langdurend onderzoek bleken de verschillen in gevoeligheid van de organismen in het algemeen groot te zijn (\geq factor 30) (tabel 7f).

Wel of niet toevoegen van *M. aeruginosa* maakt hier weinig uit daar in langdurende toetsen de NOEC voor *D. magna* met betrekking tot sterfte en reproductie en de NOEC voor *J. floridae* met betrekking tot embryonale en vroegjuvenile ontwikkeling meestal de laagste waren.

In tabel 7f werden NOEC-waarden gebruikt daar langdurend onderzoek vooral wordt uitgevoerd ter bepaling van NOEC-waarden.

4. CONCLUSIES

4.1. TOETSEN MET ALGEN

- De drie soorten eencellige groene algen (*C. pyrenoidosa*, *S. pannonicus* en *S. capricornutum*) vertoonden weinig verschil in gevoeligheid voor de onderzochte stoffen. In vergelijking tot de groene algen bleek de groene flagellaat *E. gracilis* even gevoelig of ongevoeliger, terwijl de blauw-groene alg *M. aeruginosa* en de diatomee *S. hantzschii* voor bepaalde stoffen beduidend gevoeliger waren. Het uitvoeren van toetsen met groene algen alléén, zoals momenteel internationaal is voorgesteld, kan derhalve aanleiding geven tot onderschatting van de toxiciteit van een stof voor deze groep van organismen.
- Betreffende de bepalingmethoden voor het vaststellen van effecten van stoffen op de groei van de organismen kan gesteld worden dat kwalitatieve meetmethoden (visuele waarnemingen) niet voldeden, daar deze aanleiding gaven tot onderschatting van de toxiciteit.
De toetsresultaten verkregen met de kwantitatieve meetmethoden (spectrofotometer en Coulter counter) liepen niet sterk uiteen. Het gebruik van de Coulter counter verdient echter de voorkeur, aangezien spectrofotometrie gevoelig is voor storingen door bacterie-groei en door absorpties veroorzaakt door de toetsverbinding.
De effecten van chemische stoffen op algen kunnen zich manifesteren als effecten op de ent, groeisnelheid en biomassa. Een model waarbij alléén een effect op de groeisnelheid verondersteld werd, paste in de meeste gevallen goed bij de metingen en werd daarom toegepast.
- Voor de groene algen bleek een toetsduur van 4 dagen voldoende voor het vaststellen van effecten op de groeikromme; een langere toetsduur gaf niet méér informatie en kon bovendien aanleiding geven tot onregelmatigheid in de groeikrommen o.a. door verzuring van het medium en het optreden van nutriëntlimitaties. Voor de overige soorten *E. gracilis*, *M. aeruginosa* en *S. hantzschii* dient de toetsduur langer dan 4 dagen te zijn om tot volledige groeikrommen te komen. Indien echter het effect op de groeisnelheid als criterium wordt gehanteerd is de toetsduur in principe niet relevant voor het te bereiken resultaat; dan wordt immers de toetsduur alleen bepaald door het aantal metingen dat nodig geacht wordt voor het vaststellen van de groei snelheid.

4.2. TOETSEN MET KREEFTACHTIGEN

- Het bleek dat visueel schatten van het effect van een stof op de reproductie zeer subjectief was en vaak tot overschatting van de toxiciteit leidde. Daarom is het noodzakelijk het geboren aantal jongen bij reproductietoetsen met *D. magna* objectief door tellingen vast te stellen, waarbij het wenselijk geacht wordt deze op automatische wijze te verrichten (arbeidsbesparend).
- De toetsen dienen op zodanige wijze te worden uitgevoerd dat de resultaten statistisch verwerkbaar zijn (subjectieviteit-verlagend).
- Gebaseerd op de NOLC- en NOEC-waarden kon vastgesteld worden dat reproductie meestal een gevoeliger criterium is dan sterfte, zeker indien de proefduur tot ca twee weken bekort wordt.
- Een proefduur van ca twee weken (of minimaal de tijd nodig voor drie worpen) is gebleken voldoende te zijn voor het vaststellen van effecten van een stof op de reproductie; voor de effecten op de sterfte kan verlenging van de proefduur echter soms nodig zijn.

4.3. TOETSEN MET VISSSEN

- In 4-daagse toetsen bleken de drie getoetste vissoorten *P. reticulata*, *O. latipes* en *J. floridae* in het algemeen even gevoelig; ook tussen 1 à 2 dagen oude en 4 à 5 weken oude vissen van één soort (*O. latipes* en *J. floridae*) zijn geen belangrijke verschillen waargenomen. Ofschoon op grond hiervan geen voorkeur bestaat ten aanzien van soort en leeftijd van de vissen, is het aan te raden de 4-daagse toetsen uit te voeren met een vissoort, die op eenvoudige wijze in grote hoeveelheden te kweken is. Wel bestaat een voorkeur voor ca 4 weken oude vissen aangezien dan de kwaliteit van de vissen bekend is en criteria zoals zwemgedrag beter bestudeerd kunnen worden.
- In langdurende toetsen bleek *P. reticulata* voor een aantal stoffen minder gevoelig dan de 2 eierleggende vissoorten. Derhalve verdient in langdurende toetsen een eierleggende vissoort de voorkeur boven een levendbarende.

- Het visueel schatten van de groei van vissen leverde resultaten op, welke niet of nauwelijks afweken van die, verkregen m.b.v. kwantitatieve bepalingmethoden (i.c. weging). Derhalve zijn kwantitatieve bepalingen van de groei alleen nodig indien een statistische verwerking van de resultaten wenselijk geacht wordt.
- In kortdurende toetsen bleek (zwem)gedrag vaak een veel gevoeliger criterium dan sterfte. De bruikbaarheid hiervan wordt echter enigszins verminderd doordat gedragseffecten uitsluitend subjectief bepaald worden.
- Voor de eierleggende vissen bleek een toetsduur van ca 4 weken na het uitkomen van de eieren zeker voldoende om een indruk te krijgen omtrent de effecten van een stof op de sterfte, het (zwem)gedrag en de groei.

4.4. NOEC-VERSUS NEC-BEPALINGEN

- De "No Observed Effect Concentrations" (NOEC), zoals door de onderzoekers geschat uit de waarnemingen, bleken in het algemeen goed in overeenstemming met de "No Effect Concentrations" (NEC) voorzover deze berekend konden worden met het gebruikte model. Deze berekeningen resulteren in een objectieve NEC met betrouwbaarheidsinterval en verdienen daarom de voorkeur. Het berekenen bleek echter met de gebruikte toetsmethoden niet altijd mogelijk, aangezien soms onvoldoende concentraties met partiële effecten voorhanden waren. Tenzij de toetsmethoden worden aangepast zal dus in de meeste gevallen volstaan moeten worden met een NOEC. Teneinde deze betrouwbaar te kunnen schatten is het wel noodzakelijk de waar te nemen effecten en hun interpretatie in de toetsvoorschriften vast te leggen.

4.5. REPRODUCEERBAARHEID

Van een aantal toetsen werd de reproduceerbaarheid onderzocht. Deze bleken in het algemeen goed reproduceerbaar, met uitzondering van die gevallen waarin sprake is van:

- a) het meten van effecten in een concentratiegebied, waarin de oplosbaarheid van de stof ligt en
- b) vlakke concentratie-effect-relaties en
- c) resultaten gebaseerd op subjectief bepaalde effecten.

4.6. GEVOELIGHEID VAN TOETSORGANISMEN

In kortdurend onderzoek bleken algen gevoelige organismen te zijn. Voor de helft van de stoffen werd de laagste NOEC bereikt met een eencellige groene alg. De blauwgroene alg *M. aeruginosa* en de diatomee *S. hantzschii* waren bovendien voor bepaalde stoffen bijzonder gevoelig.

Toevoegen van toetsen met *M. aeruginosa* en/of *S. hantzschii* aan een standaardpakket toxiciteitstoetsen verdient daarom nadere overweging.

In langdurend onderzoek bleken in het algemeen ca 3 weekse toetsen met *D. magna*, met mortaliteit en reproductie als criteria, of ca 4 weekse toetsen met een eierleggende vissoort, met embryonale en vroeg-juvenile ontwikkeling als criteria, de laagste NOEC's op te leveren.

Om een indruk te krijgen omtrent de schadelijkheid van een stof voor waterorganismen zijn dus toetsen waarin species van de drie hoofdgroepen (algen, kreeftachtigen, vissen) vertegenwoordigd zijn noodzakelijk.

4.7. KORTDUREND VERSUS LANGDUREND ONDERZOEK

Het verschil in NOEC's uit kortdurend (ca 4 d) en langdurend (max. 6 w) onderzoek is vanzelfsprekend afhankelijk van het gekozen pakket organismen. Met betrekking tot de in dit project uitgevoerde toetsen bleek de NOEC uit langdurend onderzoek te variëren van even hoog als die uit kortdurend onderzoek tot 56x lager, beide indien toetsen met *M. aeruginosa* niet in deze beschouwing werden betrokken. Indien toetsen met *M. aeruginosa* wel bij deze beschouwing worden betrokken bleek de NOEC uit langdurend onderzoek maximaal 18x lager te zijn dan die uit kortdurend onderzoek.

4.8. VOORSTEL VOOR EEN COMBINATIE VAN TOETSEN

Uit het onderzoek blijkt dat bij een combinatie van de volgende toetsen een redelijke zekerheid wordt verkregen omtrent de mogelijke invloed van stoffen op algen, daphnia's en vissen:

- Een groeitoets gedurende ca vier dagen met een eencellige groene alg bijv. *Scenedesmus pannonicus*, de eencellige blauwgroene alg *Microcystis aeruginosa* en/of de diatomee *Stephanodiscus hantzschii*.
- Een toets gedurende ca drie weken met de crustacee *Daphnia magna*, met effecten op sterfte en reproductie als criteria.

- Een toets met een eierleggende vissoort, met effecten op de embryonale en vroeg-juvenile ontwikkeling als criteria, gedurende ca vier weken na het uitkomen van de visjes.

Hierbij moet worden opgemerkt dat deze conclusie is gebaseerd op onderzoek met slechts acht modelstoffen, een beperkt aantal toetsorganismen en een maximale proefduur van zes weken.

Om een indruk te geven over de verhouding tussen kosten en verkregen NOEC, is in de volgende paragraaf een kosten/baten-analyse opgesteld voor een aantal combinatiemogelijkheden van toetsen.

5. KOSTEN-BATEN-ANALYSE

Deze paragraaf heeft tot doel enig inzicht te geven in de relatie tussen de minimum NOEC-waarden uit verschillende combinaties van toxiciteitstoetsen en de daaraan verbonden kosten.

Van 9 toetsen (zie tabel 8a) werden 8 combinaties gemaakt, welke òf reeds veel gebruikt worden òf volgen uit de voorgaande paragraaf.

Deze combinaties waren:

1. 4-daagse groeitoets met een eencellige groene alg (b.v. *S. pannonicus*).
2-daagse toets met *D. magna* (onbeweeglijkheid).
4-daagse toets met een vissoort (sterfte en gedrag) (b.v. *P. reticulata*).
2. Gelijk aan 1, uitgebreid met
4-daagse groeitoets met de eencellige blauw-groene alg *M. aeruginosa*.
3. Gelijk aan 2, uitgebreid met
7-daagse groeitoets met een diatomee b.v. *S. hantzschii*.
4. 4-daagse groeitoets met *S. pannonicus*
2-weekse toets met *D. magna* (sterfte, gedrag, groei en reproductie)
ca 4-weekse toets met een eierleggende vissoort (bijv. *J. floridae*)
(sterfte en abnormale ontwikkeling tijdens de embryogenese, uitkomen van de eieren; sterfte en gedrag van de geboren visjes gedurende 2 weken).
5. Gelijk aan 4, waarbij de duur van de toets met *D. magna* en de vissoort verlengd worden tot 3 respectievelijk 6 weken en groei van de visjes is toegevoegd als criterium.
6. Gelijk aan 4, uitgebreid met
4-daagse groeitoets met *M. aeruginosa*.
7. Gelijk aan 6, uitgebreid met
7-daagse groeitoets met *S. hantzschii*.
8. Gelijk aan 5, uitgebreid met
4-daagse groeitoets met *M. aeruginosa*
7-daagse groeitoets met *S. hantzschii*

De combinaties 1 t/m 3 kunnen binnen één week worden uitgevoerd. Voor de andere zijn 4 à 6 weken nodig. Voor elk van deze 8 combinaties (pakketten toetsen) werd de laagste gevonden NOEC bepaald voor elk van de 8 modelstoffen (tabel 8b.).

Vervolgens worden in tabel 8c per pakket gegeven:

de kosten en de gewogen gemiddelde NOEC voor alle stoffen.

De kosten zijn, zowel met als zonder chemische analyse tijdens de toetsen, bepaald op basis van de in het RIV benodigde manuren voor het uitvoeren van de toetsen. Deze kosten zijn exclusief rapportage en begeleiding van de analisten en zijn een gemiddelde; immers sommige stoffen zijn bewerkelijker en moeilijker te analyseren dan andere in dergelijke toetsen. Voor de uren benodigd in het RIV werd gekozen, omdat alleen in dat instituut de toetsen met algen en dieren door dezelfde personen worden uitgevoerd, zodat de hiervoor benodigde uren vergelijkbaar zijn.

De wegingscoëfficiënten voor elke stof zijn zo gekozen dat deze omgekeerd evenredig zijn met de som van de NOEC-waarden van de 8 toetspakketten.

Deze kosten-baten-analyse berust slechts op de resultaten van het onderhavige onderzoek met 8 modelstoffen. Grote voorzichtigheid ten aanzien van het trekken van algemene conclusies is geboden.

Tabel 8a NOEC-waarden van de 8 toetsverbindingen, bepaald in 9 verschillende toetsen (mg.l^{-1}).

Toets ¹⁾	NOEC ²⁾							
	$K_2Cr_2O_7$	DIPA	DEHP	2,4-DNT	2,6-DMQ	2,4-DCA	TCP	TPBS
4d. <i>S.pamn</i> (Cc)	0,32	100	$\geq 0,32$	0,32	3,2	1,0	0,32	10
4d. <i>M.aerug</i> (Cc)	<0,56	<3,2	$\geq 0,32$	<0,056	1,0	<0,56	>1,0	<32
4d. <i>S.hantz.</i>	0,001	1,6	$\geq 0,32$	1,0	10	0,032	0,056	3,2
2d. <i>D.magna</i>	0,56	180	$\geq 0,32$	10	10	0,32 / 1,0	1,0/0,18	10
14d. <i>D.magna</i>	0,1	3,2/1,0	0,32	1,0/0,32	1,0	0,032/0,1	0,1	3,2/1,0
21d. <i>D.magna</i>	0,1	10	0,32	1,0	1,0	0,032	0,1	3,2/10
4d. <i>P.retic.</i>	56	100/56	$\geq 0,32$	1,8/3,2	1,0/3,2	5,6	1,0	10
4w. <i>J.flor.</i>	10	32	$\geq 0,32$	1,0	3,2	0,32	>0,01	<0,1 3,2
6w. <i>J.flor.</i>	3,2	32	$\geq 0,32$	1,0	0,1	0,32	0,01	3,2

1) Voor beschrijving zie samenstellingen toetspakketten.

2) Bij opgave van 2 waarden is de eerste van RIV en de tweede van TNO.

Tabel 8b Overzicht van de "gevoeligheid" van de verschillende pakketten

Pakket nr.	Laagste NOEC in betreffende pakket (mg.l ⁻¹)							
	K ₂ Cr ₂ O ₇	DIPA	DEHP	2,4-DNT	2,6-DMQ	2,4-DCA	TCP	TPBS
1	0,32	100/56	≥0,32	0,32	1,0/3,2	0,32/1,0	0,32/0,18	10
2	0,32/<0,56	<3,2	≥0,32	<0,056	1,0	<0,56/0,32	0,32/0,18	10
3	0,001	<3,2/1,6	≥0,32	<0,056	1,0	0,032	0,056	3,2
4	0,1	3,2/1,0	0,32	0,32	1,0	0,032/0,1	>0,01 <0,1	3,2/1,0
5	0,1	10	0,32	0,32	0,1	0,032	0,01	3,2
6	0,1	<3,2	0,32	<0,056	1,0	0,032/0,1	>0,01 <0,1	3,2/1,0
7	0,001	<3,2/1,6	0,32	<0,056	1,0	0,032/0,1	>0,01 <0,1	3,2/1,0
8	0,001	<3,2/1,6	0,32	<0,056	0,1	0,032	0,01	3,2

Tabel 8c Kosten-baten-analyse.

Pakket	Gewogen gem. NOEC (mg.l ⁻¹)	Kosten (gulden)	
		incl. chem. analyse	excl. chem. analyse
1	0,41	10.290	5.760
2	0,23	13.740	8.010
3	0,06	17.190	10.260
4	0,11	18.510	11.580
5	0,10	21.390	14.460
6	0,07	21.960	13.830
7	0,06	25.410	16.080
8	0,03	28.290	18.960

6. DISCUSSIE BETREFFENDE DE MODELSTOFFEN

6.1. KALIUMBICHROMAAT ($K_2Cr_2O_7$)

6.1.1. Chemische aspecten

De oplosbaarheid van $K_2Cr_2O_7$ in water is voldoende om stamoplossingen in het toetsmedium te bereiden. Bij alle verwerkte toetsen weken de gehalten, voor en na verversen niet meer dan 30% af van de nominale gehalten.

Afhankelijk van de pH kan zeswaardig chroom voorkomen in water in verschillende vormen (Stumm & Morgan, 1970), hetgeen de toxiciteit kan beïnvloeden. Ook de hardheid van het water kan de toxiciteit van chroom beïnvloeden.

Daar alle toetsen tijdens dit project volgens gestandaardiseerde methoden werden uitgevoerd, lijkt het niet waarschijnlijk dat verschillen in pH en hardheid de resultaten beïnvloed kunnen hebben.

6.1.2. Biologische aspecten

Bij het onderzoek met algen viel de extreme gevoeligheid van *S. hantzschii* op; de gevoeligheid van de groene algen was ongeveer gelijk aan die van *D. magna* in kortdurend onderzoek. Zowel in kortdurend als in langdurend onderzoek bleek $K_2Cr_2O_7$ ongeveer 100x giftiger te zijn voor crustaceeën dan voor vissen; voor beide soorten bleek de NOEC na 4 weken ca 5,6 x lager dan die na 4 dagen. Hoewel de NOEC van $K_2Cr_2O_7$ niet spectaculair daalt bij verlenging van de proefduur c.q. bestudering van subletale effecten is dit toch duidelijk een stof waarvan nog effecten naar voren komen bij wat langere proeftijden.

De laagste NOEC-waarde in onderhavig onderzoek werd gevonden met *S. hantzschii*, nl. $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$.

De acute toxiciteit voor *D. magna*, bepaald in het RIV was wat lager dan die bepaald in TNO. Het verschil was gering, maar treedt wel altijd op zodra beide instituten de gevoeligheid van $K_2Cr_2O_7$ voor *D. magna* vergelijken (zie bijv. rapport CL 78/13).

Wanneer de resultaten van de algentoetsen vergeleken worden met die uit de literatuur dan blijken deze globaal genomen met elkaar overeen te komen: Volgens Bringmann & Kühn (1980) is de NOEC van $K_2Cr_2O_7$ voor *Scenedesmus quadricauda* $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

Eerder interlaboratoriumonderzoek binnen Nederland met de in dit project gebruikte groene algen gaf EC50-waarden van 1,03 tot 2,88 mg.l⁻¹ (Hanstveit e.a. 1979). Hetzelfde resultaat heeft Wium-Andersen (1974) gevonden met *C. pyrenoïdosa* en een diatomee. In een internationale ringtoets (ISO) waaraan 11 laboratoria deelnamen, werden voor diverse groene algen EC50-waarden tussen 0,041 en 6,28 mg.l⁻¹ gevonden. Dit grote gebied werd voornamelijk veroorzaakt door verschillen in methode en medium (Hanstveit, 1980).

Hollibaugh e.a. (1980) vonden voor mariene fytoplankton- en diatomeeën-soorten NOEC-waarden in het gebied van 0,008 tot 0,3 mg.l⁻¹, waarbij de ondergrens in de buurt komt van de in dit project gevonden laagste waarde van 0,001 mg.l⁻¹.

Betreffende *D. magna* werd in het EEG-ringonderzoek uit 129 bepalingen in 47 laboratoria een gemiddelde EC50.24h van 1,5 mg.l⁻¹ gevonden, hetgeen redelijk in overeenstemming is met de in dit project gevonden waarden.

In het ISO-ringonderzoek, waaraan ca 20 laboratoria deelnamen, bleek de LC50.24h voor *Brachydanio rerio* (zebravis) te variëren tussen 94 en 480 mg.l⁻¹ en de LC50.96h tussen 51 en 174 mg.l⁻¹; deze waarden zijn wat lager dan die gevonden in onderhavig onderzoek en vergelijkbaar met die uit de literatuur (30-170 mg.l⁻¹: McKee and Wolf, 1963; Middlebrooks e.a., 1973; Hughes, 1973; Cairns e.a., 1965; Dowden and Bennett, 1965).

6.2. DIISOPROPYLAMINE (DIPA)

6.2.1. Chemische aspecten

De oplosbaarheid van DIPA in water bleek voldoende om de stamoplossingen in het toetsmedium te bereiden. Wel verhoogde DIPA de pH van de media in ernstige mate; deze werd vóór het introduceren van de toetsorganismen met zoutzuur op de oorspronkelijke waarde van het medium gebracht.

In alle verwerkte toetsen met dieren waren de gehalten bepaald vóór en na verversen binnen de gestelde grens van ± 30% in overeenstemming met de nominale gehalten.

Bij de algentoetsen in het RIV bleken de lagere gehalten bij het einde van de proef nog slechts ca 50% te zijn van de beginconcentraties.

Ook in het RID werd een duidelijke afname geconstateerd van de concentraties bij het onderzoek met algen.

Bij TNO bleek reeds op $t = 0$ slechts 50% van het nominale gehalte aanwezig te zijn in de toets met *S. hantzschii*; hiervoor werd gecorrigeerd alvorens de resultaten verwerkt werden.

6.2.2. Biologische aspecten

De blauw-groene alg *M. aeruginosa* was bijzonder gevoelig voor DIPA (NOEC < $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$). Ook de NOEC voor de diatomee *S. hantzschii* was erg laag ($1,6 \text{ mg.l}^{-1}$). Indien deze twee, niet routinematig gebruikte, soorten buiten beschouwing worden gelaten bleek *D. magna* in kortdurend onderzoek ongeveer even gevoelig te zijn als de andere getoetste algen, terwijl deze organismen ongeveer 10 x gevoeliger waren dan de vissen.

In langdurend onderzoek bleek het verschil tussen het meest en minst gevoelige organisme een factor 100 te bedragen. *D. magna* was het gevoeligst; de stof had vooral een vertragende invloed op de productie van jonge dieren. Bij het onderzoek met vissen traden duidelijk ongunstige effecten op bij veel lagere concentraties dan die waarbij acute sterfte optrad. De dieren waren donker gekleurd, in slechte conditie, en aten niet. Desondanks duurde het vaak lang voor ze stierven; het tijdstip van sterfte was slecht reproduceerbaar.

De laagste NOEC in onderhavig onderzoek bleek $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ te zijn, gevonden met *D. magna*. Hierbij moet echter worden opgemerkt dat voor enkele algen de NOEC niet nauwkeurig bekend is (opgegeven als "<").

Met betrekking tot de toxiciteit van DIPA voor waterorganismen werden in de literatuur nauwelijks gegevens gevonden.

Bringmann en Kühn (1980) vonden NOEC-waarden voor een aantal alkyl-aminen met *S. quadricauda* in het gebied $0,3\text{-}2,2 \text{ mg.l}^{-1}$, aanzienlijk lager dan in onderhavig onderzoek voor DIPA werd gevonden.

Uit twee artikelen (Gilette e.a., 1952; Ryerman e.a., 1966) blijkt de letale concentratie van DIPA na 24 h voor vissen ca 60 mg.l^{-1} te zijn. Een vergelijking van de gevonden gegevens met de resultaten verkregen uit dit onderzoek kan echter niet gemaakt worden daar toevoeging van DIPA de pH van het medium verhoogt, hetgeen de toxiciteit verhoogt. Voor dit project werd afgesproken de pH van alle toetsoplossingen met zoutzuur te corrigeren alvorens de proeforganismen te introduceren.

6.3. DI(2-ETHYLHEXYL)FTALAAT (DEHP)

6.3.1. Chemische aspecten

DEHP is slecht oplosbaar in water; het werd aan de media toegevoegd via geconcentreerde oplossingen in DMSO (0,1 ml.l⁻¹).

Zoals in het algemeen geldt voor slecht in water oplosbare stoffen is de exacte oplosbaarheid moeilijk te bepalen. Volgens bepalingen in het RIV zou deze ca 1 mg.l⁻¹ zijn. Aanvankelijk werden gehalten tot deze waarde getoetst. Bij concentraties $\geq 560 \mu\text{g.l}^{-1}$ bleek de stof echter niet goed oplosbaar. Uiteindelijk zijn de toetsen beoordeeld t/m een concentratie van 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$, waarbij niet werd waargenomen dat de toetsoplossingen inhomogeen waren. Volgens Hollifield (1979) zou de oplosbaarheid van DEHP in water 285 $\mu\text{g.l}^{-1}$ zijn, hetgeen goed in overeenstemming is met de waarnemingen in het onderhavige onderzoek.

Uit chemische analyse van de waterfase bleek het gehalte in enkele toetsen laag te zijn geweest (10 à 50% van de nominale waarde is voorgekomen); vooral de gehalten in toetsoplossingen vlak voor het verversen, waarbij veel gesuspendeerd materiaal aanwezig was, waren soms laag. De oorzaak hiervan is vermoedelijk adsorptie van DEHP aan de wanden van de proefvaten, aan voedsel en voedselresten e.d. Onjuiste doseringen zijn niet voorgekomen volgens de beschikbare analyse-resultaten.

6.3.2. Biologische aspecten

Acute effecten van DEHP werden niet gevonden; zelfs bij concentraties tot en met 1 mg.l⁻¹ (welke niet in par. 3 gerapporteerd zijn, daar de oplosbaarheid bij nader inzien slechts op ca 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$ werd geschat) werden géén effecten gevonden op de algen en de vissen. Het onderzoek met algen werd om deze reden beperkt tot enkele proeven. Ook in de langdurende toetsen met vissen werden geen effecten gevonden.

Bij het onderzoek met *D. magna* traden wel effecten op. Bij concentraties > 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$ dreven de dieren gedurende grote gedeelten van de proeftijd. Zij groeiden zeer onregelmatig en kregen te weinig jongen. Dit hoeft niet primair door de toxiciteit van DEHP veroorzaakt te zijn; voedselgebrek - door het drijven kunnen ze geen voedsel verzamelen - kan deze effecten ook veroorzaakt hebben. Het drijven op zich werd wel veroorzaakt door de aanwezigheid van, vermoedelijk onopgelost, DEHP.

Daar achteraf werd besloten de toetsen slechts t/m een gehalte aan DEHP van

320 $\mu\text{g.l}^{-1}$ te beoordelen, is b.v. de NOEC voor mortaliteit en reproductie van *D. magna* opgegeven als $\geq 320 \mu\text{g.l}^{-1}$ voor de P-generatie.

Bij voortzetten van de toetsen met een 2e generatie (F_1) van *D. magna* onder dezelfde omstandigheden, bleek er tegen het einde van de proef nog sterfte op te treden bij gehalten van 100 en 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$; de NOEC voor de F_1 -generatie werd derhalve op 32 $\mu\text{g.l}^{-1}$ gesteld. Dit was de laagste NOEC gevonden in onderhavig onderzoek. De toetsen met DEHP bleken niet goed reproduceerbaar te zijn en nader onderzoek van deze stof zou nodig zijn.

Een overzicht betreffende de aquatische toxiciteit wordt o.a. gegeven door de EPA in de "ambient water quality criteria" PB 296804. Uit dit overzicht blijkt dat er geen sterfte van waterorganismen optreedt tot de oplosbaarheidsgrens in water (LC50-waarden opgegeven als ">" tientallen mg.l^{-1} komen voor). Andere auteurs vinden eveneens geen sterfte tot de oplosbaarheidsgrens (o.a. Linden e.a., 1979). Ook beoordeling van "subletale criteria" in kortdurend onderzoek is vaak uitgevoerd aan emulsies van DEHP in water (Pfuderer & Francis, 1975; Sugawara, 1974) en wordt daarom hier buiten beschouwing gelaten.

Betreffende langdurend toxiciteitsonderzoek met *D. magna* vonden Sanders e.a. (1973) reeds bij 3 μg toegevoegd ftalaat per l 60% remming van de reproductie. Dit werd niet bevestigd in dit project. De toetsmethode gebruikt door Sanders week echter op belangrijke punten af van de in dit project gebruikte, zodat een vergelijking moeilijk is te maken.

Over de invloed van DEHP op de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling van vissen zijn enkele tegenstrijdige gegevens bekend:

Voor forellen werden - in een doorstroomsysteem - bij 14 $\mu\text{g.l}^{-1}$ effecten op de embryonale en vroeg-juveniele ontwikkeling gevonden (Mehrle & Mayer, 1976); voor *Pimephales promelas* werden géén effecten op deze ontwikkeling gevonden bij een verzadigde oplossing van DEHP in water (Smith, 1980).

Dit laatste onderzoek is in overeenstemming met de resultaten behaald met *J. floridae* en *O. latipes* in het onderhavig project.

6.4. 2,4-DINITROTOLUEEN (2,4-DNT)

6.4.1. Chemische aspecten

2,4-DNT bleek bij aankomst in het laboratorium ca 50% water te bevatten; dit wordt nl. toegevoegd aangezien de stof in droge vorm explosief is. Daarom werd een bijna verzadigde oplossing van 2,4-DNT in DMSO bereid, waarvan het gehalte bepaald werd door vergelijking met oplossingen met bekend gehalte welke verkregen werden na droging van een kleine hoeveelheid van de stof. Deze oplossing in DMSO bleek 164 g.l^{-1} te bevatten en werd door alle instituten gebruikt als uitgangsooplossing ter bereiding van de toetsoplossingen. De hoogste concentratie die, volgens de gebruikte voorschriften (0,1 ml DMSO per l medium) bereikt kon worden in water was dus $16,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Dit bleek te laag te zijn om sterfte te veroorzaken in kortdurende toetsen. In TNO werd daarom afgeweken van de voorschriften en werden, door toevoegen van grotere hoeveelheden DMSO, hogere concentraties 2,4-DNT in water bereid. Hierdoor konden de LC50-waarden na korte proeftijden berekend worden, maar deze kunnen beïnvloed zijn door de hoge concentraties DMSO. Bij alle verwerkte toetsen weken de gehalten vóór en na verversen niet meer dan ca 30% af van de nominale gehalten.

6.4.2. Biologische aspecten

De eencellige blauw-groene alg *M. aeruginosa* was ook voor 2,4-DNT erg gevoelig (NOEC $< 0,056 \text{ mg.l}^{-1}$). De gevoeligheid van de vier andere eencellige organismen was onderling ongeveer gelijk, met EC50-waarden van enkele mg.l^{-1} . Het verschil in gevoeligheid in kortdurend onderzoek tussen *D. magna* en de vissen was niet groot; deze organismen waren ca 10x minder gevoelig dan de eencellige (met uitzondering van *M. aeruginosa*). Ook indien *M. aeruginosa* buiten beschouwing wordt gelaten werd de laagste NOEC bereikt in een vierdaagse toets met een alg (*S. pannonicus*). Door de grote gevoeligheid van algen in het algemeen voor deze stof werden in langdurend onderzoek met de overige organismen geen lagere NOEC-waarden gevonden. Per organisme afzonderlijk daalde de NOEC ook niet spectaculair bij verlenging van de proefduur. Voor *D. magna* was de NOEC, met als criteria mortaliteit en verlamming, na 2 dagen 10 mg.l^{-1} ; indien echter subjectief te bepalen parameters (uiterlijk, gedrag e.d.) bestudeerd werden, bedroeg de NOEC slechts $1,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Hoewel deze niet kwantificeerbare effecten niet verwerkt zijn in de tabellen was toch reeds in onderzoek van twee dagen duidelijk dat de NOEC bij langdurend onderzoek $\ll 10 \text{ mg.l}^{-1}$ zou worden; deze bleek 0,32 à $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ te zijn.

Ook voor guppen gold dat in het vier-daagse onderzoek, met als criterium zwemgedrag, de NOEC slechts $1,8 \text{ mg.l}^{-1}$ was, terwijl er tot en met 16 mg.l^{-1} géén sterfte optrad. Bij langdurend onderzoek bleek de NOEC voor sterfte en kwantitatief bepaalde groei (op het RIV) $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$ te zijn, terwijl de dieren bij deze concentratie traag waren; dit uitte zich dus niet in vermindering van groei.

Samenvattend kan gesteld worden dat in de toetsen met dieren reeds na zeer korte tijd moeilijk kwantificeerbare effecten gezien werden, die zich zelfs in chronisch onderzoek niet altijd uitten in kwantificeerbare effecten. De laagste NOEC in onderhavig onderzoek was $< 0,056 \text{ mg.l}^{-1}$, gevonden met *M. aeruginosa*.

Er bleek zeer weinig informatie in de literatuur aanwezig te zijn over de toxiciteit van 2,4-DNT voor waterorganismen. Hann en Jensen (1974) geven als LC50.96h. : $10-100 \text{ mg.l}^{-1}$ (Deze bron geeft vaak slechts een globale aanduiding van de aquatische toxiciteit; meestal hebben de gegevens betrekking op vissen).

Bringmann en Kühn (1980) vonden voor *S. quadricauda* een NOEC van $2,7 \text{ mg.l}^{-1}$; dit is hoger dan gevonden in dit project. Volgens OHM-TADS (zie 2.5.) is de LC50.96h voor "fathead minnows" $22,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (de originele literatuur bleek onvindbaar). Deze waarde is in overeenstemming met de resultaten van dit project.

6.5. 2,6-DIMETHYLQUINOLINE (2,6-DMQ)

6.5.1. Chemische aspecten

De oplosbaarheid van 2,6-DMQ in water bleek voldoende om stamoplossingen in het toetsmedium te bereiden.

Bij alle verwerkte toetsen behalve die met *C. pyrenoïdosa* weken de gehalten vóór en na verversen niet meer dan ca 30% af van de nominale gehalten. In de toets met *C. pyrenoïdosa* waren de gehalten op $t = 0$ slechts 50% van de nominale waarden.

6.5.2. Biologische aspecten

De laagste NOEC in kortdurend onderzoek met 2,6-DMQ werd gevonden bij *M. aeruginosa* (1 mg.l^{-1}); de verschillen met de andere getoetste organismen waren gering.

Bij langdurend onderzoek viel de gevoeligheid van *J. floridae* op, waarbij vooral groeivertraging een gevoelig criterium bleek (NOEC: $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$). Dit was de laagste NOEC in onderhavig onderzoek.

Ook over de aquatische toxiciteit van 2,6-DMQ bleken weinig gegevens in de literatuur voorhanden. De stof is o.a. gebruikt bij bestudering van de structuur-effect-relatie van quinolines door Wayne Schultz e.a. (1978), maar het daarbij gehanteerde toxiciteitscriterium (de LC100.24h voor de cilium *Tetrahymena pyriformis*) is weinig relevant voor vergelijking met de gegevens van dit project. Door Dumont e.a. (1979) werd de toxiciteit en teratogeniteit van 2,6-DMQ voor *Xenopus laevis* onderzocht in vierdaagse toetsen. De LC50.96h-waarde was 12 mg.l^{-1} ; bij 25 mg.l^{-1} was 100% van de dieren dood. De EC50 (sterfte en afwijkingen) was $6,5 \text{ mg.l}^{-1}$, terwijl bij 5 mg.l^{-1} 40% van de overlevende dieren abnormaliteiten vertoonden. De gegevens uit dit onderzoek betreffende mortaliteit zijn in overeenstemming met die bepaald met vissen in het onderhavig project.

6.6. 2,4-DICHLLOORANILINE (2,4-DCA)

6.6.1. Chemische aspecten

De oplosbaarheid van 2,4-DCA in water is voldoende om stamoplossingen in het toetsmedium te bereiden.

Bij alle verwerkte toetsen, met uitzondering van de hierna genoemde, weken de gehalten vóór en na verversen niet meer dan ca 30% af van de nominale gehalten. In de langdurende toets met *D. magna* in het RIV trad tussen twee verversingen een daling van ca 50% van de gehalten op. Ook in de toetsen met algen in het RID trad een daling van ca 50% op, terwijl op TNO reeds op $t = 0$ ca 40% te lage gehalten werden gevonden.

6.6.2. Biologische aspecten

De blauw-groene alg *M. aeruginosa* (NOEC $< 0,56 \text{ mg.l}^{-1}$) en de diatomee *S. hantzschii* (NOEC $0,032 \text{ mg.l}^{-1}$) waren gevoeliger voor 2,4-DCA dan de andere getoetste organismen in kortdurend onderzoek.

De groene algen en *D. magna* waren in kortdurend onderzoek ongeveer even gevoelig (NOEC $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$); de vissen waren iets ongevoeliger (NOEC $3,2-5,6 \text{ mg.l}^{-1}$).

2,4-DCA is echter een stof waarvan de effecten nog sterk toenemen bij verlenging van de expositietijd. Sterfte en reproductie van *D. magna* bleken

de gevoeligste criteria te zijn (NOEC $0,032 \text{ mg.l}^{-1}$). Ook voor de verschillende vissoorten was de NOEC bepaald uit langdurend onderzoek ca 10 x lager dan die bepaald uit het kortdurend onderzoek. 2,4-DCA was de enige stof, waarvoor de NOEC betrokken op groei van de guppen lager was dan die betrokken op sterfte. 2,4-DCA werd in RIV en TNO meerdere malen getoetst in langdurende toetsen met *D. magna*. Deze toetsen bleken slecht reproduceerbaar, reeds binnen één instituut. Vooral bij langere expositietijden en bij toetsen met de tweede (F_1) generatie dieren traden soms grote verschillen op. Daar het aspect "reproduceerbaarheid" binnen één instituut géén deel uitmaakte van dit project zijn diè proefresultaten in de tabellen vermeld, die òf het vaakst zijn gevonden òf, indien dit criterium niet aanwezig was, een gemiddelde indruk weergeven van de gevonden waarden.

Ook bij vroeger onderzoek met 3,4-DCA (Adema & Vink, 1981) en bij onderzoek met di-en tri-chloorfenolen (Adema, 1980) werd een dergelijke slechte reproduceerbaarheid van chronische toetsen met *D. magna* geconstateerd.

Betreffende 2,4-DCA werden géén literatuurgegevens gevonden over de toxiciteit voor waterorganismen. Van 3,4-DCA werd in TNO de aquatische toxiciteit bepaald in uitvoerig onderzoek (Adema & Vink, 1981). De toxiciteit van 2,4-DCA voor de algen was geringer dan die van 3,4-DCA. Guppen waren zowel in kort- als in langdurend onderzoek ongeveer even gevoelig voor beide stoffen. De reproductie van *D. magna* bleek beïnvloed te worden bij veel lagere concentraties van 3,4-DCA dan van 2,4-DCA. Blauw-groene algen zijn bijzonder gevoelig voor anilines (Batterton e.a., 1978).

6.7. TRICRESYLFOSFAAT (TCP)

6.7.1. Chemische aspecten

TCP is slecht oplosbaar in water; van de gebruikte modelstof (een mengsel van meerdere componenten) was de oplosbaarheid niet bekend. "Oplossingen" met een concentratie hoger dan 1 mg.l^{-1} waren zichtbaar troebel. Bij HPLC-bepaling met fluorescentiedetectie werden meer dan 10 pieken waargenomen. Daarnaast bleek de stof niet stabiel te zijn in water. Het pieken-patroon in de oplossingen vlak nà en vlak vóór verversen van de toetsoplossingen was niet gelijk; sommige pieken konden verdwijnen terwijl andere groter werden. Een dergelijk snelle degradatie van tricresylfosfaat is ook beschreven door Howard & Padmaker (1979).

Wegens analyse-, oplosbaarheids- en degradatie-problemen met deze stof werd besloten alleen de analyse-resultaten te gebruiken van vers bereide toetsoplossingen met concentraties tussen 0,1 en 1,0 mg.l⁻¹. Binnen dit gebied bleken de vers bereide toetsoplossingen niet meer dan 30% af te wijken van de nominale waarden, waarbij uitgegaan werd van de hoogte van de hoofdpijk. TCP werd gedoseerd aan de toetsoplossingen via geconcentreerde oplossingen in DMSO (0,1 ml.l⁻¹).

6.7.2. Biologische aspecten

Tot de oplosbaarheids grens ($\leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$) werden in kortdurend onderzoek soms wel effecten waargenomen maar deze bleken voor de meeste organismen te gering te zijn om ze nauwkeurig te kunnen bepalen. Met alle organismen werden hogere concentraties dan 1 mg.l⁻¹ getoetst om L(E)C50-waarden te bereiken. Voorzover de hiervoor benodigde toetsoplossingen tenminste een homogeen uiterlijk hadden en er een concentratie-effect-relatie aanwezig was, zijn deze waarden wel in de tabellen vermeld; indien dit niet het geval was zijn de resultaten vermeld als "> 1 mg.l⁻¹".

Het verschil in de resultaten van de kortdurende toetsen met *D. magna* bij TNO en RIV was aanvankelijk veel groter dan dat van de andere stoffen, mogelijk veroorzaakt door verschil in homogeniteit van de toetsoplossingen. Bovendien was het acute effect van TCP op *D. magna* niet duidelijk kwantificeerbaar; er trad een zeer geleidelijke invloed op de beweeglijkheid op welke, hoewel concentratie-afhankelijk, het vaststellen van de NOEC niet eenvoudig maakte. Na overleg tussen beide instituten zijn de toetsen herhaald na zeer goede afspraken over het "scoren" van de effecten. Hierbij werden iets beter vergelijkbare resultaten verkregen hoewel het verschil in NOEC nog steeds groot was (factor 5.6). Een dergelijke ervaring toont aan dat toetsen met slecht in water oplosbare stoffen, met effecten nabij de oplosbaarheid in water, met een vlakke concentratie-effect-relatie en een moeilijk te kwantificeren criterium, slecht reproduceerbaar zijn.

De LC50/EC50-waarden uit kortdurend onderzoek waren niet erg verschillend voor de getoetste organismen en in de grootte-orde van enkele mg.l⁻¹.

Voor de guppen trad geen verlaging op van de NOEC (1 mg.l⁻¹) bij verlenging van de proefduur van 4 dagen naar 4 weken. Ook voor *D. magna* was dit niet het geval; de NOEC uit het reproductie-onderzoek was 0,1 mg.l⁻¹. Dit was echter ook de NOEC uit het tweedaagse onderzoek indien naast mortaliteit en verlamming ook kleur en zwemgedrag werden meebeoordeeld (Deze criteria zijn zo subjectief dat ze voor de tabellen niet gebruikt zijn).

TCP bleek duidelijk invloed te hebben op de embryonale en vroeg-juvenile ontwikkeling van eierleggende visjes. De NOEC na 28d. voor *J. floridae* was $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$, 100x lager dan de NOEC voor guppen. De toets met *O. latipes*, welke 7 in plaats van 28 dagen na het uitkomen van de eieren werd beëindigd, leverde een NOEC van $0,032 \text{ mg.l}^{-1}$ op, hetgeen de met *J. floridae* gevonden resultaten ondersteunde. Voor *O. latipes* was voor deze stof ook de NOEC na 4 dagen met 1 à 2 dagen oude visjes 10x lager dan die met 4 à 5 weken oude visjes, een verschil dat bij géén van de andere stoffen is voorgekomen.

Volgens Dawson e.a. (1977) is de LC50.96h voor "bluegill sunfish" 7000 mg.l^{-1} en voor "tidewater silverside" 8700 mg.l^{-1} . Deze waarden liggen ver boven de oplosbaarheid in water. Deze oplosbaarheid werd niet overschreden door Lockhart e.a. (1975), die langdurend onderzoek met forellen uitvoerden met een verzadigde oplossing in water van een mengsel van tri-arylfosfaten dat voor 75% bestond uit tri-cresylfosfaten. Volgens analyse was het gehalte aan het product in water, gemiddeld over vier maanden proeftijd, $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ (Dit is goed in overeenstemming met onze schatting van de oplosbaarheid).

Bij deze concentratie werden na vier maanden veranderingen geconstateerd in voedselopname-gedrag en biochemische parameters; daarnaast trad een grijs-blaauwe verkleuring op van inwendige weefsels.

6.8. TETRAPROPYLEENBENZEENSULFONAAT (TPBS)

6.8.1. Chemische aspecten

De oplosbaarheid van TPBS in water is groot. Voor de toetsen werd uitgegaan van 5% oplossingen die in de handel zijn als standaard voor afbreekbaarheidstoetsen. Vanuit deze oplossingen werden de benodigde toetsoplossingen bereid.

TPBS is de zogenaamde "harde" standaard in afbreekbaarheidsonderzoek; d.w.z. dat deze stof niet meer dan 35% mag worden afgebroken in 19 dagen. Inderdaad waren tijdens dit project de gehalten vlak voor en vlak na verversen van de toetsoplossingen ongeveer gelijk; er trad dus géén afbraak op.

Wel waren, vooral bij TNO en RID, reeds bij $t = 0$ de gehalten vaak wat hoger (tot 30 à 40%) dan de nominale gehalten. Daar doseringsfouten van deze grootte-orde nauwelijks voor te stellen zijn, kan gesteld worden dat de oorzaak hiervan aan de gebruikte analyse-methode zou kunnen liggen. Immers met deze methode worden alle anionische oppervlakte-actieve stoffen meebepaald.

6.8.2. Biologische aspecten

In kortdurend onderzoek waren de gebruikte organismen alle ongeveer even gevoelig (NOEC ca 10 mg.l^{-1}). Bij verlenging van de toetsduur daalde deze NOEC weinig. Voor guppen bleef de NOEC 10 mg.l^{-1} (criteria sterfte en groei); voor de eierleggende vissen was de NOEC na 4 weken $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$ met sterfte als criterium, terwijl de groei van de overlevende vissen bij 10 mg.l^{-1} nog gelijk was aan die van de onbelaste vissen (blanco's).

Alleen voor *D. magna* was de NOEC na het volledige onderzoek $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, d.i. 10 x lager dan de NOEC uit het tweedaagse onderzoek. Bij TNO vond deze NOEC zijn oorsprong in het feit dat de F_1 -generatie jongen te laat in voldoende aantallen werd geboren. Het aantal F_1 -jongen nam echter wel toe bij het voortschrijden van de proef en gesommeerd over 3 weken proeftijd waren er zelfs bij 10 mg.l^{-1} evenveel jongen als in de blanco's, zodat de NOEC na 3 weken voor sterfte en reproductie weer 10 mg.l^{-1} was.

Bij de F_1 -generatie trad echter wel sterfte op bij 10 mg.l^{-1} zodat voor de F_1 -generatie de NOEC voor sterfte en reproductie $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$ was. In het RIV had de proef met TPBS een iets ander verloop, hoewel de uiteindelijke NOEC gelijk was aan die van TNO nl. $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Hier was de NOEC voor mortaliteit van de P-generatie na 3 weken 10 mg.l^{-1} (idem TNO). De NOEC voor reproductie was hier $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Bij deze concentratie trad géén mortaliteit op bij de F_1 -generatie (idem TNO), maar er werden te weinig F_2 -jongen geboren, zodat de NOEC over het gehele onderzoek $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ was.

TPBS behoort tot de anionische detergenten. De meest gebruikelijke anionische detergenten zijn de alkylbenzeensulfonaten (ABS) en de alkylsulfonaten. Een ABS met een onvertakte koolwaterstofketen wordt meestal aangeduid als "lineair alkylsulfonaat" (LAS). Hoewel LAS dus behoort tot de alkylbenzeensulfonaten wordt hij traditioneel onderscheiden van ABS, welke laatste stoffen een vertakte koolstofketen hebben, afgeleid van tetrapropyleen (Abel, 1974). Verreweg de meeste literatuurgegevens hebben betrekking op ABS. Van deze stof zijn er echter 80.000 isomeren in de range C_{10} - C_{15} en C_{12} ABS alléén heeft 3047 isomeren (Swisher, 1963).

Literatuurgegevens betreffende ABS behoeven dus géén betrekking te hebben op het in dit project gebruikte TPBS; de moleculaire configuratie kan de toxiciteit beïnvloeden.

Een overzicht betreffende de aquatische toxiciteit van ABS geeft Abel (1974); de aldaar vermelde gegevens betreffende de toxiciteit van ABS zijn in overeenstemming met die gevonden in dit project.

7. AANBEVELINGEN

7.1. ALGEN

- De blauw-groene alg *M. aeruginosa* en de diatomee *S. hantzschii* bleken voor een deel van de gebruikte modelstoffen bijzonder gevoelig te zijn in vergelijking met de veel in toxiciteitsonderzoek gebruikte groene algen. Juist deze twee gevoelige soorten werden slechts in één instituut getoetst. Alvorens deze soorten aan te kunnen bevelen voor opname in een minimum pakket toxiciteitstoetsen, dient dit onderzoek met deze soorten minimaal door twee instituten herhaald te worden, omdat daarbij informatie over de reproduceerbaarheid van de resultaten verkregen wordt. Ook verdient het aanbeveling nader onderzoek omtrent de invloed van de voor deze soorten gebruikte kweekomstandigheden op de resultaten van toxiciteitstoetsen uit te voeren. De keuze van één bepaalde blauw-groene alg of diatomeeën-soort zou ook beter onderbouwd moeten worden.
- Daarnaast verdient het aanbeveling aandacht te besteden aan de bepaling van NEC-waarden voor algen in het algemeen (zie bijlage H).

7.2. DAPHNIA MAGNA

- Aangezien de resultaten van het reproductie-onderzoek meestal alleen maar weergegeven kunnen worden als NOEC-waarden, welke bovendien door hun subjectieve aard vaak moeilijk vast te stellen zijn, zouden de toetsen zodanig aangepast moeten worden, dat statistische berekening en dus een objectief resultaat mogelijk is. Hierbij kan o.a. gedacht worden aan het in meervoud uitvoeren van de toets.
- Aangezien kwantitatief tellen van het aantal jonge daphnia's in reproductie-onderzoek zeer arbeidsintensief is, is automatisering van deze tellingen wenselijk, ondanks het feit dat uit onderhavig onderzoek is gebleken dat het tellen van 3 à 4 worpen voldoende informatie geeft over de invloed van een stof op de reproductie van *D. magna*.
- Uit het onderzoek bleek dat het aantal jongen per ♀ soms afhankelijk was van de verhouding organisme-volume. Dit betekent bijvoorbeeld dat bij toename van de sterfte in een proefgroep de resterende dieren meer jongen kunnen geven. Mede in verband met het eventueel wijzigen van het bestaande NNI-voorschrift betreffende reproductie-onderzoek met *D. magna* (NEN 6502),

alsmede ten behoeve van het opstellen van een ISO-voorschrift dienaangaande, is meer onderzoek op dit terrein door meerdere instituten gewenst.

- Tijdens dit onderzoek is in beide instituten een slechte conditie van de daphnia's voorgekomen en het is bekend dat dit ook bij andere onderzoekinstellingen regelmatig optreedt. Aangezien dit de toetsresultaten kan beïnvloeden verdient het aanbeveling onderzoek naar de oorzaken van de storingsen uit te voeren. Hierbij zou in eerste instantie gedacht kunnen worden aan het beschrijven van veel voorkomende "ziekten" en het zoeken naar behandelingsmethoden. Indien de dieren niet "gezond" zijn dient geen onderzoek te worden uitgevoerd.

7.3. VISSSEN

- De toetsen met de eierleggende vissen bleken nog niet voldoende gestandaardiseerd. Dit uitte zich o.a. in een grote blanco-sterfte bij het onderzoek met *O. latipes*, terwijl het geplande onderzoek met *P. promelas* om dezelfde reden zelfs niet kon worden uitgevoerd. Nadat de kweekmethoden verbeterd zijn zou het onderhavige onderzoek aangevuld moeten worden met de thans ontbrekende gegevens met betrekking tot deze twee vissoorten.
- Voor het beoordelen van sterfte van jonge visjes na het uitkomen van de eieren leek 2 weken een voldoende lange proefduur. In 2 weken zijn de visjes echter nog slechts weinig gegroeid en het dient nader onderzocht te worden of een dergelijke proefduur voldoende is om invloed op de groei te bepalen.
- Aangezien internationaal (ISO) *Brachydanio rerio*, de zebravis, als proefdier aanvaard is, is het wenselijk het onderhavige onderzoek met deze soort uit te voeren. Om tevens de reproduceerbaarheid hierbij te betrekken dienen meerdere instituten hieraan deel te nemen.

7.4. BEREIDING VAN TOETSOPLOSSINGEN

Het bereiden van toetsoplossingen van stoffen die slecht in water oplosbaar zijn gaf ook in dit project weer problemen. Ook in internationaal verband is hierover al menige discussie gevoerd.

Het zou aan te bevelen zijn onderzoek uit te voeren om vast te kunnen stellen welke organische oplosmiddelen toegestaan zijn en in welke hoeveelheden. Het bepalen van de oplosbaarheid van stoffen in water verdient meer aandacht, zeker indien een aantal verschillende waarden voorhanden zijn.

Daarnaast dient te worden vastgelegd of (en zo ja wanneer) het gebruik van oververzadigde "oplossingen" is toegestaan.

7.5. LANGDURENDE TOETSEN IN HET ALGEMEEN

Langdurende toetsen zijn veel arbeidsintensiever dan kortdurende. Terwijl kortdurende toetsen meestal in duplo worden uitgevoerd, met minimaal een factor 1.8 tussen de concentraties, en - bij enige twijfel aan het resultaat - herhaald worden, is dit bij langdurende toetsen om bovenvermelde reden niet altijd het geval. Ook in dit project werden langdurende toetsen met vissen in enkelvoud uitgevoerd met een factor 3.2 tussen de concentraties. Het resultaat van langdurende toetsen wordt echter van meer belang geacht dan dat van kortdurende toetsen en dient derhalve betrouwbaar te zijn. Daarom wordt aanbevolen langdurende toetsen eveneens minimaal in duplo uit te voeren, waarbij de rede van de concentratiereeks afhankelijk dient te zijn van de steilheid van de concentratie-effect-relatie.

Een betere proefopzet voor stoffen waarvan weinig omtrent de langdurende werking bekend is lijkt echter:

Uitvoeren van een toets, eventueel in enkelvoud, met een factor 3.2 tussen de concentraties, gevolgd door een herhaling van deze toets met een concentratie-reeks die aangepast is aan de resultaten van deze eerste toets, eventueel met een factor 1.8, waarbij enkele concentraties gelijk zijn aan die van de eerste toets. Op deze wijze verkrijgt men zowel een indruk omtrent de reproduceerbaarheid van de toets als een nauwkeurig bekend resultaat, terwijl bovendien het opgeven van NOEC- en/of LC50-waarden als "kleiner dan" vaak vermeden zal kunnen worden.

7.6. MODELSTOFFEN MET SPECIFIEKE WERKING

Aangezien voor een aantal "regulated chemicals" bekend is dat deze een specifieke werking hebben op een bepaald organisme of een bepaalde parameter, wordt aanbevolen het onderhavige onderzoek nogmaals uit te voeren met dergelijke stoffen.

DANKBETUIGING

De auteurs danken hierbij Dr S.A.L.M. Kooijman en de heer H. Oldersma (MT-TNO) en Mw E.A.M. Mathijssen-Spiekman (RIV) voor hun medewerking aan het tot stand komen van dit rapport; tevens danken zij al degenen die verantwoordelijk waren voor het uitvoeren van de chemische analyses, met name Dr C. Pries (MT-TNO), Drs R.C.C. Wegman (RIV) en de heer G.J. Piet (RID), en Mevr Drs F.I. Kappers (RID) voor het uitvoeren van de toetsen met *Microcystis aeruginosa* en *Selenastrum capricornutum*.

LITERATUUR

Abel, P.D. (1974)

Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates.
J. Fish Biol., 6, 279-298.

Adema, D.M.M. (1980)

De acute en chronische toxiciteit van negen gechloreerde fenolen voor
Daphnia magna.
Rapport CL 80/107, TNO, Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie, Delft.

Adema, D.M.M. & G.J. Vink (1981)

A comparative study of the toxicity of 1,1,2-trichloroethane, dieldrin,
pentachlorophenol and 3,4-dichloroaniline for marine and fresh water
organisms.
Chemosphere, 10, 533-554.

Batterton, J., K. Winters and C. van Baalen (1978)

Anilines: Selective toxicity to blue-green algae.
Science, 199, 1068-1070.

Bringmann, G. & R. Kühn (1980)

Comparison of the toxicity thresholds of water-pollutants to bacteria,
algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test.
Water Res., 14, 231-241.

Cairns, J., A. Scheier, J.J. Loos (1965)

A comparison of the Sensitivity to Certain Chemicals of Adult Zebra
Danios, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) and Zebra Eggs with that
of Adult Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*.
Raf. Notulae Natur., no. 381, 9 pp.

Canton, J.H. & W. Slooff (1978)

Hydrobiologisch toxiciteitsonderzoek ten behoeve van het indelen van
stoffen (bijv. in zwarte en grijze lijsten) en voor het stellen van
normen op grond van toxiciteit, accumulatie en persistentie in verband
met de verontreiniging van oppervlaktewater.
Rapport nr. 127/78 Tox., RIV-RID.

Commission of the European Communities (1979)

Inter-Laboratory ring test concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the *Daphnia*. Report from "Institut national de recherche chimique appliquée".
Centre de Recherche 91710. Vert-Le-Petit.

Dawson, G.W., A.L. Jennings, D. Drozdowski & E. Rider (1977)

The acute toxicity of 47 industrial chemicals to fresh and salt water fishes.
J. of Hazardous Materials, 1, 303-318.

Dowden, B.F. & H.J. Bennett (1965)

Toxicity of Selected Chemicals to Certain Animals.
J. Water Poll., Contr. Fed., 37(9), 1308-1316.

Dumont, J.N., T.Wayne Schultz & D. Jones (1979)

Toxicity and Teratogenicity of aromatic amines to *Xenopus laevis*.
Bull. Environm. Contam. Toxicol., 22, 159-166.

EPA (1980)

Ambient water quality criteria, PB 296804
Phtalate esters
Criteria and Standards Division
Office of Water Planning and Standards
US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Gillette, L.A., D.L. Miller & H.E. Redman (1952)

Appraisal of a Chemical Waste Problem by Fish Toxicity Test.
Sewage Ind. Wastes, 24, 1397-1401.

Hann, W. & P.A. Jensen (1974)

Water Quality Characteristics of Hazardous Materials.
Environmental Engineering Division, Civil Engineering Department.
Texas A&M University, Vol. 1-4.

Hanstveit, A.O., H. Oldersma en S.A.L.M. Kooijman (1979)

Verwerking van de resultaten van algentoetsen van drie instituten
t.b.v. een norm voor een algentoets NEN 6506.

Rapport CL 79/46, TNO, Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie, Delft.

Hanstveit, A.O. (1980)

Evaluation of the result of the European ISO-test program with algal
toxicity tests.

ISO-document, ISO/TC 147/SC5 WG5/N16, Nederlands Normalisatie Instituut,
Delft.

Hollibaugh, J.T., D.L.R. Seibert & W.H. Thomas (1980)

A comparison of the acute toxicities of ten heavy metals to phyto-
plankton from Saanich Inlet, B.C., Canada.

Estuar. Coast. Mar. Sci., 10, 93-105.

Hollifield, H.C. (1979)

Rapid Nephelometric estimate of water solubility of highly insoluble
organic chemicals of environmental interest.

Bull. Environm. Contam. Toxicol., 23, 579-586.

Howard, P.H. & G.D. Padmakar (1979)

Degradation of arylphosphates in aquatic environments.

Bull. Environm. Contam., Toxicol., 22, 337-334.

Hughes, J.S. (1973)

Acute toxicity of Thirty Chemicals to Striped Bass (*Morone saxatilis*),
Presented at the Western Association of State Game and Fish Commissioners,
Salt Lake City, Utah, July 1973.

ISO/TC 147/SC5 WG3 (Secretariat 7) (1976)

Report of Acute flow-through toxicity tests with zebra fish carried
out to evaluate the procedure proposed by ISO.

- ISO-DIS 6341, Draft international standard (311 147 05/79-15) (1979)
Water quality. Determination of the inhibition of the mobility
of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
International organisation for Standardization.
- Kooijman, S.A.L.M. (1978)
Een statistische analyse van de sterfte van *Daphnia magna* door toe-
voegen van kaliumbichromaat.
Rapport CL 78/13, TNO, Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie, Delft.
- Kooijman, S.A.L.M., A.O. Hanstveit & H. Oldersma (1981)
Parametric analyses of population growth in bio-assays.
Publicatie P 81/13, TNO, Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie, Delft
(Aangeboden voor publicatie in Water Res.).
- Kooijman, S.A.L.M. (1981)
A parametric analysis of mortality rates in bioassays.
Water Res., 15, 107-119.
- Linden, E., B-E. Bengtsson, O. Svanberg & G. Sundström (1979)
The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against
two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the
Harpacticoid *Nitocra spinipes*.
Chemosphere, 11/12, 843-851.
- Lockhart, W.L., R. Wageman, J.W. Clayton, B. Graham & D. Murray (1975)
Chronic Toxicity of a Synthetic Tri-arylphosphate Oil to fish.
Environm. Physiol. Biochem., 5, 361-369.
- McKee, J.E., H.W. Wolf (1963)
Water Quality Criteria.
California State Water Quality Control Board, 2nd Ed.
- McKim, J.M. (1977)
Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting
longterm toxicity.
J. Fish. Res. Board Can., 34 (8), 1148-1154.

Mehrle, P.M. & F.L. Mayer (1976)

Di-2-ethylhexylphthalate: Residue dynamics and biological effects
in rainbow trout and fathead minnows.

Pages 519-524, in : Trace substances in environmental health.

University of Missouri Press, Columbia.

Middlebrooks, E.J., M.J. Garpor, R.D. Gaspar, J.H. Reynolds & D.B. Porcella
(1973)

Effects of Temperature on the Toxicity to the Aquatic Biota of Waste
Discharges - A Compilation of the Literature.

NTIS PB-239 127, October 1973.

NEN 6501, Nederlandse norm (1980)

Wateronderzoek. Bepaling van de acute toxiciteit met *Daphnia magna*.

Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN 6502, Nederlandse norm (1980)

Wateronderzoek. Bepaling van de chronische toxiciteit met *Daphnia magna*.

Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN 6504, Nederlandse norm (1980)

Wateronderzoek. Bepaling van de acute toxiciteit met *Poecilia reticulata*
(guppen).

Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

NEN 6506, Nederlandse norm (ontwerp; 1979)

Water-Bepaling van de toxiciteit met behulp van algen.

Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Pfuderer, P. & A.A. Francis (1975)

Phthalate esters: Heart rate depressors in the gold fish.

Bull. Environm. Contam. Toxicol., 13, 275-279.

Ryerman, D.W., A.V.S. Prabhakara Rho, J.C. Buzzell jr. (1966)

Behaviour of Organic Chemicals in the Aquatic Environment.

Manufacturing Chemists Association, Washington, D.C. Summer.