

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
Bilthoven

Rapport nr. 668118 001

Onderzoek naar de toxiciteit van TBTO
voor een aantal zoetwaterorganismen.

E.A.M.Mathijssen-Spiekman, J.H.Canton
en C.J.Roghair.

april 1989

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Directie van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne in het kader van projekt 668118 en 158301.

VERZENDLIJST

- 1 Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
- 2 Dr. H.A.M. de Kruijf
- 3 Dr. W. Admiraal
- 4 Mw. Ir. C.J. Roghair
- 5 Drs. D. de Zwart
- 6 Ir. C.A.M. van Gestel
- 7 Dr. P.W. Wester
- 8 Dr. H.A.M.G. Vaessen
- 9 Drs. C.A. van der Heijden
- 10 Drs. E.I. Krajnc
- 11-13 Auteurs
- 14-15 Projekten -en Rapportenregistratie
- 16 Bibliotheek
- 17-22 Reserve-exemplaren

Mede ter vertrouwelijke informatie aan :

- 23 Ir. J.W. Everts ; L.U., Wageningen
- 24 Prof. Dr. J.H. Koeman ; L.U., Wageningen
- 25 Dr. C.J. van Leeuwen ; DGM/SR, Leidschendam
- 26 Dr. A.G.J. Sedee ; DGM/SR, Leidschendam
- 27 Dr. Ir. A. Oudeman ; DGM/SR, Leidschendam
- 28 Prof. Dr. W. Seinen ; R.U., Utrecht

INHOUDSOPGAVE

Verzendlijst	ii
Inhoudsopgave	iii
Summary and conclusions	iv
Samenvatting en conclusies	v
1. Inleiding	1
2. Materiaal en methoden	3
2.1 Materiaal	3
2.2 Methoden	5
2.2.1 Chemische analyses	5
2.2.2 Kortdurend onderzoek	5
2.2.3 Langdurend onderzoek	6
3. Resultaten en discussie	9
3.1 Chemische analyses	9
3.2 Kortdurend onderzoek	9
3.3 Langdurend onderzoek	11
4. Extrapolatie	16
Dankbetuiging	18
Literatuur	19
Tabellen	24
Figuren	32
Bijlage 1. Levenscyclus van schistosoma parasieten.	36
Bijlage 2. Resultaten van een aantal bepalingen in slotwatermonsters.	37
Bijlage 3. Bestanddelen en eigenschappen van de gebruikte standaardmedia.	38
Bijlage 4. Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek.	39

SUMMARY AND CONCLUSIONS

- In this research bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) was tested to
- (1) investigate the ecotoxicological effects for fresh-waterorganisms
 - (2) look if the snail is more sensitive to TBTO than other waterorganisms
 - (3) look if there is any difference in toxicity between the use of surface-water or DSW as testmedium
 - (4) look if it is possible to give a "safe" NOEC for the ecosystem.

Short-term toxicity experiments were carried out with Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus pannonicus, two greenalgae, Daphnia magna, a crustacean, Lymnaea stagnalis, a snail and with Poecilia reticulata, Oryzias latipes and Gasterosteus aculeatus, three fishes. Also long-term toxicity experiments were carried out with D.magna, L.stagnalis, P.reticulata and O.latipes. The following parameters were used : mortality, paralysis, immobility, abnormal behaviour, abnormal appearance, embryonic development, heartbeat-rate, reproduction, growth and histopathological effects.

The conclusions were :

- (1) In the short-term experiments the LC_{50} varied between 4.7 and 42 $\mu\text{g}/\text{l}$, the EC_{50} between 0.75 and 64 $\mu\text{g}/\text{l}$ and the NOEC between 0.56 and 32 $\mu\text{g}/\text{l}$. The most sensitive organism proved to be D.magna with a NOEC of 0.56 $\mu\text{g}/\text{l}$.
In the long-term experiments the NOEC varied between 0.32 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ and L.stagnalis and P.reticulata proved to be the most sensitive organisms. The NOEC's for histopathological effects were 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ for P.reticulata and 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ for O.latipes.
- (2) L.stagnalis was as sensitive as the other waterorganisms to TBTO.
- (3) There was no difference in toxicity between the use of surface-water or DSW as testmedium.
- (4) Based on the results of this study a "safe" NOEC for the aquatic ecosystem of 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ has been proposed.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) is onderzocht om na te gaan (1) wat de ecotoxicologische effecten van TBTO voor waterorganismen zijn, (2) of de slak specifiek gevoelig is voor TBTO, (3) of er verschil in toxiciteit is waar te nemen bij het gebruik van slootwater of DSW als toetsmedium en (4) of het mogelijk is om een "veilige" NOEC voor het ecosysteem op te geven.

Er is kortdurend onderzoek uitgevoerd met Chlorella pyrenoidosa en Scenedesmus pannonicus, eencellige groenalgen, Daphnia magna, een kreeftachtige, Lymnaea stagnalis, een slak en met Poecilia reticulata, Oryzias latipes en Gasterosteus aculeatus, drie vissoorten. Tevens is langdurend onderzoek uitgevoerd met D.magna, L.stagnalis, P.reticulata en O.latipes. Als scoringscriteria zijn mortaliteit, verlamming, immobiliteit, afwijkend gedrag, afwijkend uiterlijk, embryonale ontwikkeling, hartslagfrequentie, reproductie, groei en histopathologische effecten gebruikt.

De conclusies uit dit onderzoek zijn :

- (1) Bij het kortdurend onderzoek varieerde de LC_{50} van 4.7 tot 42 $\mu\text{g/l}$, de EC_{50} van 0.75 tot 64 $\mu\text{g/l}$ en de NOEC van 0.56 tot 32 $\mu\text{g/l}$. D.magna bleek het gevoeligste organisme te zijn met een NOEC van 0.56 $\mu\text{g/l}$. Bij het langdurend onderzoek varieerde de NOEC van 0.32 tot 1.0 $\mu\text{g/l}$ en bleken L.stagnalis en P.reticulata de gevoeligste organismen te zijn met een NOEC van 0.32 $\mu\text{g/l}$. De NOEC's voor histopathologische effecten waren 0.01 en 0.32 $\mu\text{g/l}$ voor resp. P.reticulata en O.latipes.
- (2) L.stagnalis lijkt niet gevoeliger te zijn voor TBTO dan de andere waterorganismen.
- (3) Er is geen verschil in toxiciteit waargenomen bij het gebruik van slootwater of DSW als toetsmedium.
- (4) Met behulp van de procedure voor het geven van een veilige waarde voor het ecosysteem voorgesteld door de Gezondheidsraad kan uit de resultaten van dit onderzoek een veilige waarde van 0.01 $\mu\text{g/l}$ voor TBTO berekend worden.

1 INLEIDING

Bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) is een verbinding die gebruikt kan worden ter bestrijding van schistosomiasis.

Schistosomiasis (Bilharzia) is een zeer groot gezondheidsprobleem. Ongeveer 200 miljoen mensen lijden eraan voornamelijk in Afrika, Zuid-Amerika, het Midden-Oosten en China en ongeveer 600 miljoen mensen zijn constant blootgesteld aan een mogelijke infectie (Mather, 1984). De ziekte wordt veroorzaakt door parasitaire wormen (schistosomen). Volwassen wormen leven in de bloedvaten van mensen en produceren daar grote hoeveelheden eieren. Deze eieren kunnen via de urine of de faeces in het water terecht komen waar ze zich ontwikkelen tot miracidia, het eerste larvestadium van de worm. Deze dringen de tussengastheer, waarvoor verschillende soorten aquatische slakken in aanmerking komen, binnen waar zich uit de miracidia cercaria vormen, het tweede larvestadium. De cercaria komen vrij in het water en kunnen de huid van de mens binnendringen, waar ze zich ontwikkelen tot weer een volwassen worm (Bijlage 1, Levenscyclus van schistosoma parasieten). De door deze wormen afgezette eieren in het lichaam van een mens veroorzaken de ziekte die zich kan uiten in zwakheid, gewichtsverlies, dysenterie en blaasontsteking. De ziekte is chronisch en de hoeveelheid eieren die in het lichaam opgebouwd wordt, neemt toe waardoor de symptomen steeds ernstiger worden, eventueel gevolgd door de dood.

Verspreiding van de ziekte treedt op bij slechte hygiëne, waardoor de eieren van de parasiet direct in het oppervlaktewater terecht komen, de aanwezigheid van een tussengastheer en wanneer er contact plaats heeft tussen mensen en besmet water. Bestrijding van de ziekte kan geschieden door behandeling van zieken met medicijnen samen met bestrijding van de slakken met mollusciciden.

De werking van TBTO als molluscicide is meerdere malen onderzocht (de Villiers en McKenzie, 1963; Duncan, 1980; Floch et al, 1964; Deschiens en Floch, 1968; Ritchie et al, 1964; Hopf et al, 1967) maar daarentegen is er niet systematisch vergelijkend onderzoek uitgevoerd naar de toxiciteit voor andere waterorganismen dan slakken. Voordat TBTO op grote schaal als molluscicide gebruikt wordt is het noodzakelijk om meer kennis te verkrijgen omtrent de neveneffekten van deze verbinding.

Het onderhavige onderzoek werd uitgevoerd met als doel een antwoord te geven op de volgende vragen :

- 1) Wat zijn de effecten van TBTO voor verschillende typen waterorganismen ?
- 2) Is de slak specifiek gevoelig voor TBTO ?
- 3) Is er verschil in toxiciteit waar te nemen tussen het gebruik van slootwater en DSW als toetsmedium ?
- 4) Is het mogelijk een veilige NOEC voor het ecosysteem op te geven voor TBTO ?

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Materiaal

TBTO (bis(tri-n-butyltin)oxide) is een organotinverbinding die onder meer gebruikt wordt in anti-fouling scheepsverven ter voorkoming van aangroei van algen en schaaldieren, als conserveermiddel van hout, als algicide ter bestrijding van algengroei in koelwaterreservoirs en als molluscicide (Duncan, 1980).

De TBTO-verbinding waarmee dit onderzoek werd uitgevoerd was afkomstig van M & T Chemicals Inc. te Vlissingen en had een zuiverheid van 95.3 %. Enkele identiteitsgegevens en fysisch-chemische eigenschappen van TBTO zijn (TNO-rapport, 1986) :

- CAS-naam : hexabutyldistannoxane;
distannoxane, hexabutyl-
- Molekuulformule : $[(C_4H_9)_3Sn]_2O$
- Strukturformule :
$$\begin{array}{c} H_9C_4 \qquad \qquad \qquad C_4H_9 \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \qquad \qquad / \\ H_9C_4 - Sn - O - Sn - C_4H_9 \\ \qquad \qquad \qquad / \qquad \qquad \backslash \\ H_9C_4 \qquad \qquad \qquad C_4H_9 \end{array}$$
- Molekulgewicht : 596.1
- Soortelijk gewicht : 1.17
- Kookpunt : 210-214 °C bij 10 mm Hg
- Smeltpunt : < -50 °C
- Oplosbaarheid : 18-19.5 mg/l bij 20 °C in aquadest
- Kleur : kleurloos
- Vorm : vloeistof

Het toxiciteitsonderzoek werd uitgevoerd met Chlorella pyrenoidosa en Scenedesmus pannonicus, eencellige groenalgen, Daphnia magna, een kreeftachtige, Lymnaea stagnalis, een slak en Poecilia reticulata, Oryzias latipes en Gasterosteus aculeatus, drie vissoorten. De organismen waren allen afkomstig van de op het laboratorium aanwezige kweken, die onder gestandaardiseerde omstandigheden gehouden werden in analogie met de NPR-normen 6503, 6505 en 6507 van het Nederlands Normalisatie-Instituut. De benodigheden en werkwijzen voor het kweken van de verschillende organismen zijn eveneens, met uitzondering van de slak, beschreven in Standard Operating Procedures (SOP's) van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne. De kweek van de slak werd uitgevoerd volgens de methode van Van der Steen et al. (1969); er werd echter geen gebruik gemaakt van een doorstroomsysteem en in plaats van leidingwater werd Dutch Standard Water (DSW) als kweekmedium gebruikt (voor de samenstelling van DSW zie Bijlage 3).

Het kool waarover DSW gefiltreerd werd voor de daphnia-experimenten was actief kool Norit row 08 supra, betrokken van de firma Chemproha B.V..

Het kweekwater dat gebruikt werd in het medium voor de experimenten met daphnia's was afkomstig van de Daphnia-kweek en bestond uit water waarin minimaal 48 uur volwassen dieren waren gehouden.

Het slootwater was afkomstig uit een sloot gelegen nabij het KNMI in De Bilt en werd bemonsterd in 3 liter glazen infuusflessen en maximaal 3 dagen bewaard bij 4 °C. De hardheid en het nitraat -, nitriet - en ammoniumgehalte van het slootwater werd gemeten met behulp van Aquamerck-testen betrokken van de firma Merck nrs. 11104, 10020, 11118 en 11117.

Voor het embryotoxiciteitsonderzoek met O. latipes werd gebruik gemaakt van een binoculair van het type Wild M5.

Voor het meten en wegen van de vissen werden de dieren verdoofd met MS-222 betrokken van de firma Sandoz Ltd. Basel, Switzerland. Het wegen van de vissen gebeurde met behulp van een analytische balans van het type Mettler H35.

De zuurgraad werd gemeten met een Ingold lot 402-88 TE elektrode gekoppeld aan een Philips 9409 pH-meter. Het zuurstofgehalte werd bepaald met een Beckman PN 39557 elektrode gekoppeld aan een Beckman 0260 zuurstofmeter.

2.2 Methoden

2.2.1 Chemische analyses

Om een indruk te krijgen van de stabiliteit van TBTO in water werd het concentratieverloop van een oplossing van 20 µg/l in de tijd vervolgd. TBTO werd opgelost in DSW en in open en gesloten volglazen toetsvaten getest. Ook werd het concentratieverloop van een matig beluchte oplossing gemeten. Na 0, 1, 2, 3 en 6 dagen werden monsters genomen ter analyse van de werkelijk aanwezige concentratie. Aangezien de stabiliteit van TBTO in slotwater anders was dan in DSW door de aanwezigheid van slibdeeltjes en organisch materiaal werd deze ook nader onderzocht. De analysemethode is beschreven in SOP nr. ARO/049 van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne.

2.2.2 Kortdurend onderzoek

Het kortdurend toxiciteitsonderzoek met algen, daphnia's en vissen werd uitgevoerd in analogie met de NEN-normen 6506, resp. 6501 en 6504 van het Nederlands Normalisatie-Instituut.

Bij het onderzoek met daphnia's werd in afwijking met het NEN-voorschrift geen mortaliteit en onbeweeglijkheid gescoord maar immobiliteit (ISO 6341), omdat het apart met het blote oog scoren van mortaliteit en onbeweeglijkheid van dieren van 1 en 2 dagen oud niet goed mogelijk is.

Voor een methode-beschrijving van het onderzoek met slakken kan verwezen worden naar Canton en Slooff(1977).

Het onderzoek met G.aculeatus werd uitgevoerd met vissen van verschillende leeftijden nl. 1 à 2 dagen en 4 à 5 weken oud.

Met een aantal organismen werd ook kortdurend onderzoek verricht waarbij in plaats van DSW slotwater als testmedium gebruikt werd. Op de dag van monsternamen werden de zuurgraad, het zuurstofgehalte, de hardheid en het nitraat -, nitriet -en ammoniumgehalte in het

slootwatermonster bepaald (zie Bijlage 2). Het slootwater werd voor het gebruik in de experimenten gefiltreerd over een papieren vouwfilter (7.5 μm).

Een overzicht van alle experimentele condities en toxicologische criteria bij het kortdurend onderzoek is vermeld in Tabel 1.

2.2.3 Langdurend onderzoek

Het langdurend toxiciteitsonderzoek met daphnia's werd uitgevoerd in analogie met de NEN-norm 6502. Er werd dagelijks gescoord op mortaliteit, aantal jongen, vellen en afgezette eieren; op maandag, woensdag en vrijdag op sublethale effecten en aanwezigheid van eieren in de broedkamer en aan het eind van de proef op lengte van de ouderdieren. Het scoren van de vervelling werd gebruikt om aan te kunnen geven wanneer een dier 4 worpen heeft gegeven. Na het afzetten van jongen en eventuele eieren vervelt het vrouwtje namelijk zodat een velletje de afsluiting van een worp betekent. De lengte van de ouderdieren werd bepaald door de dieren zo droog mogelijk op een objektglasje te leggen en te meten van de kop tot en met het staartje met behulp van een binoculair met een vergroting van 24x en een oculair-micrometer. Deze lengte werd uitgedrukt in oculair-micrometer-eenheden.

Het langdurend onderzoek met de slak werd uitgevoerd in analogie met het onderzoek van Canton en Slooff(1977). Eerst werd de reproductie van de slakken gedurende drie weken vervolgd in DSW, vervolgens werden de slakken 33 dagen blootgesteld aan TBTO. Op maandag, woensdag en vrijdag werd gescoord op mortaliteit, sublethale effecten, aantal kapsels, aantal eieren per kapsel, meerlingen en aantal onbevuchte eieren. Voor de berekening van de reproductie werd het aantal eieren per ouderdier berekend; daarnaast werden van de F_1 -generatie een aantal kapsels per concentratie vervolgd tot het uitkomen van de eieren. Daarbij werd gescoord op mortaliteit en achterstand in ontwikkeling aan de hand van de drie ontwikkelingsstadia van de slak nl. het trochofoor, veliger en hippo-stadium.

Het langdurend onderzoek met P.reticulata werd in analogie met de NEN-norm 6504 uitgevoerd. Dagelijks werd gescoord op mortaliteit; op maandag, woensdag en vrijdag op sublethale effecten; na een maand en aan het eind van de proef op groei en histopathologische effecten. Voor het inzetten van het experiment werd van 25 dieren, die verder niet gebruikt zijn voor blootstelling aan TBTO, het geslacht en de grootte bepaald, na een maand van 10 dieren per groep en aan het eind van het experiment van alle overige vissen. Hiertoe werden de vissen verdoofd in een oplossing van 20 mg/l MS-222 en zo droog mogelijk op een objektglaasje op millimeter-papier gelegd. De lengte werd gemeten en met behulp van hetzelfde objektglaasje en een analytische balans werd het gewicht bepaald. Als voedsel kregen de dieren 4x per dag een spatelpunt van een fijngewreven mengsel van tetramin-tetraphyl aangeboden en 1x per dag een hoeveelheid artemia's van 1 à 2 dagen oud. Na 1 en 3 maanden blootstelling van de vissen aan TBTO werd histopathologisch onderzoek uitgevoerd. Dit onderzoek is beschreven door Wester en Canton(1987).

Het langdurend onderzoek met O.latipes werd op dezelfde wijze uitgevoerd als het onderzoek met P.reticulata met uitzondering van de embryonale fase en de voeding. Tijdens de embryonale ontwikkeling werd gescoord op sterfte en sublethale effecten alsmede de dag van uitkomen van de eieren en de hartslagfrequentie. De hartslagfrequentie werd na 7 dagen van alle embryo's in de blanco en in de hoogste testconcentratie bepaald door het tellen van het aantal slagen per 15 seconden met behulp van een binoculair en een stopwatch. Als er geen significante afwijking ten opzichte van de blanco gevonden werd, werden de lagere testconcentraties niet verder onderzocht; trad er wel een significante afwijking op dan werden de embryo's uit de lagere concentraties ook bekeken net zolang totdat er een concentratie gevonden werd waarin de hartslagfrequentie van de embryo's overeenkwam met die uit de blanco. De voeding bestond de eerste week na het uitkomen van de eieren uit raderdieren, de tweede week uit artemia's en daarna kregen de vissen hetzelfde voedsel aangeboden als P.reticulata. Het sexen van de vissen werd niet uitgevoerd aangezien het geslacht van rijstvissen van 1 en 3 maanden oud niet duidelijk uiterlijk zichtbaar is.

Een overzicht van de testorganismen, experimentele condities en toxicologische criteria bij het langdurend onderzoek is vermeld in Tabel 2.

Om na te gaan of TBTO de zuurgraad of het zuurstofgehalte van de testoplossingen beïnvloedde werden bij het kortdurend onderzoek na 0 en 48 uur (bij de algen na 0 en 96 uur) metingen verricht in de blanco en in de hoogste testconcentratie, bij het langdurend onderzoek 1x per week na 0, 48 en 72 uur eveneens in de blanco en in de hoogste aanwezige testconcentratie. Als deze grootheden onderling niet gelijk bleken te zijn, werden ook de overige oplossingen gemeten.

Tijdens de toxiciteitsexperimenten werden eveneens monsters genomen van de laagste en hoogste testconcentratie ter analyse van de werkelijk aanwezige hoeveelheid TBTO.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Chemische analyses

Bij het analyseren van de watermonsters uit het stabiliteitsonderzoek bleken er nogal wat problemen op te treden. Van de toegevoegde hoeveelheid TBTO werd tot vier maal toe maar ca.50% teruggevonden. De gebruikte analysemethode bleek toen nog niet optimaal voor het analyseren van TBTO in watermonsters. Wel kon uit de resultaten de conclusie getrokken worden dat het TBTO-gehalte in de oplossingen niet terugliep, ook niet in de open en matig beluchte testvaten. Derhalve werd besloten het toxiciteitsonderzoek uit te voeren in open toetsvaten en de resultaten uit te drukken in waarden die niet gecorrigeerd zijn voor de werkelijk aanwezige hoeveelheid TBTO. Het stabiliteitsonderzoek van TBTO in slotwater werd door bovenstaande problemen niet uitgevoerd, evenmin als de analyses in de testoplossingen tijdens het toxiciteitsonderzoek, met uitzondering van het langdurend onderzoek met O.latipes. Toen dit onderzoek werd uitgevoerd was een analysemethode beschikbaar. (RIVM-SOP nr.ARO/049).

3.2 Kortdurend onderzoek

De resultaten van het kortdurend onderzoek uitgevoerd in DSW staan vermeld in Tabel 3. Tabel 4 geeft een overzicht van alle waargenomen effecten tijdens dit onderzoek. Uit Tabel 3 blijkt dat C.pyrenoidosa en S.pannonicus even gevoelig zijn voor TBTO. Deschiens et al (1968) geeft een 10-20 dagen LC₁₀₀-waarde voor Chlorella van 500 µg/l. De EC₅₀-waarde verkregen uit onderhavig onderzoek van 42 µg/l en de NOEC-waarde van 18 µg/l zijn hiermee moeilijk te vergelijken; uit de resultaten kan echter een EC₁₀₀ van ongeveer 100 µg/l afgelezen worden. De effecten die Wong et al(1982) gevonden hebben, namelijk een IC₅₀ (concentratie die 50% remming geeft van de primaire produktiviteit) van 16 µg/l voor Scenedesmus quadricauda en een IC₅₀ van 13 µg/l voor de blauwgroene alg Anabaena flos-aquae, liggen in dezelfde orde van grootte als die uit dit

onderzoek. D.magna is van de geteste organismen het gevoeligste. De EC₅₀-waarde, waarbij het gescoorde effect immobiliteit behelst, is 4.7 µg/l. M&T Chemicals Inc. (1976) geeft een LC₅₀-waarde 48 uur op van 1.7 µg/l en Polster et al (1971) een waarde van 2.3 µg/l. Deze drie waarden zijn goed vergelijkbaar. Voor L.stagnalis komt uit onderhavig onderzoek een LC₅₀ van 42 µg/l (Tabel 3). Deze waarde komt overeen met de LC₅₀ (24 uur) voor de zoetwaterslak Australorbis glabratus van 40 µg/l en 50-100 µg/l gevonden door Ritchie et al (1964) resp. Hopf et al (1967). Ritchie et al geeft tevens een LC₅₀ van 370 µg/l voor 6 uur blootstelling die overeenkomt met de LC₅₀ (6 uur) van 410 µg/l voor A.glabratus gevonden door Seiffer et al (1967). De resultaten van de drie geteste vissoorten komen alle overeen. Ook de LC₅₀ 48 uur van 50 µg/l voor de zoetwatervis Leuciscus idus melanotus gevonden door Plum (1981) valt binnen een spreiding van een faktor 3.2 met de in dit onderzoek gebruikte vissoorten. Er werd geen verschil in toxiciteit gevonden tussen de verschillende geteste leeftijden van G.aculeatus.

Bovenvermelde organismen met uitzondering van de algen werden ook getest in slootwater. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel 5. Bij vergelijking van de resultaten in DSW met die in slootwater blijkt dat de gevoeligheid van de testorganismen voor TBTO niet beïnvloed wordt door het gebruikte testmedium. De verkregen waarden komen zeer goed overeen en vallen binnen een spreiding van een faktor 3.2. Het grootste verschil wordt gevonden bij D.magna: de EC₅₀- en NOEC-waarden in slootwater zijn hoger dan in DSW, de LC₅₀-waarden komen wel overeen. Uit Tabel 4 blijkt dat de effecten die bij D.magna in DSW en slootwater zijn waargenomen overeen komen met uitzondering van het effect ongecoördineerd zwemgedrag dat alleen voorkomt in het experiment uitgevoerd in DSW. Dit veroorzaakt de lagere EC₅₀-en NOEC-waarden in DSW. Mogelijke verklaringen hiervoor zouden kunnen zijn dat er in slootwater voedsel aanwezig was voor de daphnia's, die daardoor iets ongevoeliger reageren op de blootstelling aan TBTO of dat TBTO gebonden werd aan stoffen aanwezig in het slootwater waardoor de daphnia's blootgesteld werden aan een lagere biologische beschikbare concentratie.

Tijdens het kortdurend onderzoek in DSW varieerde de pH-waarde van 7.2 tot 8.3 en in slootwater van 7.0 tot 8.7. De zuurstofmetingen gedurende dit

onderzoek in DSW waren hoger dan 6.0 mg/l met uitzondering van het experiment met de slak waarin het minimale zuurstofgehalte 5.4 was. In slootwater bedroeg het zuurstofgehalte in alle experimenten meer dan 5.0 mg/l met uitzondering van het onderzoek met daphnia's en rijstvissen. Door schimmelvorming in de testoplossingen daalde het zuurstofgehalte in beide experimenten tot 0.4 mg/l op t = 48 uur. Desondanks kwamen de effecten op de organismen overeen met de effecten in de experimenten uitgevoerd in DSW. Daarom werd besloten om deze resultaten toch te vermelden.

3.3 Langdurend onderzoek

Aangezien er geen opmerkelijke verschillen gevonden zijn tussen het gebruik van DSW en slootwater werd het langdurend toxiciteitsonderzoek alleen uitgevoerd in DSW. Alle NOEC-waarden zijn vermeld in Tabel 6 en in Bijlage 4 zijn alle afzonderlijke scoringsresultaten weergegeven van de experimenten.

Bij het onderzoek met D.magna namen de effecten gedurende het experiment toe. Tot 12 dagen na het inzetten van het experiment zijn er geen effecten waargenomen bij de dieren die blootgesteld werden aan 1.8 µg/l TBTO. Zij hadden een goede conditie en de reproductie kwam overeen met die van de dieren in de blanco-groep. Na 12 dagen werd de conditie slechter evenals de reproductie. De dieren die blootgesteld werden aan 3.2 µg/l TBTO bleven direct na het inzetten kleiner en waren bleker dan de dieren in de blanco-groep. Aan het eind van het experiment traden effecten op in de groep met dieren die blootgesteld werden aan 1.0 µg/l; de uiteindelijke NOEC-waarde bedroeg dan ook 0.56 µg/l (Bijlage 4.1 en 4.2). In Figuur 1 is de reproductie van de dieren in de verschillende testconcentraties door middel van een staafdiagram weergegeven. Uit de figuur blijkt dat de dieren in de groep die blootgesteld werden aan 1.0 µg/l minder jongen gegeven hebben dan de dieren in de blanco groep. De dieren die blootgesteld werden aan 1.8 µg/l vertoonden een duidelijk lagere reproductie en de dieren in de groep die blootgesteld werden aan 3.2 µg/l hebben helemaal geen jongen gegeven. Uit de Student-T-Toets blijkt dat de reproductie in de 1.0 µg/l niet significant afweek van de blanco terwijl

die in de 1.8 $\mu\text{g}/\text{l}$ wel significant afweek van de blanco; de NOEC-waarde voor reproductie is dus 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$. Deze NOEC-waarde komt overeen met de NOEC voor mortaliteit en afwijkend gedrag en uiterlijk. In Figuur 2 is de groei van de dieren weergegeven. Deze figuur geeft eenzelfde beeld te zien als het staafdiagram met betrekking tot de reproductie. De dieren in de 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ vertoonden een mindere groei, die in de 1.8 $\mu\text{g}/\text{l}$ een duidelijke vertraging in de groei en de dieren in de 3.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ waren aan het eind van het experiment dood. Uit de Student-T-Toets blijkt dat de groei in de 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ significant afweek van de blanco, zodat de NOEC-waarde voor deze parameter 0.56 $\mu\text{g}/\text{l}$ is. De invloed van TBTO op de groei lijkt dus iets sterker te zijn dan de invloed op de reproductie en op mortaliteit, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk.

Het langdurend onderzoek met L.stagnalis (P-generatie) werd in duplo uitgevoerd. In één serie trad in de groep die blootgesteld werd aan 0.18 $\mu\text{g}/\text{l}$ een niet verklaarbare hoge sterfte op die niet veroorzaakt werd door TBTO. Deze groep werd niet gebruikt voor de berekening. De sterfte gedurende dit onderzoek nam toe naarmate de blootstellingsduur langer werd. De uiteindelijke NOLC-waarde bedroeg 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$. De NOEC voor afwijkend gedrag en uiterlijk lag twee concentraties lager, namelijk bij 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Bijlage 4.4 en 4.5). Uit Figuur 3 blijkt dat de reproductie van L.stagnalis een grote spreiding vertoonde. Ondanks deze spreiding was een duidelijke afname in reproductie te zien in de groepen die werden blootgesteld aan concentraties van 0.56 $\mu\text{g}/\text{l}$ en hoger. De NOEC voor reproductie van L.stagnalis is dus eveneens 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$. Ook zijn er effecten waargenomen tijdens de embryonale ontwikkeling van de F1-generatie. In testconcentraties hoger dan 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ trad sterfte en achterstand in ontwikkeling van de embryo's op zodat ook voor de embryonale ontwikkeling 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ als NOEC-waarde gekozen is (Bijlage 4.6).

Bij het langdurend onderzoek met P.reticulata vertoonden de vissen die blootgesteld werden aan 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ direkt na het inzetten van het experiment al effecten ten opzichte van de blanco. Dit effect, trager voortbewegen, nam niet toe bij verlenging van de expositietijd, maar het percentage sterfte in deze groep nam wel toe van 6% in week 1 tot 33% aan het einde van het experiment ten opzichte van 0% sterfte in de blanco-groep

(Bijlage 4.9). In de groep die blootgesteld werd aan 3.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ werd het effect trager niet waargenomen. Wel werden de vissen in deze groep na 12 weken blootstellingsduur als bleker ten opzichte van de blanco gescoord; het percentage sterfte nam in de tijd niet toe. In Figuur 4 is het gemiddeld gewicht van mannelijke en vrouwelijke dieren aan het eind van het experiment weergegeven. Voor de groei werd een significante afwijking geconstateerd in de groepen die aan meer dan 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ werden blootgesteld. In de groep van 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ werd voor de vrouwelijke dieren geen significante vermindering van het gewicht gevonden maar dit is waarschijnlijk het gevolg van een minder aantal dieren per toetsvat (22 ten opzichte van 29 in de blanco-groep), zodat een NOEC van 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ bepaald werd. Voor de histopathologische effecten is een NOEC van 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ vastgesteld. Deze effecten bestonden uit vacuolisatie van de hepatocyten, resulterend in leververvetting en leververgroting, thymusatrofie, toename van ontstekingscellen in de buikholte en afwijkingen aan de ogen en de huid. De histopathologische effecten van dit onderzoek worden uitgebreid beschreven door Wester en Canton(1987).

Er werden geen effecten waargenomen op de embryonale ontwikkeling tijdens het langdurend onderzoek met O.latipes tot in de hoogste testconcentratie van 32 $\mu\text{g}/\text{l}$. In deze groep waren de visjes direkt na het uitkomen van de eieren verlamd en alle vissen waren na ongeveer een week dood. In een concentratie lager (10 $\mu\text{g}/\text{l}$) waren de vissen direkt na het uitkomen trager en bleven dit ook gedurende het hele experiment. Het percentage sterfte nam toe van 11 % in week 1 na het uitkomen van de eieren tot 77% aan het einde van de proef ten opzichte van de 10% in week 1 tot 25% aan het einde van de proef in de blanco-groep. In de groep blootgesteld aan 3.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ vertoonden de vissen na het uitkomen van de eieren het effect trager dat na 8 weken niet meer waargenomen werd. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de vissen zich geadapteerd hebben aan deze concentratie. Het percentage sterfte kwam overeen met de sterfte in de blanco-groep (Bijlage 4.13). Uit Figuur 5 en Bijlage 4.14 blijkt dat er aan het eind van het experiment geen invloed werd waargenomen op de groei in alle concentraties. Voor de histopathologische effecten is een NOEC van 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ vastgesteld. De waargenomen effecten waren gering in vergelijking met de gup en bestonden uit een geringe afname van het glycogeengehalte van de lever met

matige vacuolisatie. Thymusatrofie kwam niet voor; wel werden er afwijkingen aan de ogen en de huid gevonden. Een verdere beschrijving van de histopathologische effecten wordt gegeven door Wester(1988, in proefschrift). De resultaten van de analyses uitgevoerd in de laagste en hoogst aanwezige concentratie (1.0 en 10 µg/l) staan vermeld in Tabel 7. Uit deze tabel blijkt dat er op t = 0 uur ongeveer 20% teveel werd toegevoegd, na 48 uur echter was het TBTO-gehalte in de testoplossingen afgenomen tot ca. 90% van de nominale waarde.

Uit Tabel 8 blijkt dat de waargenomen effecten bij de organismen onder invloed van TBTO goed overeen komen. Wel zijn er enkele verschillen waar te nemen. Verlamming komt niet voor bij D.magna en P.reticulata , alleen bij O.latipes. Deze verlamming trad op in de groep die blootgesteld werd aan 32 µg/l direkt nadat de vissen uit het ei gekomen waren. Na ongeveer een week waren deze vissen dood. Het effect stilliggend is niet waargenomen bij D.magna en P.reticulata , wel bij L.stagnalis en O.latipes. Afwijkingen tijdens de embryonale ontwikkeling zijn wel waargenomen bij L.stagnalis maar niet bij O.latipes. Dit verschil zou veroorzaakt kunnen worden door de testprocedure: de ouders van de blootgestelde eieren van L.stagnalis werden zelf reeds blootgesteld aan TBTO, terwijl de eieren van O.latipes direkt afkomstig waren uit de kweek. In tegenstelling tot D.magna en P.reticulata werd er geen effect op groei waargenomen bij O.latipes. Bij een aantal zoutwaterorganismen zijn eveneens effecten van TBTO op de groei waargenomen: Laughlin et al(1983) constateerde dit bij Rhithropanopeus harrisi (krab), Lawler et al(1987) bij Crassostrea gigas Spat (oester) en Stromgren et al(1987) bij Mytilus edulis (mossel).

De resultaten van het onderhavig langdurend onderzoek met verschillende typen zoetwaterorganismen kunnen niet met gegevens uit de literatuur vergeleken worden aangezien deze niet voorhanden zijn.

Tijdens het langdurend onderzoek varieerde de pH-waarde van 7.3 tot 8.5. De zuurstofgehalten bedroegen meer dan 5.8 mg/l met uitzondering van het onderzoek met P.reticulata waar het gehalte éénmalig daalde tot 2.0 mg/l in de blanco-groep en in de hoogste concentratie. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door een overmaat aan voer dat op de bodem is blijven liggen. De vissen vertoonden geen zichtbare nadelige effecten.

Resumerend kan uit dit onderzoek gesteld worden dat:

- 1) de laagste NOEC-waarde uit het kortdurend onderzoek 0.56 $\mu\text{g}/\text{l}$ (D.magna) is; de laagste NOEC-waarde uit het langdurend onderzoek 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$ (L.stagnalis en P.reticulata) is, met uitzondering van histopathologische effecten waarvoor een NOEC van 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ werd afgeleid uit het onderzoek met P.reticulata.
- 2) L.stagnalis niet gevoeliger is voor TBTO dan de andere waterorganismen; het waargenomen verschil valt namelijk binnen de reproduceerbaarheid van langdurend onderzoek; TBTO is dus geen specifiek molluscicide maar meer een algemeen biocide
- 3) er geen verschil in toxiciteit is waargenomen bij het gebruik van slootwater of DSW als toetsmedium

4 EXTRAPOLATIE

Internationaal zijn er nog geen algemeen geaccepteerde methoden die resultaten van single-species toxiciteitsexperimenten extrapoleren naar het ecosysteem. Nederland heeft op dit gebied een voorzet gedaan bv. met de methode van Kooijman(1987), van Van Straalen(1987) en van Slooff(1986). Als gemeenschappelijk uitgangspunt bij deze extrapolatiemethoden geldt dat effecten op soorten bepalend zijn voor de effecten op ecosystemen en dat de gevoeligheid voor een stof dus sterk samenhangt met die van de gevoeligste soort in een ecosysteem. In deze extrapolatie-methoden worden derhalve de resultaten van single-species laboratoriumexperimenten gebruikt om ecosystemen te beschermen.

In het advies van de Gezondheidsraad(1988) wordt aandacht besteed aan de extrapolatiemethoden van Kooijman, van Van Straalen, en van Slooff et al. De Gezondheidsraad geeft een "step-sequence" benadering die in Figuur 6 is weergegeven. De procedure is als volgt : Als er voldoende resultaten beschikbaar zijn van langdurend onderzoek wordt de methode van Kooijman toegepast. Deze methode kan ook worden toegepast met resultaten van kortdurend onderzoek met minimaal drie organismen. Kooijman gaat uit van LC50 waarden en berekent een HCS (Hazardous Concentration for Sensitive Species). Deze waarde is voor TBTO 0.04 $\mu\text{g}/\text{l}$. Bij concentraties boven deze waarde treden dus effecten op. Als de Uk (berekende waarde = uitkomst van Kooijman) groter is dan de blootstellingsconcentratie dan wordt deze waarde vergeleken met de achtergrondconcentratie. Is de Uk kleiner dan de achtergrondconcentratie dan wordt als veilige waarde voor het ecosysteem de achtergrondconcentratie genomen; is de Uk groter dan de achtergrondconcentratie dan wordt Uk als veilige waarde aangenomen. Voor TBTO geldt dat de Uk kleiner is dan de blootstellingsconcentratie zodat er langdurend onderzoek noodzakelijk is. Met NOEC-waarden van het langdurend onderzoek worden de methoden van Van Straalen en van Slooff toegepast. Voor TBTO is de Ust (berekende waarde = uitkomst van Van Straalen) 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ en de Usl (berekende waarde = uitkomst van Slooff) 0.05 $\mu\text{g}/\text{l}$. Deze waarden worden met elkaar vergeleken; als het verschil groter is dan een faktor 10, wordt de laagste waarde van deze twee aangehouden als veilige waarde voor het ecosysteem en wordt nader onderzoek noodzakelijk geacht. In het geval

van TBTO is het verschil kleiner dan een faktor 10 en wordt als veilige waarde voor het ecosysteem de uitkomst van Van Straalen voorgesteld van 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$. Bij deze concentratie zijn ook geen histopathologische effecten waargenomen bij het langdurend onderzoek met vissen (NOEC histopathologische effecten voor P.reticulata en O.latipes resp. 0.01 en 0.32 $\mu\text{g}/\text{l}$).

De veilige waarde van 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$ kan vergeleken worden met gemeten concentraties in het aquatisch ecosysteem. Ervan uitgaande dat, daar waar veel scheepvaart plaatsvindt, de concentraties in zoetwater overeen kunnen komen met die in zoutwater blijkt dat de veilige waarde lager is dan gemeten concentraties in zoutwater in Engeland, Frankrijk en Canada (resp. 3.13, 0.6 en 2.9 $\mu\text{g}/\text{l}$, TNO-rapport, 1986). De waarde die TNO geeft van 0.01-0.02 $\mu\text{g}/\text{l}$ komt overeen met de veilige waarde verkregen uit de resultaten van onderhavig onderzoek.

DANKBETUIGING

De auteurs willen Dr. H.A.M.G. Vaessen hartelijk bedanken voor het ontwikkelen van de analysemethode voor TBTO en het uitvoeren van de chemische analyses.

LITERATUUR

Canton, J.H. and W.Slooff (1977). The usefulness of Lymnaea stagnalis L. as a biological indicator in toxicological bio-assays (model substance α -HCH).

Water Research, vol.11, 117-121.

Deschiens, R. , H.Floch (1968). Action biologie comparee de 6 molluscicides chimique dans le cadre de la prophylaxie des Bilharziosis, conclusions pratiques.

Bull. Soc. Path. Exot. 61, 640-650.

Duncan, J. (1980). The toxicology of molluscicides. The organotins. Pharmac.Ther., 10, 407-429.

Floch, H. , R.Deschiens, T.Floch (1964). Sur les proprietes molluscicides de l'oxyde et de l'acetate de tributyl-etain (prophylaxie des Bilharziosis).

Bull. Soc. Path. Exot. 57, 454-465.

Gezondheidsraad (1988). Ecotoxicologische risico-evaluatie van stoffen. Advies uitgebracht door een commissie van de gezondheidsraad. no.28, 's Gravenhage, 160 pp.

Hopf, H.S., J.Duncan, J.S.S.Beesley, D.J.Webley and R.F.Sturrock (1967). Molluscicidal properties of organotin and organolead compounds with particular reference to triphenyl-lead acetate.

Bull. WHO, 36, 955-961.

International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

ISO 6341

Jordan, P. and G.Webbe (1982). Schistosomiasis : Epidemiology, Treatment and control.
London, 361.

Kooijman, S.A.L.M. (1987). A safety factor for LC₅₀ values allowing for differences in sensitivity among species.
Water Research, vol.21, 269-276.

Laughlin, R., W.French and H.E.Guard (1983). Acute and sublethal toxicity of Tributyltin oxide (TBT) and its putative environmental product, Tributyltinsulfide (TBTs) to zoeal mud crabs, Rhithropanopeus harrisii.
Water, Air and Soil Pollution, 20, 69-79.

Lawler, I.F. and J.C.Aldrich (1987). Sublethal effects of Bis(Tri-n-butyltin)oxide on Crassostrea gigas Spat.
Marine Pollution Bulletin, 18.6, 274-278.

Mather, T.H. (1984). Environmental management for vector control in rice fields.
FAO Irrigation and drainage paper 41.

M&T Chemicals Inc. (1976c). Acute toxicity of tributyltin oxide to Daphnia magna.
Report submitted by EG and G, Bionomics, Wareham, Massachusetts, to M&T Chemicals Inc., Rahway, New Jersey 07065.

Nederlands Normalisatie Instituut. Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van Daphnia magna.
NEN 6501.

Nederlands Normalisatie Instituut. Bepaling van de chronische toxiciteit met behulp van Daphnia magna.
NEN 6502.

Nederlands Normalisatie Instituut. Benodigdheden, werkwijze en medium voor het kweken van Daphnia magna en van de hiervoor als voedsel benodigde algen.

NPR 6503.

Nederlands Normalisatie Instituut. Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata.

NEN 6504.

Nederlands Normalisatie Instituut. Benodigdheden, werkwijze en medium voor het kweken van algen.

NPR 6505.

Nederlands Normalisatie Instituut. Bepaling van de toxiciteit met behulp van algen.

NEN 6506.

Nederlands Normalisatie Instituut. Benodigdheden, werkwijze en medium voor het kweken van Poecilia reticulata.

NPR 6507.

Plum, H. (1981). Comportement des composés organo-stanniques vis-à-vis de l'environnement.

Inf.Chim., 220 : 135-139.

Polster, M., and K.Halacka (1971). Beitrag zur hygienisch-toxikologischen Problematik einiger antimikrobiell gebrauchter Organozinnverbindungen.

Ernährungsforschung 16, 527-535.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

Sop nr. ARO/049.

Aquarium water-determination of tri-n-butyltin, di-n-butyltin and mono-n-butyltin compounds.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/001.

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Gasterosteus aculeatus.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/002.

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Oryzias latipes.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/005.

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Poecilia reticulata.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/022

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Daphnia magna.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/023

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Chlorella pyrenoidosa als voedsel voor Daphnia magna en Brachionus rubens.

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

SOP nr. EMD/024

Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van Scenedesmus pannonicus.

Ritchie, L.S., L.A.Berrios-Duran, L.P.Frick and I.Fox (1964).

Molluscicidal time-concentration relationships of organotin compounds.

Bull. WHO, 31, 147-149.

Seiffer, E.A. and H.F.Schoof (1967). Tests of 15 experimental molluscicides against Australorbis glabratus.

Public Health Rep. 82, 833-839.

Slooff, W., J.A.M.van Oers and D.de Zwart (1986). Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment.

Env. Tox. Chem. 5, 841-852.

Steen, W.J.van der, N.P.van den Hoven and J.C.Jager (1969).
A method for breeding and studying freshwater snails under continuous
water change, with some remarks on growth and reproduction in Lymnaea
stagnalis (L).

Neth.J.Zool. 19 (1), 131-139.

Straalen, N.M. van (1987). Stofgehalten in de bodem -(geen) effecten
op bodemdieren. In : Symposium Bodemkwaliteit van de VTCB, 75-84.
Leidschendam.

Stromgren, T. and T.Bongard (1987). The effect of Tributyltin Oxide on
growth of Mytilus edulis.

Marine Pollution Bulletin, 18.1, 30-31.

TNO

Evaluation of the impact of organotin compounds on the aquatic
environment.

Final Report to EEC, october 1986.

Wester, P.W. and J.H.Canton (1987). Histopathological study of
Poecilia reticulata (guppy) after long-term exposure to
bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC).
Aquatic Toxicology, 10, 143-165.

Wester, P.W., J.H.Canton, A.A.J.van Iersel, E.J.Krajnc and
H.A.M.G.Vaessen (1988). The toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO)
and di-n-butyltindichloride (DBTC) in the small fish species Oryzias
latipes (medaka) and Poecilia reticulata (guppy).

Aquatic Toxicology, submitted for publication.

(in proefschrift : Toxicological pathology in fish.)

Wong, P.T.S., Y.K.Chau, O.Kramar and G.A.Bengert (1982). Structure-
toxicity relationship of tin compounds on algae.

Can.J.Fish.Aquat.Sci., 39, 483-488.

Tabel 1.

Testorganismen, experimentele condities en toxicologische criteria bij het kortdurend onderzoek met bis(tri-n-butyltin)oxide.

testorganisme	<u>C.pyrenoidosa</u>	<u>S.pannonicus</u>	<u>D.magna</u>	<u>L.stagnalis</u>	<u>P.reticulata</u>	<u>O.latipes</u>	<u>G.aculeatus</u>
leeftijd	log-fase	log-fase	< 1 dag	5 mnd	3 à 4 wk	4 à 5 wk	1 à 2 dg 4 à 5 wk
blootstellings- tijd in uur	96	96	48	96	96	96	96
aantal organismen per groep	10 ⁴ cellen per ml	10 ⁴ cellen per ml	25	10	10	10	10
testmedium	M ₁ ¹⁾	M ₁ ¹⁾	DSW ¹⁾ slootwater	DSW ¹⁾ slootwater	DSW ¹⁾ slootwater	DSW ¹⁾ slootwater	DSW ¹⁾ slootwater
testvolume per groep in liter	0.150	0.150	1	1	1	1	1
temperatuur in °C	24 ± 1	24 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	23 ± 2	23 ± 2	19 ± 1
belichting	continu	continu	circadisch 12 u licht 12 u donker	circadisch 16 u licht 8 u donker	circadisch 14 u licht 10 u donker	circadisch 16 u licht 8 u donker	circadisch 16 u licht 8 u donker
doseringswijze	statisch	statisch	statisch	semistatisch	semistatisch	semistatisch	semistatisch
verversingsgraad	nvt	nvt	nvt	1x per 48 u	1x per 48 u	1x per 48 u	1x per 48 u
criterium	-groei	-groei	-immobiliteit -afwijkend gedrag en uiterlijk	-mortaliteit -afwijkend gedrag en uiterlijk	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk

1) voor de samenstelling van het medium : zie bijlage 3

nvt = niet van toepassing

Testorganismen, experimentele condities en toxicologische criteria bij het langdurend onderzoek met bis(tri-n-butyltin)oxide.

testorganisme	<u>D.magna</u>	<u>L.stagnalis</u>	<u>P.reticulata</u>	<u>O.latipes</u>
leeftijd	< 1 dag	ca. 3 mnd	3 à 4 wk	< 6 uur eieren
blootstellings-tijd in dagen	20	33	91	104
aantal organismen per groep	10 individueel	5 in duplo	25	40
testmedium	50 % DSW ¹⁾ 50 % kweek-water	DSW ¹⁾	DSW ¹⁾	DSW ¹⁾
testvolume per groep in liter	0.040 per individu	2	2.5	eistadium 0.250 visstadium 2
temperatuur in °C	19 ± 1	19 ± 1	23 ± 2	eistadium 25 ± 1 visstadium 23 ± 2
belichting	circadisch 12 u licht 12 u donker	circadisch 16 u licht 8 u donker	circadisch 14 u licht 10 u donker	circadisch 16 u licht 8 u donker
doseringswijze	semistatisch	semistatisch	semistatisch	semistatisch
verversingsgraad	3x per week (op ma, wo, vr)	3x per week (op ma, wo, vr)	3x per week (op ma, wo, vr)	3x per week (op ma, wo, vr)
criterium	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk -reproductie -groei	-mortaliteit -afwijkend gedrag en uiterlijk -embryonale ontwikkeling -reproductie	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk -groei -histopathologische effecten	-mortaliteit -verlamming -afwijkend gedrag en uiterlijk -embryonale ontwikkeling -hartslag -groei -histopathologische effecten

1) voor de samenstelling van het medium : zie bijlage 3.

Tabel 3.

Resultaten (in $\mu\text{g/l}$) van het kortdurend onderzoek uitgevoerd in DSW.

testorganisme	LC ₅₀ ¹⁾	EC ₅₀ ²⁾	NOEC ²⁾
<u>C.pyrenoidosa</u>	---	42	18
<u>S. pannonicus</u>	---	64	32
<u>D.magna</u>	4.7	0.75	0.56
<u>L.stagnalis</u>	42	2.4	1.8
<u>P.reticulata</u>	21	7.5	5.6
<u>O.latipes</u>	17	7.5	5.6
<u>G.aculeatus</u> (1 à 2 dg)	19	7.5	5.6
(4 à 5 wk)	13	4.2	3.2

1) het effect is mortaliteit; voor D.magna immobiliteit

2) het effect is mortaliteit, verlamming, afwijkend gedrag en uiterlijk; voor C.pyrenoidosa en S. pannonicus groeiremming.
(het waargenomen effect per organisme wordt vermeld in Tabel 4)

--- = niet gescoord

Tabel 4.
Effekten die bestudeerd werden tijdens het kortdurend onderzoek.

mogelijke optredende effecten	<u>C.pyr.</u> en <u>S.pan.</u>	<u>D.magna</u>		<u>L.stagnalis</u>		<u>P.reticulata</u>		<u>O.latipes</u>		<u>G.aculeatus</u>		
	M ₁	DSW	sloot water	DSW	sloot water	DSW	sloot water	DSW	sloot water	DSW	DSW	sloot water
										1 à 2 dg	4 à 5 wk	4 à 5 wk
groeiremming	+	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt
mortaliteit	nvt	nvt	nvt	+	+	+	+	+	+	+	+	+
verlamming	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	-	-	+	-	+	-	-
immobiliteit	nvt	+	+	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt
afwijkend gedrag												
- trager		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- stilliggend	nvt	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
- ongecoördineerd zwemgedrag		+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
afwijkend uiterlijk												
- bleker/donkerder		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- krom	nvt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

+ = waargenomen
- = niet waargenomen
nvt = niet van toepassing

Resultaten (in $\mu\text{g}/\text{l}$) van het kortdurend onderzoek uitgevoerd in slootwater.

testorganisme	LC ₅₀ ¹⁾	EC ₅₀ ²⁾	NOEC ²⁾
<u>D.magna</u>	5.8	2.4	1.8
<u>L.stagnalis</u>	42	4.2	3.2
<u>P.reticulata</u>	31	7.5	5.6
<u>O.latipes</u>	16	2.4	1.8
<u>G.aculeatus</u>	13	4.2	3.2

1) het effect is mortaliteit; voor D.magna immobiliteit.2) het effect is mortaliteit, verlamming, afwijkend gedrag en uiterlijk.
(het waargenomen effect per organisme wordt vermeld in Tabel 4)

Tabel 6.

NOLC -en NOEC-waarden (in $\mu\text{g}/\text{l}$) van het langdurend onderzoek.

test- organisme	NOLC	NOEC					
		morta- liteit	af- wijkend gedrag en ui- terlijk	hartslag	embryo- nale ont- wikke- ling	repro- duktie	groei
<u>D.magna</u>	1.0	1.0	---	---	1.0	0.56	---
<u>L.stagnalis</u>	1.0	0.32	---	0.32	0.32	---	---
<u>P.reticulata</u>	3.2	1.0	---	---	---	0.32	0.010
<u>O.latipes</u>	3.2	1.0	≥ 32	≥ 32	---	≥ 10	0.32

--- = niet gescoord of niet van toepassing

Tabel 7.
Teruggevonden hoeveelheden TBTO in $\mu\text{g}/\text{l}$ gedurende het langdurend toxiciteitsonderzoek met O.latipes.

toegevoegde hoeveelheid	terug gevonden hoeveelheid op	
	t = 0 uur	t = 48 uur
1.0	1.3	< 1.0
1.0	1.2	< 1.0
10	12	8.7
10	11	9.4

detectiegrens is $1.0 \mu\text{g}/\text{l}$

Tabel 8.

Effekten die bestudeerd werden tijdens het langdurend onderzoek.

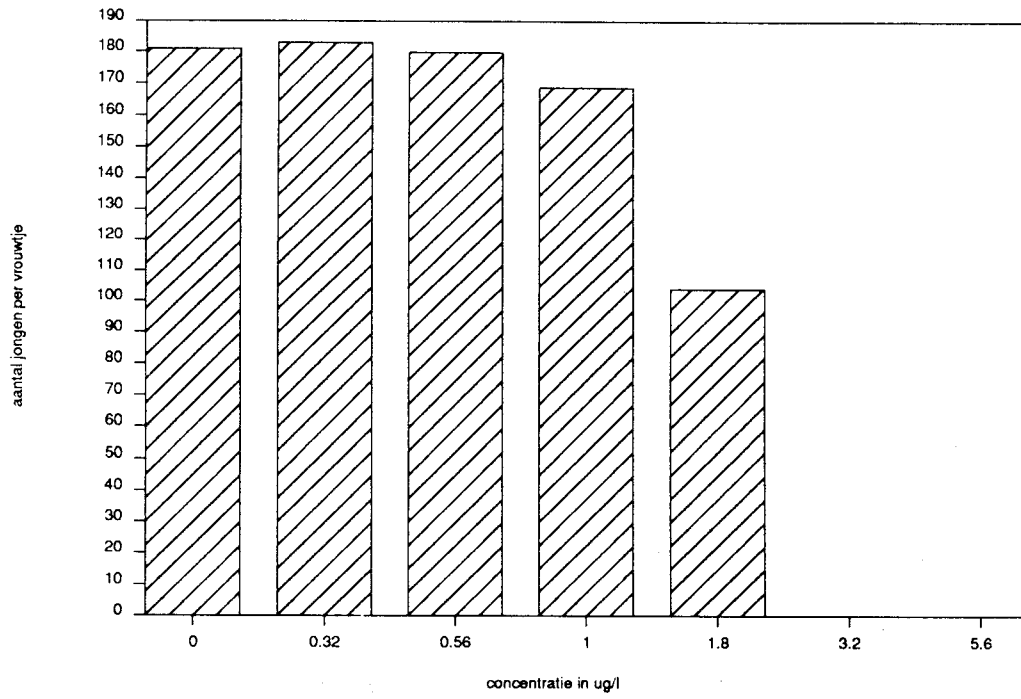
mogelijke effekten	<u>D.magna</u>	<u>L.stagnalis</u>	<u>P.reticulata</u>	<u>O.latipes</u>
mortaliteit	+	+	+	+
verlamming	-	nvt	-	+
afwijkend gedrag -trager -stilliggend -ongecoördineerd zwemgedrag	+ - -	+ + -	+ - -	+ + -
afwijkend uiterlijk -bleker/donkerder	+	+	+	+
invloed op hartslagfrequentie	nvt	nvt	nvt	-
afwijkingen tijdens embryonale fase	nvt	+	nvt	-
reproductieremming	+	+	nvt	nvt
groeiremming	+	nvt	+	-
histopathologische afwijkingen	nvt	nvt	+	+

+ = waargenomen
 - = niet waargenomen
 nvt = niet van toepassing

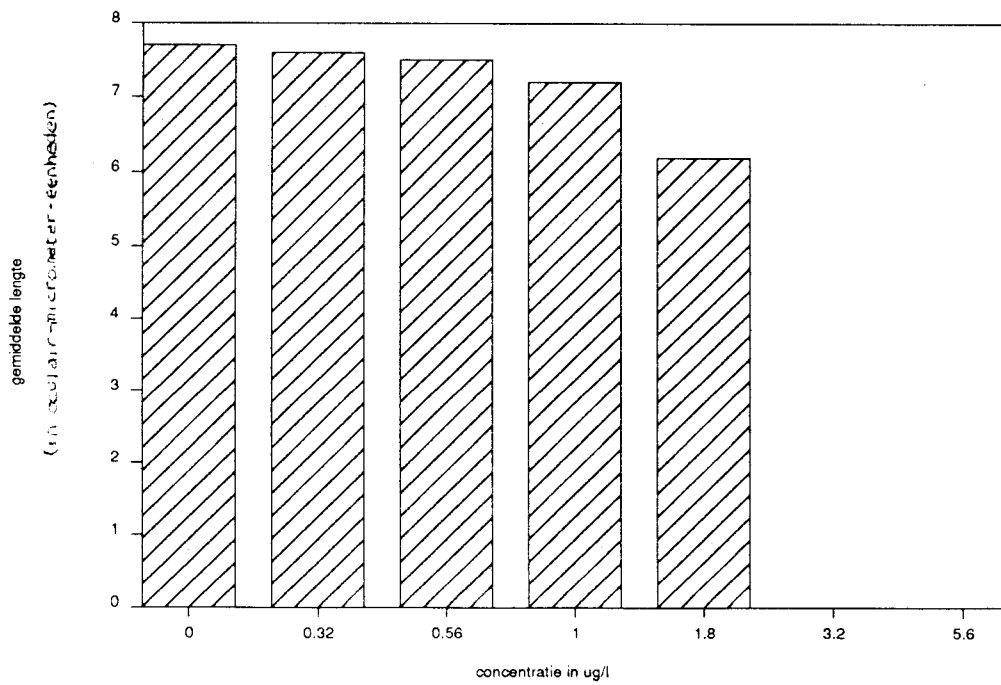
Tabel 9.

Veilige waarden (in $\mu\text{g}/\text{l}$) voor het aquatisch ecosysteem, berekend met behulp van een aantal extrapolatiemethoden.

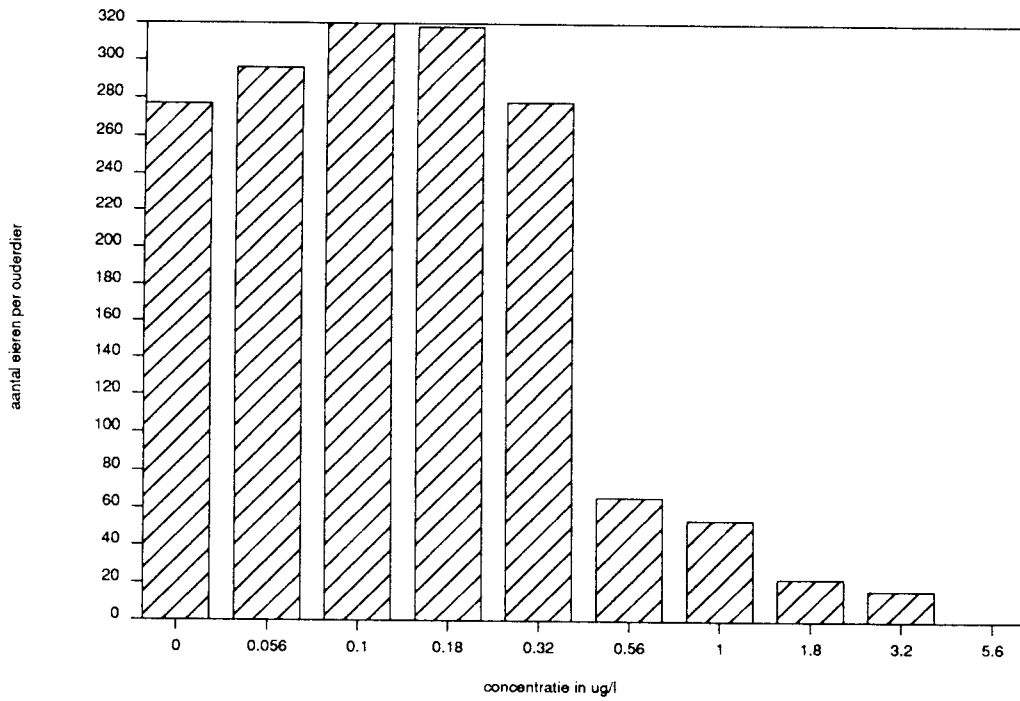
methode	waarden gebruikt voor berekening	veilige waarde voor ecosysteem
Kooyman	LC ₅₀ - waarden uit langdurende experimenten	0.04
Van Straalen	laagste NOEC-waarden uit langdurende experimenten (m.u.v. NOEC histopath.eff.)	0.01
Slooff	laagste NOEC-waarden uit langdurende experimenten (m.u.v. NOEC histopath.eff.)	0.05



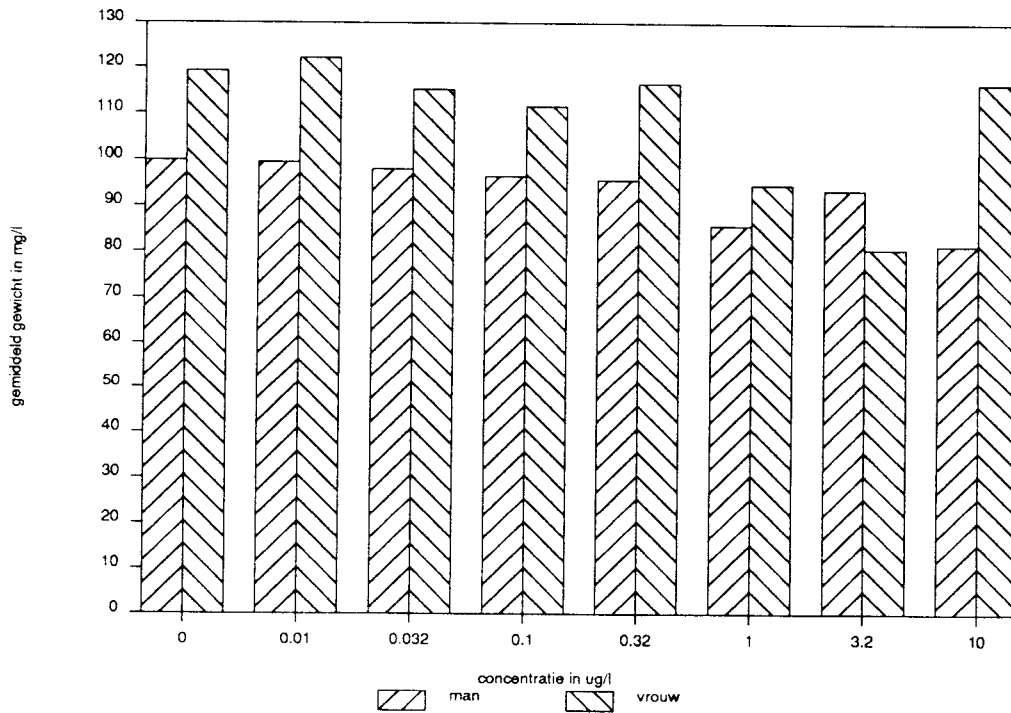
Figuur 1.
Reproductie van D.magna onder invloed van TBTO.



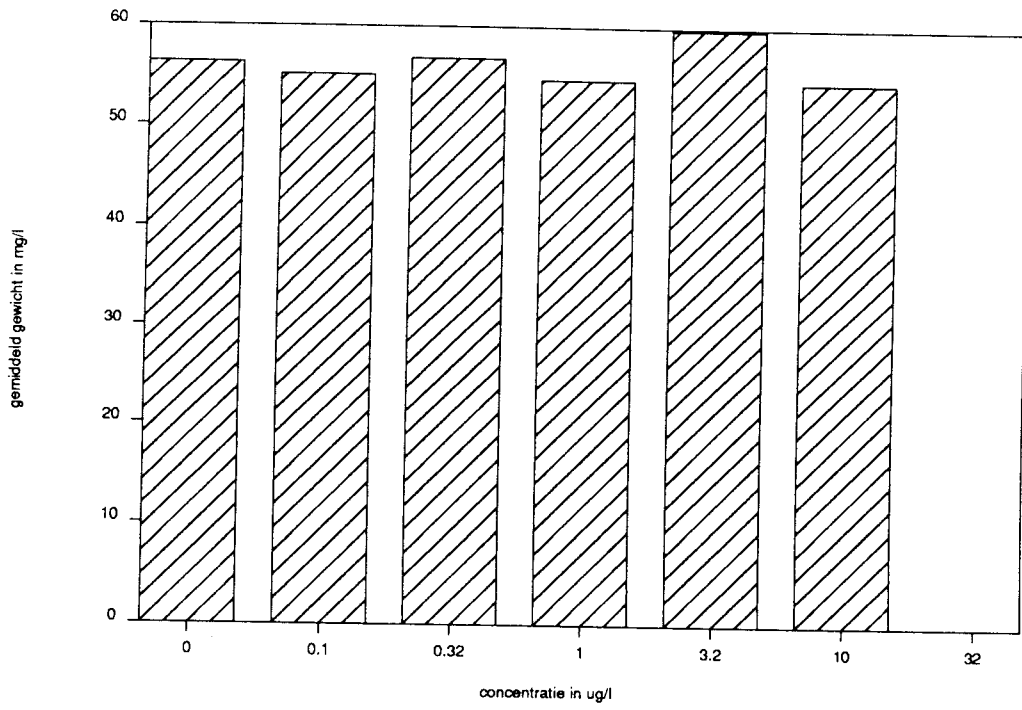
Figuur 2.
Groei van D.magna onder invloed van TBTO.



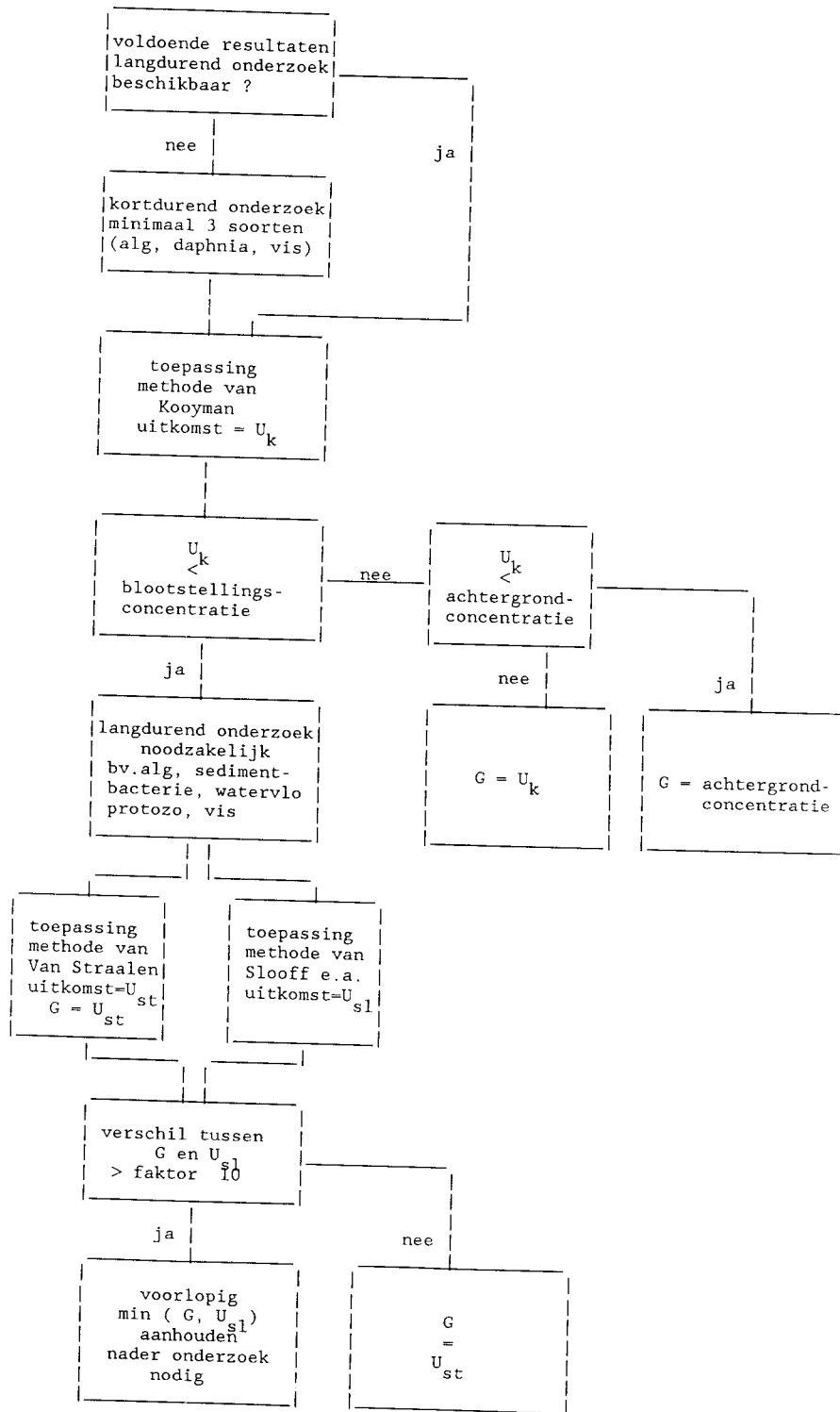
Figuur 3.
Reproductie van L.stagnalis onder invloed van TBTO.



Figuur 4.
Groei van P.reticulata onder invloed van TBTO.

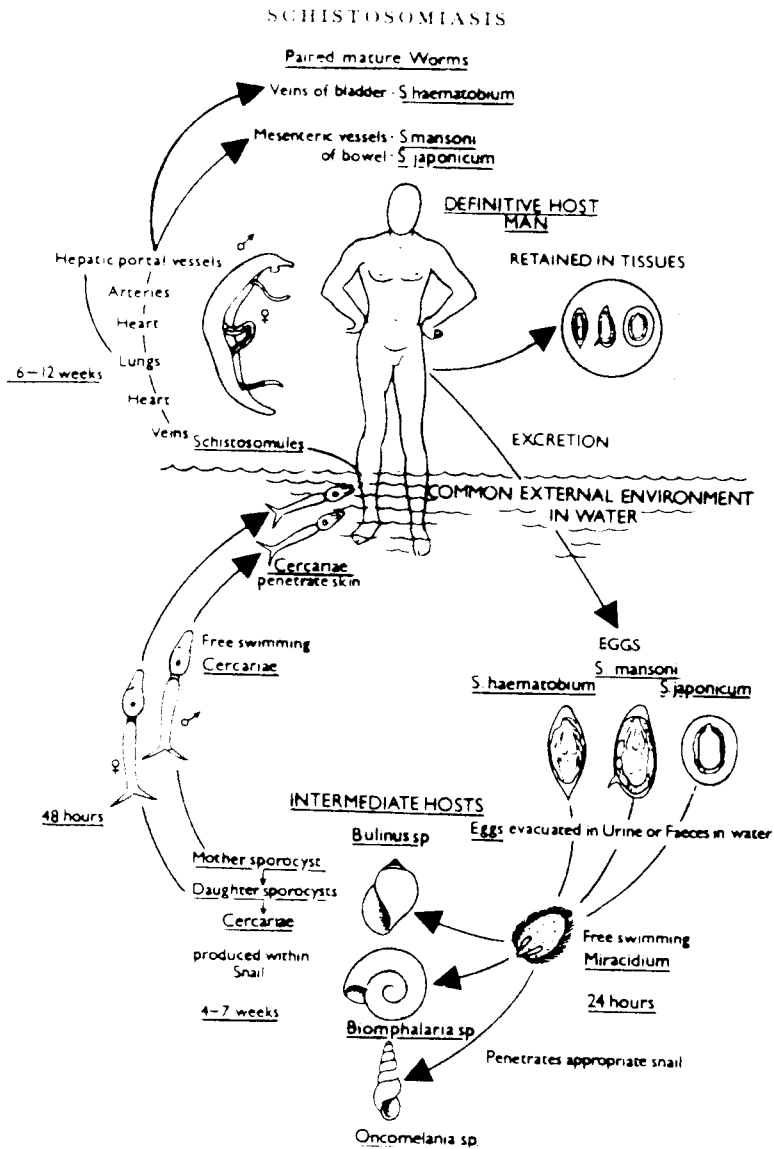


Figuur 5.
Groei van O.latipes onder invloed van TBTO.



Figuur 6. Schematisch overzicht van de procedure voor ecotoxicologische risico-evaluatie voorgesteld door de Gezondheidsraad.

Bijlage 1.
Levenscyclus van schistosoma parasieten.
(Jordan and Webbe, 1982)



Bijlage 2.

Resultaten van een aantal bepalingen in slootwatermonsters gemeten op de dag van monstername.

monster	pH	O ₂ in mg/l	NO ₃ ⁻ in mg/l	NO ₂ ⁻ in mg/l	NH ₄ ⁺ in mg/l	hardheid in °DH
1	7.60	6.5	30	0.5	1.0	13
2	7.51	6.1	100	0.5	1.0	12
3	7.05	7.5	10-30	0.5	3.0	7
4	8.92	9.0	30	0.5	0.5	12
5	7.73	8.1	10	0.5	1.0-3.0	17
6	7.80	8.1	30	0.5-1.0	3.0	15
7	7.62	9.4	10-30	0.25-0.5	3.0-5.0	10
8	7.89	11.2	10	0.25-0.5	3.0-5.0	11
9	8.75	16.2	---	0.25-0.5	0.5-1.0	14
10	7.42	11.2	30-100	0.25-0.5	10	8
11	7.39	8.3	30	0.5	5.0-10	9
12	7.39	8.3	30	0.5	5.0-10	9
13	8.04	8.8	10	0.5-1.0	5.0	9
14	8.16	9.8	10-30	1.0	5.0	8

--- = niet uitgevoerd

Bijlage 3.

Bestanddelen en eigenschappen van de gebruikte standaardmedia.

Ionen	M ₁ -medium		DSW	
	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l
Ca ²⁺	9.62	0.24	54.5	1.36
Mg ²⁺	7.29	0.30	17.8	0.73
Na ⁺	222.2	9.66	27.4	1.19
K ⁺	17.9	0.46	7.8	0.20
Fe ³⁺	1.01	0.02	---	---
Mn ²⁺	0.49	0.0091	---	---
Cu ²⁺	0.02	0.00032	---	---
Zn ²⁺	0.05	0.00081	---	---
NH ₄ ⁺	74.3	4.12	---	---
Cl ⁻	17.8	0.50	96.3	2.72
CO ₃ ²⁻	113.4	1.89	---	---
HCO ₃ ⁻	---	---	84.8	1.39
SO ₄ ²⁻	28.8	0.30	70.2	0.73
HPO ₄ ²⁻	22.1	0.23	---	---
NO ₃ ⁻	620	10.0	---	---
C ₆ H ₅ O ₇ ³⁻	3.4	0.02	---	---
hardheid (°DH)	3.02		11.7	
pH	7.7 ± 0.5		8.2 ± 0.2	

Bijlage 4.

- 4.1 LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met D.magna.
- 4.2 Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met D.magna.
- 4.3 Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met D.magna.
- 4.4 LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met de P-generatie van L.stagnalis.
- 4.5 Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met de P-generatie van L.stagnalis.
- 4.6 Scoringsresultaten van het onderzoek met de F₁-generatie van L.stagnalis gedurende de embryonale fase.
- 4.7 Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met L.stagnalis.
- 4.8 LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met P.reticulata.
- 4.9 Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met P.reticulata.
- 4.10 Resultaten van de groeimetingen gedurende het langdurend onderzoek met P.reticulata.
- 4.11 Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met P.reticulata.
- 4.12 LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met O.latipes.
- 4.13 Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met O.latipes.
- 4.14 Resultaten van de hartslag -en groeimetingen gedurende het langdurend onderzoek met O.latipes.
- 4.15 Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met O.latipes.

Bijlage 4.1

LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met D.magna.

Scorings- tijdstip	1)	2)	3)	1)	2)	3)	4)	5)
	LC50	EC50	EC50	NOLC	NOEC	NOEC	NOEC	NOEC
week 1	3.2	2.4	---	1.8	1.8	---	---	1.8
week 2	2.4	1.4	---	1.8	1.0	---	---	---
einde proef	1.8	1.4	2.1	1.0	1.0	1.0	0.56	---

- 1) het effect is mortaliteit
 - 2) het effect is mortaliteit, afwijkend gedrag (trager) en uiterlijk (bleker).
 - 3) het effect is reproductieremming
 - 4) het effect is groeiremming
 - 5) het effect is het tijdstip van eieren verkrijgen in de broedkamer
- = niet gescoord of niet van toepassing

Bijlage 4.2

Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met D.magna.

parameter	concentratie in µg/l						
	0	0.32	0.56	1.0	1.8	3.2	5.6
mortaliteit (in %)							
-week 1	0	0	0	0	0	54	100
-week 2	0	0	0	0	0	100	100
-einde proef	10	0	10	0	60	100	100
mortaliteit (in %) en overige 1) sublethale eff.							
-week 1	0	0	0	0	0	100	100
-week 2	0	0	0	0	100	100	100
-einde proef	10	0	10	0	100	100	100
reproductie					***		
-aantal jongen x per vrouwtje sd na 4 worpen n	181 13 10	183 10 10	180 12 9	169 15 10	104 51 3	0	0
-in % tov blanco	---	100	99	93	57	0	0
groei				***	***		
-lengte x (in oculair- micrometer- eenheden)	7.7 0.3 9	7.6 0.3 10	7.5 0.2 9	7.2 0.2 10	6.2 0.5 4	---	---
-in % tov blanco	---	99	97	94	81	---	---

Student-T-toets : *** p < 0.001

- 1) waargenomen effecten zijn : trager, bleker
- = niet gescoord of niet van toepassing

Bijlage 4.3

Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met D.magna.

pH	concentratie in $\mu\text{g/l}$							
	0		1.8		3.2		5.6	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.
0 uur	7.69	7.92	8.02	8.02	7.94	7.94	7.84	7.84
48 uur	7.73	8.17	7.89	7.89	8.09	8.09	8.22	8.22
O_2								
0 uur	7.5	8.3	8.6	8.6	9.1	9.1	8.1	8.1
48 uur	7.6	8.9	8.2	8.2	9.0	9.0	8.9	8.9

Bijlage 4.4

LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC -waarden (in $\mu\text{g/l}$) uit het langdurend onderzoek met de P-generatie van L.stagnalis.

Scorings- tijdstip	1)	2)	3)	1)	2)	3)
	LC50	EC50	EC50	NOLC	NOEC	NOEC
dag 12	> 5.6	0.56	---	3.2	0.32	---
dag 19	3.4	0.54	---	3.2	0.32	---
dag 26	2.6	0.50	---	1.0	0.32	---
einde proef	1.5	0.46	0.38	1.0	0.32	0.32

1) het effect is mortaliteit

2) het effect is mortaliteit, afwijkend gedrag (trager, stilliggend) en uiterlijk (bleker).

3) het effect is reproductieremming

--- = niet gescoord of niet van toepassing

Bijlage 4.5
Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met de P-generatie van L.stagnalis.

parameter	concentratie in µg/l									
	0	0.056	0.10	0.18	0.32	0.56	1.0	1.8	3.2	5.6
mortaliteit(in %)										
-dag 12	0	0	0	0	10	0	0	10	0	40
-dag 19	10	0	20	0	20	0	0	30	10	90
-dag 26	10	10	30	0	20	30	10	50	30	100
-einde proef	10	10	30	0	20	30	10	70	80	100
mortaliteit(in %) en overige 1) sublethale eff.										
-dag 12	0	0	0	0	10	50	100	100	100	100
-dag 19	10	0	20	0	20	50	100	100	100	100
-dag 26	10	10	30	0	20	60	100	100	100	100
-einde proef	10	20	30	0	30	60	100	100	100	100
reproductie										
-gemiddeld aantal eieren per ouder	277	296	320	318	278	66	54	23	17	0
-in % tov blanco	100	107	116	115	100	24	19	8	6	0

Student-T-toets niet uitgevoerd.

1) waargenomen effecten zijn : trager, stilliggend, bleker

Bijlage 4.6
Scoringsresultaten van het onderzoek met de F₁-generatie van L.stagnalis gedurende de embryonale fase.

parameter	concentratie in µg/l									
	0	0.056	0.10	0.18	0.32	0.56	1.0	1.8	3.2	
mortaliteit(in %)										
-dag 2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
-dag 5	0	0	1	1	1	7	0	0	93	
-dag 7	0	0	1	4	2	11	0	0	93	
-dag 9	5	2	2	4	11	100	0	0	100	
mortaliteit(in %) en overige 1) sublethale eff.										
-dag 2	0	0	1	0	0	0	0	0	100	
-dag 5	0	0	1	1	0	7	0	0	100	
-dag 7	1	0	2	4	1	11	0	0	100	
-dag 9	6	2	17	20	18	100	14	80	100	

1) waargenomen effecten zijn : afwijkend uiterlijk en achterstand in ontwikkeling.

Bijlage 4.7

Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met L.stagnalis.

pH	concentratie in $\mu\text{g/l}$					
	0		3.2		5.6	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.
0 uur	8.11	8.17	7.97	7.97	8.07	8.07
48 uur	7.45	7.57	7.45	7.45	7.63	7.63
O_2						
0 uur	8.3	8.5	8.5	8.5	8.4	8.4
48 uur	6.0	6.7	6.4	6.4	6.2	6.2

Bijlage 4.8

LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC-waarden (in $\mu\text{g/l}$) uit het langdurend onderzoek met P.reticulata

Scorings-tijdstip	LC50 ¹⁾	EC50 ²⁾	NOLC ¹⁾	NOEC ²⁾	NOEC ³⁾
week 1	14	5.6	3.2	3.2	---
week 2	18	5.8	3.2	3.2	---
week 3	17	5.8	3.2	3.2	---
week 4	16	5.8	3.2	3.2	1.0
week 8	13	5.8	3.2	3.2	---
einde proef	12	1.8	3.2	1.0	0.32

1) het effect is mortaliteit

2) het effect is mortaliteit, afwijkend gedrag (trager) en uiterlijk (bleker, donkerder)

3) het effect is groeiremming

--- = niet gescoord

Bijlage 4.9

Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met P.reticulata

parameter	concentratie in $\mu\text{g/l}$								
	0	0.010	0.032	0.10	0.32	1.0	3.2	10	32
mortaliteit (in %)									
-week 1	0	0	2	0	2	0	0	6	100
-week 2	0	2	2	0	6	0	2	6	100
-week 3	0	4	2	0	6	0	2	14	100
-week 4	0	6	2	2	6	0	2	16	100
-week 8	0	6	2	2	6	0	2	30	100
-einde proef	0	6	2	2	6	0	2	33	100
mortaliteit (in %) en overige sublethale eff. 1)									
-week 1	0	0	2	0	2	0	0	100	100
-week 2	0	2	2	0	6	0	2	100	100
-week 3	0	4	2	0	6	0	2	100	100
-week 4	0	6	2	2	6	0	2	100	100
-week 8	0	6	2	2	6	0	2	100	100
-einde proef	0	6	2	2	6	0	100	100	100

1) waargenomen effecten zijn : trager, bleker, donkerder

Resultaten van de groeimetingen gedurende het langdurend onderzoek met P.reticulata

parameter			concentratie in µg/l							
			0	0.010	0.032	0.10	0.32	1.0	3.2	10
lengte (in mm)										
-dag 0	man	x	16.1							
		sd	1.2	--	--	--	--	--	--	--
		n	11							
	vrouw	x	16.6							
		sd	1.6	--	--	--	--	--	--	--
		n	14							
-week 4	man	x	18.3	18.8	18.1	18.5	18.7	17.5	17.8	17.1
		sd	1.0	1.2	1.0	1.1	1.3	0.8	0.5	0.8
		n	6	4	4	6	6	5	6	4
	vrouw	x	19.1	18.8	18.8	18.3	18.5	18.3	16.**	13.8*
		sd	1.1	0.9	1.2	0.5	1.0	1.0	0.9	4.0
		n	4	6	6	4	4	5	4	6
-einde proef	man	x	23.4	23.2	22.8	22.1***	23.0	21.4***	20.8***	20.7***
		sd	0.9	0.9	1.2	1.0	1.2	1.2	1.1	2.2
		n	14	19	21	17	19	17	12	17
	vrouw	x	24.5	24.4	24.3	23.7*	23.7	22.0***	21.7***	22.1**
		sd	0.9	1.1	1.1	1.0	1.3	1.2	1.3	2.7
		n	15	17	18	22	17	23	17	6
gewicht (in mg)										
-dag 0	man	x	34.3							
		sd	7.5	--	--	--	--	--	--	--
		n	11							
	vrouw	x	36.8							
		sd	9.5	--	--	--	--	--	--	--
		n	14							
-week 4	man	x	47.2	50.9	47.7	51.0	50.6	41.0	48.2	42.0
		sd	4.0	10.3	4.6	11.1	13.0	5.8	6.0	8.8
		n	6	4	4	6	6	5	6	4
	vrouw	x	51.7	46.3	50.5	44.1	46.9	49.5	37.4*	36.8
		sd	7.8	6.9	10.3	3.8	8.4	10.8	5.3	12.2
		n	4	6	6	4	4	5	4	6
-einde proef	man	x	99.9	99.5	98.1	96.5	95.7	85.8***	93.7**	81.6**
		sd	9.0	9.8	13.0	9.0	9.5	10.2	16.1	19.9
		n	14	18	21	17	18	17	12	17
	vrouw	x	119.2	122.1	115.2	111.7	116.6	94.8**	80.8***	116.6
		sd	32.3	16.7	15.1	15.0	19.2	15.0	10.2	28.2
		n	15	17	18	22	17	23	17	5

Student-T-toets : * p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

-- = niet van toepassing

Bijlage 4.11

Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurende onderzoek met P.reticulata.

pH	concentratie in $\mu\text{g/l}$			
	0		10	
	min.	max.	min.	max.
0 uur	7.96	8.39	8.04	8.41
48 uur	7.31	7.68	7.29	7.78
72 uur	--	--	--	--
O_2				
0 uur	8.3	8.9	8.5	9.1
48 uur	2.0	7.0	2.0	7.4
72 uur	5.1	5.3	6.0	6.0

-- = niet gemeten

Bijlage 4.12

LC/EC₅₀-en NOLC/NOEC-waarden (in µg/l) uit het langdurend onderzoek met O.latipes.

scorings- tijdstip	1)	2)	1)	2)	3)	4)	5)
	LC50	EC50	NOLC	NOEC	NOEC	NOEC	NOEC
einde eistadium	> 32	> 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	---
visstadium							
dag 0	> 32	1.8	≥ 32	1.0	---	---	---
week 1	18	1.8	10	1.0	---	---	---
week 2	16	1.8	3.2	1.0	---	---	---
week 3	13	1.8	3.2	1.0	---	---	---
week 4	11	1.8	3.2	1.0	---	---	---
week 8	11	5.6	3.2	3.2	---	---	---
einde proef	7.5	5.6	3.2	3.2	---	---	≥ 10

1) het effect is mortaliteit

2) het effect is mortaliteit, verlamming, afwijkend gedrag (trager, stilliggend) en uiterlijk (bleker, donkere plekken tussen romp en staart)

3) het effect is invloed op de hartslagfrequentie na 7 dagen.

4) het effect is invloed op het uitkomen van de vissen

5) het effect is groeiremming

--- = niet gescoord of niet van toepassing

Bijlage 4.13

Scoringsresultaten van het langdurend onderzoek met O.latipes.

parameter	concentratie in µg/l						
	0	0.10	0.32	1.0	3.2	10	32
mortaliteit (in %)							
einde eistadium	8	4	2	4	2	4	6
visstadium dag 0	8	4	2	4	2	4	8
week 1	10	4	2	4	2	11	100
week 2	20	4	2	4	4	26	100
week 3	22	4	2	4	7	40	100
week 4	22	4	2	4	19	50	100
week 8	25	4	4	7	26	59	100
einde proef	25	7	4	7	26	77	100
mortaliteit (in %) en overige 1) sublethale eff.							
einde eistadium	10	20	10	8	2	6	10
visstadium dag 0	10	20	10	8	100	100	100
week 1	12	20	10	8	100	100	100
week 2	24	20	10	8	100	100	100
week 3	24	20	10	8	100	100	100
week 4	24	20	10	8	100	100	100
week 8	27	20	12	11	26	100	100
einde proef	27	23	12	18	26	100	100

1) waargenomen effecten zijn : verlamming, trager, stilliggend, bleker, donkere plekken tussen romp en staart.

Bijlage 4.14

Resultaten van de hartslag -en groeimetingen gedurende het langdurend onderzoek met O.latipes

parameter	concentratie in $\mu\text{g/l}$						
	0	0.10	0.32	1.0	3.2	10	32
hartslag (aantal slagen per 15 sec.) -7 dagen (ei-stadium)	x	34.7	---	---	---	---	35.3
	sd	1.8	---	---	---	---	2.6
	n	22					22
lengte (in mm)						***	
-week 4	x	12.3	11.7	11.8	11.8	11.6	10.3
	sd	0.7	1.2	0.6	1.1	1.4	1.0
	n	10	10	10	10	10	10
-einde proef	x	20.1	20.0	20.1	19.7	20.5	18.1
	sd	2.3	1.9	1.5	2.4	1.5	2.2
	n	13	29	29	29	11	5
gewicht (in mg)			**	*	*		***
-week 4	x	12.5	9.0	10.0	9.7	10.5	7.5
	sd	2.3	2.6	1.9	2.9	3.4	2.1
	n	10	10	10	10	10	10
-einde proef	x	56.2	55.0	56.7	54.6	59.8	54.5
	sd	17.3	16.1	12.5	17.7	11.4	16.6
	n	13	29	29	29	11	5

Student-T-toets : * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$
 --- = niet gescoord of niet van toepassing

Bijlage 4.15

Resultaten van de zuurgraad en zuurstofmetingen (in mg/l) in de blanco en hoogst aanwezige concentratie tijdens het langdurend onderzoek met O.latipes.

pH	concentratie in $\mu\text{g/l}$							
	0		3.2		10		32	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.
0 uur	8.16	8.47	8.17	8.45	8.17	8.23	8.24	8.24
48 uur	7.55	8.14	7.51	8.04	7.71	7.74	7.83	7.83
O_2								
0 uur	8.3	9.2	8.5	9.6	8.9	9.0	9.0	9.0
48 uur	6.3	7.8	5.8	7.0	6.9	7.3	6.9	6.9