

RESEARCH INSTITUUT TOXICOLOGIE RU UTRECHT

Rapportnr. 719101002

Toxiciteit en toxicokinetiek voor benthische organismen:

I: Toxiciteit en BCF-waarden van chloorbenzenen in standaardwater voor *Chironomus riparius*

C.J. Roghair¹, A. Buijze¹, E. Yedema² en J.L.M. Hermens².

Juli 1992

2e druk November 1992

- 1) Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene
Ant. van Leeuwenhoeklaan 9, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven
- 2) Research Instituut Toxicologie
Rijksuniversiteit Utrecht, Yalelaan 2, 3584 CM Utrecht

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht en ten laste van het Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling en Directie Bodem, als RIVM project nr. 719101, Eco-Routing en RITOX project nr. DGM 361.283.

VERZENDLIJST

1 - 5	Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling
6 - 10	Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Bodem
11	Directeur-Generaal Milieubeheer
12	Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer
13	Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
14 - 18	Prof.dr. W. Seinen, RITOX
19 - 20	Prof.dr. N.M. van Straalen, VU
21	Prof.dr. W.C. Turkenburg
22	Directie RIVM
23	Sectordirecteur Stoffen en Risico's, dr.ir. G. de Mik
24	Adviescentrum Toxicologie, t.a.v. mw. drs. A.G.A.C. Knaap
25 - 30	Laboratorium voor Ecotoxicologie, t.a.v. prof.dr. H.A.M. de Kruijf
31	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
32 - 35	auteurs
36	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
37	Bureau Rapportenbeheer
38	Bibliotheek RIVM
39	Bibliotheek RIVM, depot ECO/LWD
40	Depot ECO
41 - 42	Archief ECO/AET
43 - 50	Reserve-exemplaren

INHOUD

Verzendlijst	ii
Inhoud	iii
Abstract	v
Samenvatting	1
1. Inleiding	2
2. Materiaal en methoden	3
2.1 Teststoffen en verdunningen	3
2.2 Testorganisme	4
2.3 Testmethoden	5
2.4 Bepaling van het lipidegehalte	6
2.5 Chemische analyse van de chloorbenzenen	6
2.5.1 Principe	6
2.5.2 Opwerken van de watermonsters	6
2.5.3 Opwerken van de larvemonsters	7
2.5.4 Detectie van de chloorbenzenen	8
3. Resultaten	9
3.1 Lipiden-bepaling	9
3.2 Toxiciteits-experimenten	9
3.3 Lethal body burden-experimenten	9
3.4 Chemische analyses	10
4. Discussie	11
4.1 Lipiden-bepaling	11
4.2 Toxiciteits-experimenten	11
4.3 Lethal body burden-experimenten	12
5. Conclusies	14
6. Referenties	15
Tabellen:	
1. Experimentele condities ten behoeve van de lipiden-bepaling	17
2. Experimentele condities en toxicologische parameters in de toxiciteitstoetsen	18
3. Experimentele condities in de lethal body burden-experimenten	19
4. Specificaties van de gaschromatograaf/electron capture detector	20
5. Lipidegehalten van larven	21

6. Actuele 48-uurs LC50-waarden	23
7. BCF, log BCF en LBB (natgewicht)	24
8. BCF, log BCF en LBB voor QCB in diverse larvale stadia	24
9. BCF en log BCF (vetgewicht)	25
10. Afname in actuele concentraties	26
11. Lethal body burden-waarden voor diverse organismen	27
12. Berekende lethal body burden-waarden voor <i>C. riparius</i>	28

Figuren:

1. Log LC50 voor <i>C. riparius</i> als functie van log Kow	29
2. Log BCF als functie van log Kow	30
3. Log LC50 voor <i>C. riparius</i> als functie van log Kow in relatie tot enkele andere QSARs	31
4. Log BCF voor DCB als functie van de tijd	32
5. Log BCF voor TCB als functie van de tijd	33
6. Log BCF voor TeCB als functie van de tijd	34
7. Log BCF voor QCB als functie van de tijd	35

Bijlagen:

1. Samenstelling van DSW	37
2. Overzicht van de resultaten van de toxiciteits-experimenten	
2.1 DCB, toegevoegd via ultrasoon trillen	39
2.2 TCB, toegevoegd via een generator-kolom	40
2.3 TeCB, toegevoegd via een generator-kolom	41
2.4 TeCB, toegevoegd via DMSO	42
2.5 QCB, toegevoegd via een generator-kolom	43
2.6 QCB, toegevoegd via DMSO	44
3. Overzicht van de resultaten van de lethal body burden-experimenten	
3.1 DCB, toegevoegd via ultrasoon trillen	45
3.3 TCB, toegevoegd via een generator-kolom	47
3.3 TeCB, toegevoegd via een generator-kolom	49
3.4 TeCB, toegevoegd via DMSO	51
3.5 QCB, toegevoegd via een generator-kolom	53
3.6 QCB, toegevoegd via DMSO	55

ABSTRACT

This report is the first in a series to support the so called porewater hypothesis which is used to derive sediment quality criteria. The porewater hypothesis assumes that toxicity to benthic organisms is caused by the soluble fraction of the substance present in porewater. In this report a QSAR is calculated for the acute toxicity of chlorobenzenes in standard water to the midge larvae *Chironomus riparius*. Lethal body burdens are presented as well as bioconcentration factors. The results give rise to the idea of metabolism of the chlorobenzenes by *C.riparius*.

SAMENVATTING

Voor het afleiden van stofgerichte normen ter bescherming van waterbodems wordt momenteel gebruik gemaakt van de zogenaamde poriewaterhypothese. Deze hypothese stelt dat de toxiciteit van in sediment aanwezige stoffen voor waterbodembewonende organismen veroorzaakt wordt door de in het poriewater opgeloste fractie. Bij gebrek aan experimenteel bepaalde toxiciteitsgegevens voor waterbodemorganismen wordt deze poriewaterhypothese gecombineerd met de evenwichtspartitie-theorie zodanig dat toxiciteitsgegevens voor pelagische aquatische organismen gebruikt kunnen worden voor het schatten van de toxiciteit voor waterbodembewoners.

Het voorliggende rapport is het eerste van een project ter onderbouwing van de poriewaterhypothese. In dit project wordt de toxiciteit evenals de opnameroutes van verschillende stoffen in sediment voor de muggelarve *Chironomus riparius* en de oligochaet *Branchiura sowerbyi* onderzocht.

In dit rapport is de toxiciteit evenals de lethal body burden van enkele chloorbenzenen voor *C. riparius* in standaard water beschreven.

De toxiciteitsexperimenten zijn uitgevoerd met 1,4-dichloorbenzeen, 1,2,3-trichloorbenzeen, 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen en pentachloorbenzeen en hebben geleid tot een QSAR van goede kwaliteit:

$$\log LC50 = -1,12 * \log Kow - 0,30 \quad (LC50 \text{ in mol/l; } r^2 = 0,99)$$

Deze relatie verschilt weinig van QSARs die voor andere organismen met narcotisch werkende stoffen zijn gevonden.

Met dezelfde stoffen zijn lethal body burden-experimenten uitgevoerd waarbij ook de opnamekinetiek bij hoge concentraties werd bepaald. Deze experimenten geven anders dan verwacht interne lethale concentraties die overeenkomen met stoffen met een meer dan minimum-toxiciteit. Uit de opname-curven blijkt dat er in de gekozen blootstellingstijd van 48 uur geen evenwicht optreedt maar dat eliminatie of omzetting van de chloorbenzenen sneller verloopt dan de opname. Dit proces is stofafhankelijk en vertoont een relatie met het aantal chlooratomen.

Uit de resultaten is niet eenduidig af te leiden welke kinetiek-processen plaatsvinden en door welke stof(fen) de toxiciteit wordt veroorzaakt. Aanbevolen wordt om hier nader onderzoek naar te verrichten.

In alle experimenten zijn de actuele blootstellings-concentraties van de chloorbenzenen bepaald. De teruggevonden percentages waren in de meeste gevallen hoog.

1. INLEIDING

Voor het afleiden van stofgerichte normen ter bescherming van waterbodems wordt momenteel gebruik gemaakt van de poriewaterhypothese. Deze poriewaterhypothese stelt dat de toxiciteit van in sediment aanwezige stoffen voor waterbodembewonende organismen veroorzaakt wordt door de in het poriewater opgeloste fractie. Diverse auteurs hebben aangetoond dat toxiciteit voor waterbodembewonende organismen beter correleert met concentraties in poriewater dan met concentraties in het totale sediment (o.a. Ziegenfuss et al., 1986, Giesy and Hoke, 1990). Ook voor de terrestrische bodem is een vergelijkbare correlatie aangetoond (Van Gestel and Ma, 1988, 1990). De relatie geldt echter niet voor zeer hydrofobe verbindingen.

In aanvulling op de poriewaterhypothese wordt de evenwichtspartitie-theorie gebruikt om biologische effecten te voorspellen van niet-ionogene organische stoffen in verschillende sedimenten. Deze theorie neemt aan dat de verdeling van een stof over organisch koolstof in sediment en poriewater in evenwicht is (Di Toro et al., 1991).

Met behulp van bovenstaande is het mogelijk effectconcentraties in een bepaald type sediment te vertalen naar effectconcentraties voor een ander type sediment. Er is echter nog een gebrek aan experimenteel bepaalde toxiciteitsgegevens voor waterbodemorganismen ten behoeve van het afleiden van sediment-kwaliteitsnormen. Een oplossing is gevonden in een vergelijkende studie van gevoeligheden. Gebleken is namelijk dat de gevoeligheid van (epi)benthische organismen niet wezenlijk verschilt van die van pelagische organismen (Di Toro et al., 1991). Op basis van deze informatie is het mogelijk om water-kwaliteitsnormen met behulp van de evenwichtspartitie-theorie te vertalen naar sediment-kwaliteitsnormen (Di Toro et al, 1991, Van Leeuwen et al., 1992).

Omdat bovengenoemde afleiding van sediment-kwaliteitsnormen zwaar rust op de gebruikte wetmatigheden als de poriewaterhypothese en de overeenkomst in gevoeligheid tussen (epi)benthische en pelagische organismen werd nader onderzoek naar de grenzen van de geldigheid voor deze wetmatigheden wenselijk geacht. Ter onderbouwing van de poriewaterhypothese werd een project geformuleerd naar de toxiciteit en opname/eliminatie-processen van enkele verbindingen voor de muggelarve *Chironomus riparius* en de oligochaet *Branchiura sowerbyi*. Onderliggend rapport beschrijft de eerste resultaten. Het doel van dit deel van het onderzoek was het vaststellen van de acute toxiciteit en lethal body burdens van enkele chloorbenzenen voor *C.riparius* in standaardwater. De lethal body burden-experimenten werden tevens uitgevoerd om informatie over de opname in water te verkrijgen.

2. MATERIAAL EN METHODEN

De volgende experimenten werden uitgevoerd in dit deel van het project:

Kortdurende toxiciteits-experimenten in standaardwater met *C. riparius* en:

- 1,4-dichloorbenzeen (DCB), opgelost met behulp van ultrasone trillingen (code 91/P029),
- 1,2,3-trichloorbenzeen (TCB), opgelost met behulp van een generatorkolom (code 91/P003),
- 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen (TeCB), opgelost met behulp van een generatorkolom (code 90/P062),
- 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen (TeCB), opgelost met behulp van DMSO (code 90/P045),
- pentachloorbenzeen (QCB), opgelost met behulp van een generatorkolom (code 91/P002),
- pentachloorbenzeen (QCB), opgelost met behulp van DMSO (code 90/P046).

"Lethal body burden"-experimenten in standaardwater met *C. riparius* en:

- 1,4-dichloorbenzeen, opgelost met behulp van ultrasone trillingen (code 91/P037),
- 1,2,3-trichloorbenzeen, opgelost met behulp van een generatorkolom (code 91/P005),
- 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen, opgelost met behulp van een generatorkolom (code 90/P065),
- 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen, opgelost met behulp van DMSO (code 90/P047),
- pentachloorbenzeen, opgelost met behulp van een generatorkolom (code 91/P013),
- pentachloorbenzeen, opgelost met behulp van DMSO en met drie larvale stadia (code 90/P055).

Bepaling van het lipidengehalte van *C. riparius* (code 91/P032 en 91/P048).

2.1 Teststoffen en verdunningen

De onderstaande tabel vermeldt de teststoffen evenals een aantal hulpchemicaliën. Als verdunningsmedium voor de testoplossingen werd Dutch Standard Water (DSW) gebruikt. DSW heeft een hardheid van 210 mg/l als CaCO₃ en een pH van 8,2 +/- 0,2. De samenstelling van DSW is weergegeven in Bijlage 1.

Van de teststoffen werden op verschillende wijzen stockoplossingen gemaakt in DSW:

- DCB werd in oplossing gebracht door middel van 3 uur ultrasoon trillen; oplossen van DCB met behulp van een generator-kolom leidde door vervluchtiging tot te veel verlies van DCB uit de stockoplossing,
- TCB, TeCB en QCB werden met behulp van een generator-kolom aan DSW toegevoegd,
- TeCB en QCB werden ten behoeve van een aantal experimenten toegevoegd via een geconcentreerde oplossing in DMSO waarna de stockoplossing nog 24 uur geroerd werd op een magneetroerder.

Het oplossen van de chloorbenzenen in DSW met behulp van een generator-kolom gebeurde als volgt. Een oplossing van de te testen verbinding in hexaan werd toegevoegd aan een hoeveelheid Chromosorb (Chromosorb G.AW, 60-80 mesh, cat.nr. 001012, Chrompack). Binding aan Chromosorb vond plaats door, onder regelmatig schudden van het Chromosorb/hexaan-mengsel, de hexaan met behulp van zuivere stikstof af te dampen. Het belaste Chromosorb werd vervolgens in een generator-kolom gebracht waarna het verdunningsmedium over het Chromosorb werd geleid en zodoende belast werd. Stockoplossingen gemaakt met behulp van een generator-kolom werden op actuele concentratie geanalyseerd alvorens de verdunningen werden gemaakt.

Al het benodigde glaswerk werd voor gebruik gespoeld met aceton om adsorptie aan de glaswand te voorkomen.

teststoffen	herkomst	zuiverheid
1,4 -dichloorbenzeen (DCB)	Merck nr.803226, charche 5217164	99%
1,2,3 -trichloorbenzeen (TCB)	BDH lot nr.25366000	p.a.
1,2,3,4 -tetrachloorbenzeen (TeCB)	Merck nr.821605, charche 5219594	98%
pentachloorbenzeen (QCB)	Merck nr.821560, charche 5218621	98%
hulpchemicaliën	herkomst	zuiverheid
dimethylsulfoxide, DMSO	Merck nr.2931	99,5%
hexaan t.b.v. monsterbewaring	Promochem nr.4159	99,9%
hexaan in chemische analyse	Baker 9262-03	Baker Resi-analyzed
natriumsulfaat, watervrij	Merck nr. 6649	p.a.
Florisil	- Merck nr.12994	zur Rückstand-analyse
zwavelzuur	Merck 731	p.a.
test-kit total lipids	Boehringer 124 303	
aceton, spoelvoeistof	Chemproha nr.166	

2.2 Testorganisme

De experimenten werden uitgevoerd met 3e stadium-larven van de dansmug *Chironomus riparius*. Deze mug wordt onder gecontroleerde condities gekweekt in het eigen laboratorium volgens een Standard Operating Procedure (SOP ECO, 1991). De larven werden opgekweekt in DSW bij een temperatuur van 23 +/- 2 °C en een lichtregime van 16 L en 8 D. De larven werden gevoerd met het commerciële visvoer Tetramin.

2.3 Testmethoden

Lipiden-bepaling

Om de bioconcentratiefactor (BCF) op basis van vetgewicht uit te kunnen drukken werd het lipidegehalte in een groep 3e stadium-larven bepaald in tweevoud. De bepaling van het lipidegehalte werd tevens uitgevoerd om een eventuele afname van het lipidegehalte in de larven tijdens de experimenten te kunnen vaststellen. Daartoe werden de larven op een vergelijkbare wijze behandeld als in de lethal body burden-experimenten. Op de tijdstippen $t = 0, 3, 6, 24$ en 48 uur werden larven in drievoud geanalyseerd. In Tabel 1 zijn de experimentele condities vermeld.

Toxiciteits-experimenten

Voor toxiciteits-experimenten met muggelarven bestaan nog geen internationale richtlijnen. De hier toegepaste testmethode is echter gebaseerd op EEG- en OESO-richtlijnen voor acute toxiciteitstesten met vissen en watervlooien. De experimentele condities en de toxicologische parameters zijn vermeld in Tabel 2. De parameter sterfte kon alleen na 48 uur worden vastgesteld omdat in gesloten toetsvaten (op eerdere tijdstippen) geen onderscheid gemaakt kan worden tussen sterfte en immobiliteit. In elk experiment werd het zuurstofgehalte en de pH gemeten aan het begin en aan het einde van de blootstellingstijd in aparte testvaten.

In elk experiment werd de actuele concentratie van de teststof bepaald in een duplo-monster aan het begin en aan het einde van de blootstellingstijd, van een lage en een hoge concentratie.

Voor alle experimenten werden de volgende kwaliteitscriteria in acht genomen:

- niet meer dan 10% sterfte in de controle-groepen aan het einde van het experiment,
- zuurstofconcentratie niet lager dan 6,0 mg/l,
- pH tussen 7,5 en 8,5.

De LC50- en EC50-waarden zijn bepaald met een gecomputeriseerde versie (Hoekstra, 1990) van de Spearman-Kärber methode (Hamilton et al., 1977). In die gevallen waar geen partiële sterfte optrad is een LC50 berekend als geometrisch gemiddelde van de concentraties waar 0% en 100% sterfte optrad. NOEC-waarden zijn afgeleid van de waargenomen concentratie-effect relaties.

Lethal body burden-experimenten

Op basis van de resultaten van de kortdurende toxiciteitsexperimenten werden twee concentraties gekozen voor blootstelling van de larven in lethal body burden-experimenten. De laagste en hoogste concentratie zijn zodanig gekozen dat 100% sterfte werd verwacht binnen 48, respectievelijk 24 uur. Hiermee werd de kans vergroot op het aantreffen van dode maar nog weinig ontbonden dieren.

De actuele concentraties van de testoplossingen en de gehalten in de larven werden in een duplo-monster bepaald na 0 (alleen testoplossingen), 3, 6, 24 en 48 uur blootstelling. Voor elk bemonsteringstijdstip werden twee testvaten met 20 of 25 3e stadium-larven ingezet. In

elk experiment werd het zuurstofgehalte en de pH gemeten aan het begin en aan het einde van de blootstellingstijd in aparte testvaten. De experimentele condities zijn vermeld in Tabel 3. Bij monsternamen, aan het einde van een blootstellingstijd, werd het percentage sterfte vastgesteld.

Per concentratie en per tijdstip werden uit deze experimenten tevens bioconcentratiefactoren (BCF) berekend als het quotient van het gehalte aan teststof in de larven C_l en de actuele concentratie in de testoplossing op het betreffende tijdstip C_w (C_l/C_w). De BCF en log BCF werden zowel op basis van natgewicht als van vetgewicht bepaald. De lethal body burden (LBB), ook wel interne lethale concentratie genoemd, werd afgeleid als meer dan 50% van de larven dood werd gevonden bij monsternamen. De LBB is uitgedrukt in $\mu\text{mol/g}$ natgewicht.

2.4 Bepaling van het lipidegehalte

Omdat met kleine hoeveelheden larven werd gewerkt is gebruik gemaakt van een lipidenbepaling volgens Boehringer, de zogenaamde Total Lipids Colorimetric method. Deze methode wordt in de medische wereld gebruikt voor de bepaling van "total-lipids" in serum en plasma. Het principe van deze bepaling berust op het reageren van lipiden met vanilline in zuur milieu (sulfofosfovanilline-reactie, bij 100 °C) waarbij het gevormde rose-gekleurde complex fotometrisch wordt bepaald.

De lipiden in het larven-monster werden in een Soxhlet-opstelling geëxtraheerd met hexaan zoals in de paragraaf "Chemische analyse van de chloorbenzenen" is beschreven. Het lipiden-gehalte in het hexaan-monster werd vervolgens bepaald met de testkit van Boehringer voor de bepaling van "total lipids". De spectrofotometer was van het type Pye Unicam PU 8600 UV/VIS. Er werd gemeten bij een golflengte van 530 nm, met 1 cm lichtweg en een temperatuur van 20-25 °C.

2.5 Chemische analyse van de chloorbenzenen

2.5.1 Principe

De hoeveelheid chloorbenzenen in testoplossingen en larvemonsters werd, al dan niet na een clean-up procedure, gedetecteerd op een gaschromatograaf/electron capture detector (GC/ECD). De analyse-resultaten van de testoplossingen werden gebruikt om actuele blootstellingsconcentraties te berekenen. Die van de larven werden gebruikt om inzicht te krijgen in de opname van de chloorbenzenen en voor het bepalen van LBB- en BCF-waarden.

2.5.2 Opwerken van de watermonsters

Aan 3 ml van een watermonster werd 3 ml hexaan toegevoegd. Het geheel werd gevortexd waarna, afhankelijk van de concentratie van de te analyseren verbinding, het hexaandeel

werd doorverdund met hexaan. Dit verdunnen was noodzakelijk om binnen de ijklijn op de GC/ECD te blijven. Aan 1 ml van de oplossing in hexaan werd 100 µl van een interne standaard (I.S.) toegevoegd. Als I.S. is hexachloorbenzeen (HCB) gebruikt.

De concentratie van de te analyseren verbinding werd vervolgens op de GC/ECD bepaald. Het injectievolume was 2 µl. Voordat de monsters werden gemeten op de GC/ECD, werd een ijklijn gemaakt van bekende concentraties van de betreffende chloorbenzeen.

2.5.3 Opwerken van de larvemonsters

Omdat de muggelarven een gering percentage lipiden bevatten, ca. 0,5%, is de absolute hoeveelheid chloorbenzeen in een larve gering. Bepaling van het gehalte chloorbenzeen in een enkele larve zou om twee redenen tot grote onzekerheid leiden in het resultaat. In de eerste plaats is dat vanwege de onnauwkeurigheid in het bepalen van het gewicht van de larve. In de tweede plaats is dat vanwege de niet-lineaire verhouding concentratie/respons bij bepaling van lage concentraties op de GC/ECD. Concentratie-bepalingen in larven werden daarom aan groepen van ca. 20-25 larven uitgevoerd.

Larven werden met ca. 1,5 gram waterdamp vrij natriumsulfaat overgebracht in extractiehulzen. Deze extractiehulzen werden vervolgens in een Soxlet-opstelling gebracht waarna het geheel met 18 ml hexaan gedurende 3 uur bij 70 °C werd geëxtraheerd. Na de extractie werden de hexaan-monsters, met daarin de te analyseren verbinding, overgebracht in een reageerbuis met behulp van een pasteurse pipet. De hexaan werd tot maximaal 1 ml ingedampt met zuivere stikstof. Voor de clean-up werd het hexaan-monster op een Florisil-kolom gebracht en geelueerd met behulp van 10 ml hexaan. De clean-up werd uitgevoerd om in de analyse storende lipiden en eiwitten te verwijderen. Afhankelijk van de concentratie van de te analyseren verbinding, werd de opgevangen hexaan ingedampt tot 1 ml eindvolume met zuivere stikstof. Aan dit eindvolume werd 100 µl I.S. toegevoegd waarna het monster op de GC/ECD werd geanalyseerd.

Bij elk experiment werd een blanco-monster muggelarven geanalyseerd en werd de recovery van de betreffende stof bepaald.

Florisil-kolom

Florisil werd, voordat het in de clean up-kolom werd gebracht, gedurende 3 uur gedroogd bij 120 °C. Nadat de Florisil in een exsiccator was afgekoeld, werd het kolom-materiaal gedeactiveerd met 10% gedemineraliseerd water. Het geheel werd goed gemengd, waarna het bruikbaar was voor de clean-up.

In de glazen clean up-kolom werd eerst een plukje kwartswol (vezeldikte 4-12 micron) gebracht en vervolgens 1 gram gedeactiveerd Florisil. Het geheel werd goed aangetrild waarna een mespunt waterdamp vrij natriumsulfaat op de Florisil werd gebracht om het aantrekken van vocht uit de lucht te voorkomen. De kolom werd gespoeld met 5 ml hexaan waarna het monster op de kolom werd gebracht.

Blanco-monsters

Blanco-monsters zijn larven-monsters die in de experimenten als controle-groep hebben gefungeerd en dus dezelfde experimentele condities hebben ondergaan als de concentratie-groepen, met uitzondering van de blootstelling. Deze monsters werden op dezelfde wijze opgewerkt en geanalyseerd als andere monsters om in een later stadium te kunnen corrigeren voor eventueel aanwezige achtergrondniveau's van chloorbenzenen.

Recovery-monsters

Recovery-monsters zijn monsters van onbelaste larven die, vóór de Soxlet-extractie, werden "gespiked" met een bekende hoeveelheid van de te testen verbinding. Deze monsters werden op dezelfde wijze opgewerkt en geanalyseerd als de andere monsters. Zodoende kan bepaald worden welke hoeveelheid van de stof verloren gaat tijdens het proces. De recovery is het percentage van de stof dat teruggevonden wordt bij de analyse. Alle analyse-resultaten werden gecorrigeerd met behulp van de recovery. Een aantal uitzonderingen hierop is aangegeven.

2.5.4 Detectie van de chloorbenzenen

De chloorbenzenen werden met een GC/ECD gedetecteerd. Specificaties van de GC/ECD zijn in Tabel 4 gegeven. Er werd met een 30 meter-kolom gewerkt evenals een 15 meter-kolom.

Voor de detectie van een verbinding werd gecontroleerd of de GC/ECD lineair was voor een betreffend concentratie-gebied. Dit werd gedaan door met behulp van een aantal ijkoplossingen een ijklijn op te stellen en de grootte van de regressiecoëfficiënt te controleren.

De reproduceerbaarheid van de detectie werd getoetst door elk monster in duplo te injecteren.

3. RESULTATEN

3.1 Lipiden-bepaling

De percentages lipiden van de larven-monsters zijn vermeld in de tabellen 5a en 5b voor beide experimenten. Uit de experimenten blijkt dat het lipidegehalte tijdens een blootstelling niet afneemt in de tijd. Het gemiddelde percentage lipiden in het eerste experiment was 0,53% met een standaarddeviatie van 0,08%. In het tweede experiment was dat 0,51% +/- 0,08%.

3.2 Toxiciteits-experimenten

Een overzicht van de actuele LC50-waarden van de toxiciteits-experimenten is gegeven in Tabel 6. In de bijlagen 2.1 tot en met 2.6 is een uitgebreider overzicht gegeven van de resultaten van de toxiciteits-experimenten.

In experimenten met QCB waarbij de stockoplossing werd gemaakt met behulp van de generatorkolom, werd niet voldoende sterfte waargenomen om een LC50 vast te kunnen stellen. Voor de overige stoffen konden wel LC50-waarden bepaald worden hoewel in een drietal experimenten geen partiële sterfte optrad. De sublethale effecten die werden waargenomen in de experimenten waren een trager bewegen en immobiliteit.

De controle- en achtergrondsterfte was maximaal 10% op één uitzondering na, namelijk 30% in het experiment met QCB waarin QCB is opgelost via de generator kolom. Achtergrondsterfte is die sterfte die optreedt in concentratie-groepen lager dan de veronderstelde LOLC. De zuurstofconcentraties waren goed. Ook hier geldt een uitzondering, het DCB-experiment gaf als laagste zuurstofwaarde 4,8 mg/l. Deze concentratie heeft echter geen nadelig effect op de muggenlarven. De pH-niveaus bleven ruim binnen de acceptabele waarden met een uitzondering van 7,4 als minimum in het DCB-experiment.

Uit de resultaten van de experimenten met TeCB en QCB valt niet duidelijk op te maken of de wijze van oplossen van de chloorbenzenen van invloed is op de toxiciteit. Statistische toetsing is met de gekozen proefopzet niet mogelijk.

Voor de LC50-waarden van de getoetste chloorbenzenen kan de volgende relatie met log Kow opgesteld worden. De LC50 van TeCB is hierbij de gemiddelde waarde uit het "DMSO-experiment" en het "generator kolom-experiment".

$$\log LC50 = - 1,12 * \log Kow - 0,30 \quad (LC50 \text{ in mol/l; } r^2 = 0,99)$$

Deze lijn is grafisch weergegeven in Figuur 1.

3.3 Lethal body burden-experimenten

Een overzicht van de LBB-waarden is gegeven in Tabel 7. BCF- en log BCF-waarden zijn

gegeven in Tabel 7 en in Tabel 9 voor respectievelijk waarden gebaseerd op nat- en op vetgewicht. De volledige resultaten van de experimenten zijn gegeven in de bijlagen 3.1 tot en met 3.6. De concentraties TCB in de larven zijn niet gecorrigeerd voor recovery omdat deze bepalingen geen betrouwbare resultaten opleverden.

De LBB-waarden namen toe met het aantal chlooratomen aan de benzeenring. De waarden varieerden van 0,14 $\mu\text{mol/g}$ voor DCB tot 1,24 $\mu\text{mol/g}$ voor TeCB. Voor QCB kon geen LBB worden vastgesteld met larven van begin 3e stadium. Dit was wel mogelijk met larven van het 2e of eind 3e stadium (Tabel 8). Deze LBB-waarden waren respectievelijk 1,74 en 1,03 $\mu\text{mol/g}$ natgewicht.

De BCF- en log BCF-waarden uit Tabel 7 en 9 zijn gemiddelde waarden over het tijdstraject waar evenwicht aangenomen kan worden tussen de concentratie in de testoplossing en die in de larven. De waarden zijn afgeleid uit de experimenten met de laagste concentratie. Voor DCB, TCB en TeCB kan evenwicht worden aangenomen vanaf 24 uur. Voor QCB is aangenomen dat op 48 uur evenwicht bestond.

Zowel voor TeCB als voor QCB blijkt oplossen via DMSO tot lagere BCF-waarden te leiden.

Voor de log BCF op basis van vetgewicht kan de volgende relatie tot log Kow worden opgesteld. Voor TeCB en QCB zijn hierbij alleen de "generator kolom-waarden" gebruikt. Figuur 2 geeft de relatie grafisch weer.

$$\log \text{BCF} = 1,84 * \log \text{Kow} - 3,99 \quad (\text{BCF in l/kg vetgewicht; } r^2 = 0,96)$$

Bijlage 3.7 geeft LBB- en BCF-waarden voor larven van drie verschillende leeftijden welke blootgesteld werden aan QCB, opgelost via DMSO. Een overzicht is gegeven in Tabel 8. De resultaten geven een indicatie dat QCB in het eind 3e larvale stadium minder accumuleert. De lethal body burden, 1,03 $\mu\text{mol/g}$, is eveneens lager dan de 1,74 $\mu\text{mol/g}$ van het 2e larvale stadium.

De pH was laag in de experimenten met DCB en QCB via de generator-kolom. In deze beide experimenten was het zuurstof-gehalte ook laag maar boven 2 mg/l, een niveau waarvan de muggelarven geen hinder ondervinden.

3.4 Chemische analyses

Tabel 10a geeft het verdwijnen van de stof uit de testoplossingen tijdens de toxiciteits-experimenten aan. De gemeten concentratie op $t = 48$ uur is hier uitgedrukt als percentage van de gemeten concentratie op $t = 0$ uur. De percentages variëren van 80% voor TeCB en QCB tot 99% voor DCB. Tabel 10b geeft de percentages welke vastgesteld zijn in de lethal body burden-experimenten. Het laagste percentage is hier 37% voor QCB. Uit een massabalans-berekening blijkt ruim de helft van de QCB via analyse teruggevonden te worden.

4. DISCUSSIE

4.1 Lipiden-bepaling

Een niet verwacht maar duidelijk resultaat is dat het lipiden-gehalte in de larven tijdens de blootstellingsduur van 48 uur niet afneemt. Uit niet gerapporteerde experimenten is namelijk gebleken dat de conditie van larven die gedurende 96 uur niet werden gevoerd verminderde.

Veel gebruikte methoden om het gehalte aan lipiden in een monster te bepalen zijn de Soxhlet-methode en de Bligh en Dyer-methode. Beide methoden bepalen het gehalte lipiden gravimetrisch. Omdat muggelarven een laag percentage lipide bezitten zijn voor de gravimetrische bepalingen monsters ter grootte van enkele grammen of wel duizenden larven nodig. De gevolgde methode van Boehringer kan volstaan met monsters ter grootte van 30-50 mg.

4.2 Toxiciteits-experimenten

In vrijwel alle experimenten konden LC50-waarden worden vastgesteld. Een uitzondering vormde QCB waarbij de stof via de generator-kolom in het water werd gebracht. Blijkbaar was het niet mogelijk om met de gevolgde methode het DSW voldoende hoog te belasten. Door QCB met behulp van DMSO in het water te brengen werd wel voldoende sterfte veroorzaakt. De experimenten met TeCB laten zien dat TeCB in het "DMSO-experiment" iets toxischer is. Het verschil ligt echter binnen de reproduceerbaarheid van dit type experimenten, namelijk binnen een factor 2-3.

Doordat het niet mogelijk is om de parameter sterfte op alle tijdstippen te scoren, kan het bereiken van de inception LC50 niet met zekerheid worden vastgesteld. De resultaten geven echter geen aanleiding om te veronderstellen dat het evenwichtsniveau van de verdeling van stof tussen organisme en medium niet is bereikt binnen 48 uur. Dit is in overeenstemming met wat Knezovich en Harrison (1988) vonden voor de opname van chloorbenzenen door *C.decorus*. De lethal body burden-experimenten laten de mogelijkheid open dat voor QCB nog geen evenwicht is bereikt op $t = 48$ uur.

Inmiddels zijn er vele QSARs voor toxiciteit door narcotisch werkende stoffen geformuleerd. Van Leeuwen et al. (1992) geeft een overzicht van QSARs voor verschillende soorten aquatische organismen. Figuur 3 toont de gevonden relatie voor *C. riparius* evenals relaties tussen $\log LC50$ of $\log EC50$ en $\log Kow$ voor de alg *Selenastrum capricornutum*, de watervlo *Daphnia magna* en de vis *Pimephales promelas*. De relatie voor de muggelarven is ten behoeve van de inzichtelijkheid tot in het lage Kow -gebied geëxtrapolleerd. Aanvullend onderzoek heeft inmiddels laten zien dat de gevonden QSAR voor het traject $0,15 < \log Kow < 5,2$ weinig verschilt van de hier gepresenteerde relatie (Roghair et al., in prep.). Uit Figuur 3 blijkt dat de toxiciteit van de getoetste chloorbenzenen niet afwijkt van die van de eerder genoemde organismen.

Op basis van deze resultaten lijkt het aannemelijk dat chloorbenzenen een narcotische werking bij *C. riparius* uitoefenen. Resultaten van de lethal body burden-experimenten laten

ook een andere mogelijkheid open.

4.3 Lethal body burden-experimenten

De LBB-waarden namen toe met het aantal chlooratomen aan de benzeenring en waren met name voor DCB en TCB lager dan die welke gevonden zijn voor de gup *Poecilia reticulata*. Voor guppen bleken LBB-waarden voor de narcotisch werkende chloorbenzenen te liggen in de range 2,0 tot 2,5 $\mu\text{mol/g}$ natgewicht (Van Hoogen en Opperhuizen, 1988). De waarde van de LBB is onafhankelijk van de specifieke verbinding (mits narcotisch werkend), de externe concentratie en de tijdsduur van blootstelling (Van Hoogen en Opperhuizen, 1988). Deze waarden lijken niet alleen voor vissen te gelden maar ook voor regenwormen. Belfroid et al. (1990) vonden waarden van 1,6 tot 3,2 $\mu\text{mol/g}$ voor *Eisenia andrei*, blootgesteld aan verschillende chloorbenzenen (Tabel 11).

Wanneer wordt aangenomen dat, gezien het werkingsmechanisme, de LBB-waarden voor narcotisch werkende stoffen gelijk zijn voor verschillende soorten, dan wijken de bevindingen met *C. riparius* af van de verwachting. De onderliggende gedachte van gelijke LBBs voor verschillende soorten is dat sterfte van een organisme volgt als de interne concentratie of lethal body burden een bepaalde waarde heeft bereikt. Doordat een specifiek werkingsmechanisme ontbreekt, zou deze waarde voor verschillende soorten organismen gelijk zijn. Stoffen die een specifieke werking kunnen hebben zullen in organismen met een daarvoor geschikte receptor een meer dan minimale toxiciteit veroorzaken en dus tot lagere LBB-waarden leiden dan de hierboven genoemde. De Bruijn (1991) heeft dit aangetoond voor twee organofosfor-pesticiden en guppen.

De bevindingen met *C. riparius* wijken om twee redenen af van de verwachting. In de eerste plaats blijken de LBB-waarden toe te nemen met toenemend aantal chlooratomen. In de tweede plaats liggen de waarden lager dan de verwachte 2,0-2,5 $\mu\text{mol/g}$. Dit geldt met name voor DCB, TCB en TeCB en in mindere mate voor QCB (Tabel 11). Een andere wijze voor het bepalen van de LBB is het vermenigvuldigen van de LC50 met de gemeten BCF (McCarty, 1986). Tabel 12 toont de op deze wijze bepaalde LBB-waarden. De overeenkomst tussen de resultaten van beide bepalingwijzen is goed hoewel TCB enigszins verschillende waarden te zien geeft. De hier gebruikte BCF-waarden, gemeten bij relatief hoge concentraties, zijn overigens beter om te gebruiken dan BCF-waarden bepaald bij sublethale concentraties vanwege eventuele concentratie-afhankelijke verschillen in BCF.

De lage LBB-waarden doen vermoeden dat chloorbenzenen een meer dan minimale toxiciteit voor *C. riparius* bezitten. Een kanttekening bij de vaststelling van de LBB-waarden is de volgende. Doordat de dode larven in de LBB-experimenten alleen op t= 24 en 48 uur zijn verzameld is het mogelijk dat sommige lijkjes al enige uren hebben gelegen. Niet bekend is of dit de concentratie in de larven doet veranderen. Theoretisch is te beredeneren dat de stof in evenwicht zal blijven tussen medium en larvenweefsel. De evenwichtsconcentratie uitgedrukt in mg stof/g larvenweefsel zal daardoor niet veranderen nadat de dood is ingetreden.

Een verklaring waarom chloorbenzenen, met name de lager gechloroerde chloorbenzenen,

een meer dan minimum-toxiciteit voor *C. riparius* bezitten kan zijn dat *C. riparius* in staat is de chloorbenzenen te metaboliseren tot chloorfenolen. Voor zebravissen (*Brachydanio rerio*) is aangetoond dat zij in staat zijn chloorbenzenen te transformeren naar onder andere 2-chloorfenol en 3- en/of 4-chloorfenol (Kasokat et al., 1989). De gevormde metabolieten bleven overigens beneden het 1%-niveau van de toegediende dosis. Dechlorering werd niet gevonden. Chloorfenolen bezitten vermoedelijk een meer dan minimum-toxiciteit. McCarty berekende een LBB van 0,55 $\mu\text{mol/g}$ (McCarty, 1986). Voor de goudvis vonden Kobayashi et al. (1979) lethale interne concentraties van 1 $\mu\text{mol/g}$.

Het verloop van de BCF-waarden in de tijd ondersteunt deze gedachte. De curven van de log BCF (Figuren 4 tot en met 7) stijgen aanvankelijk met de tijd maar vallen daarna terug tot lagere niveaus. Deze vorm is het sterkst bij DCB en wordt minder bij toenemend aantal chlooratomen. De "piek" in de curve treedt in de tijd het eerst op bij DCB en verschuift naar latere tijdstippen eveneens bij toenemend aantal chlooratomen. Deze curvevorm treedt op als een stof in eerste instantie alleen maar wordt opgenomen maar vervolgens ook wordt uitgescheiden of omgezet met een snelheid groter dan de opnamesnelheid. Van biotransformatie is te verwachten dat eerst enige tijd verstrijkt voordat dit proces op gang komt. Naarmate de chloorbezetting van de benzeenring toeneemt is te verwachten dat omzetting later of moeilijker verloopt. Voor deze omzetting zijn tenminste twee naast elkaar liggende, niet-gechloreerde C-atomen nodig. Dit betekent dat 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen nog wel maar pentachloorbenzeen niet meer omgezet kan worden. De experimentele resultaten zijn hiermee in overeenstemming. De vorming van de toxischer chloorfenolen zou kunnen verklaren waarom de "chloorbenzenen" tot een meer dan minimum-toxiciteit leiden.

Een verklaring voor de "pieken" in de Figuren 4 tot en met 7 had kunnen zijn dat het percentage lipiden in de larven daalt na verloop van tijd maar dit is weerlegt in de lipidenexperimenten. Het percentage lipiden bleef constant gedurende 48 uur.

Twee argumenten waarom omzetting tot toxischer chloorfenolen onwaarschijnlijk lijkt zijn de volgende. In de eerste plaats wijkt de gevonden QSAR niet af van de QSARs die voor enkele andere organismen gevonden zijn met narcotisch werkende stoffen. In de tweede plaats blijkt de "piek" in de opnamecurven ook bij hexachloorbenzeen-opname door de regenworm *E. andrei* voor te komen (Belfroid, pers comm.). Hydroxylering lijkt niet mogelijk bij een volledig gechloreerde benzeenring.

Geconcludeerd moet worden dat de resultaten uit deze studie perspectieven bieden op een mogelijke transformatie van chloorbenzenen door *C. riparius* met een meer dan minimum-toxiciteit als gevolg. Omdat deze verklaring niet eerder is gesteld en er tegensprekende argumenten zijn wordt een nader uitzoeken van de genoemde processen aanbevolen.

5. CONCLUSIES

De toxiciteitsexperimenten met 1,4-dichloorbenzeen, 1,2,3-trichloorbenzeen, 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen en pentachloorbenzeen hebben geleid tot een QSAR van goede kwaliteit:

$$\log LC50 = -1,12 * \log Kow - 0,30 \quad (LC50 \text{ in mol/l; } r^2 = 0,99)$$

Deze relatie verschilt weinig van QSARs die voor andere organismen met narcotisch werkende stoffen zijn gevonden.

De lethal body burden-experimenten geven anders dan verwacht op grond van onderzoek met vissen interne lethale concentraties die overeenkomen met stoffen met een meer dan minimum-toxiciteit. Uit opname-curven blijkt dat er in de blootstellingstijd van 48 uur geen evenwicht optreedt maar dat eliminatie of omzetting van de chloorbenzenen sneller verloopt dan de opname. Dit proces is stofafhankelijk en vertoont een relatie met het aantal chlooratomen.

6 REFERENCES

- Belfroid, A., W. Seinen and J. Hermens, 1990. Toxicity and lethal body burden of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*).
Poster presented at the 1st Setac Europe Conference, Sheffield, April, 1990.
- De Bruijn, J., F. Busser, W. Seinen and J. Hermens, 1989. Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the "slow-stirring" method.
Environ. Toxicol. Chem., **8**, 499-512.
- De Bruijn, J., E. Yedema, W. Seinen and J. Hermens, 1991. Lethal body burdens of four organophosphorous pesticides in the guppy (*Poecilia reticulata*).
Aquatic toxicology, **20**, 111-122.
- Di Toro, D.M., C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Swartz, C.E. Cowan, S.P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas, P.R. Paquin, 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning.
Environ. Toxicol. Chem., **10**, 1541-1583.
- Giesy, J.P. and R.A. Hoke, 1990. Freshwater sediment quality criteria: toxicity bioassessment.
In: R. Baudo, J.P. Giesy and H. Muntau (eds.). Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants. Lewis Publishers Inc., Ann Arbor, 265-348.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston, 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. **11**, 714-719. Correction **12**, 417 (1978).
- Hoekstra, 1990. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven.
- Kasokat, T., R. Nagel and K. Ulrich, 1989. Metabolism of chlorobenzene and hexachlorobenzene by the zebrafish, *Brachydanio rerio*.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., **42**, 254-261.
- Knezovich, J.P. and F.L. Harrison, 1988. The bioavailability of sediment-sorbed chlorobenzenes to larvae of the midge, *Chironomus decorus*.
Ecotoxicol. Environ. Saf., **15**, 226-241.
- Kobayashi, K., H. Akitake and K. Manabe, 1979. Relation between toxicity and accumulation of various chlorophenols in goldfish.
Bull. Jpn. Soc. Sc. Fish., **45**, 173-175.

- McCarty, L.S., 1986. The relationship between aquatic toxicity QSARs and bioconcentration for some organic chemicals.
Environ. Toxicol. Chem., **5**, 1071-1080.
- SOP ECO, 1991. Benodigdheden en werkwijze voor het kweken van *Chironomus riparius*.
SOP ECO/065/00 (20.09.91). Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven.
- Van Gestel, C.A.M. and Wei-chun Ma, 1988. Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability in soil.
Ecotoxicol. Environ. Saf., **15**, 289-297.
- Van Gestel, C.A.M. and Wei-chun Ma, 1990. An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies.
Chemosphere, **21**, 1023-1033.
- Van Hoogen G. and A. Opperhuizen, 1988. Toxicokinetics of chlorobenzenes in fish.
Environ. Toxicol. Chem., **7**, 213-219.
- Van Leeuwen, C.J., P.T.J. van der Zandt, T. Aldenberg, H.J.M. Verhaar en J.L.M. Hermens, 1992. Application of QSARs, extrapolation, and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants.
Environ. Toxicol. Chem., **11**, 267-282.
- Ziegenfuss, P.S., W.J. Renaudette and W.J. Adams, 1986. Methodology for assessing the acute toxicity of chemicals sorbed to sediments: testing the equilibrium partitioning theory.
In: T.M. Poston and R. Purdy (eds.), Aquatic toxicology and environmental fate: Vol. 9. ASTM STP 921. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 479-493.

Tabel 1: Experimentele condities ten behoeve van de lipiden-bepaling.

type experiment	lipiden-bepaling
experimentele duur	48 uur
type "blootstelling"	statisch
aantal concentraties	geen belasting
leeftijd larven	3e larvale stadium (11-14 dagen na uitkomen eieren)
gewicht aan larven	ca. 50 mg per groep
aantal groepen	voor elk bemonsteringstijdstip 3 groepen
testvolume/groep	ca. 115 ml
testvat	glazen flesje met ingeslepen stop
voedsel	geen
beluchting	geen
temperatuur	23 ± 2 °C, max. range per experiment 2 °C
belichting	16L 8D
bemonsteringstijdstippen	t= 0, 3, 6, 24 en 48 uur

Tabel 2: Experimentele condities en toxicologische parameters in de toxiciteitstoetsen.

type experiment	kortdurend toxiciteitsexperiment
blootstellingsduur	48 uur
type blootstelling	statisch
rede concentratiereeks	1,8
leeftijd larven	3e larvale stadium (11-14 dagen na uitkomen eieren)
aantal individuen/groep	1
aantal groepen/concentratie	10
testvolume/groep	ca. 21 ml (testvat maximaal gevuld)
testvat	gesloten scintillatieflesje
voedsel	geen
beluchting	geen
temperatuur	23 ± 2 °C, max. range per experiment 2 °C
belichting	16L 8D
toxicologische parameters	sterfte, immobiliteit, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

Tabel 3: Experimentele condities in de lethal body burden-experimenten.

type experiment	lethal body burden-experiment
blootstellingsduur	48 uur
type blootstelling	statisch
aantal concentraties	2
leeftijd larven	3e larvale stadium (11-14 dagen na uitkomen eieren)
aantal individuen/groep	20 of 25, afhankelijk van beschikbaarheid
aantal groepen/concentratie	voor elk bemonsteringstijdstip 2 groepen per concentratie
testvolume/groep	ca. 115 ml (testvat maximaal gevuld)
testvat	glazen flesje met ingeslepen stop
voedsel	geen
beluchting	geen
temperatuur	23 ± 2 °C, max. range per experiment 2 °C
belichting	16L 8D
bemonsteringstijdstippen uur	t= 0 (alleen concentratie van testoplossingen), 3, 6, 24 en 48

Tabel 4: Specificaties van de gaschromatograaf/electron capture detector.

type	Carlo Erba strumentazione; HRGC 5360 mega series
kolom	- WCOT-DB 5 (J & W Scientific) 30 meter * 0,258 mm capillair filmdikte 0,25 μm - WCOT-DB 5 (J & W Scientific) 15 meter * 0,32 mm capillair filmdikte 0,25 μm
detector	63-Ni Electron Capture Detector
integrator	Shimadzu C-R1A Chromatopac
temperatuur	injector: 225 °C kolom: afhankelijk van de te testen verbinding en de kolomlengte detector: 365 °C

Tabel 5a: Lipidengehalte van larven op verschillende tijdstippen; 1e experiment, code 91/P032. Het lipidengehalte is uitgedrukt als percentage van het natgewicht aan larven.

tijdstip	replica	natgewicht in mg	lipidengehalte in %	gemiddeld gehalte per tijdstip in %	standaard- deviatie
0 uur	A	52,0	0,59	0,62	0,12
	B	44,3	0,75		
	C	53,8	0,51		
3 uur	A	54,0	0,52	0,51	0,02
	B	53,8	0,52		
	C	53,1	0,49		
6 uur	A	50,5	0,44	0,47	0,08
	B	48,3	0,56		
	C	51,1	0,40		
24 uur	A	50,9	0,48	0,48	0,04
	B	53,6	0,44		
	C	48,4	0,52		
48 uur	A	46,2	0,59	0,56	0,03
	B	49,8	0,56		
	C	50,4	0,53		

Tabel 5b: Lipidengehalte van larven op verschillende tijdstippen; 2e experiment, code 91/P048. Het lipidengehalte is uitgedrukt als percentage van het natgewicht aan larven.

tijdstip	replica	natgewicht in mg	lipidengehalte in %	gemiddeld gehalte per tijdstip in %	standaard- deviatie
0 uur	A	38,5	0,47	0,51	0,03
	B	39,1	0,52		
	C	38,1	0,53		
3 uur	A	43,1	0,45	0,49	0,03
	B	44,4	0,50		
	C	38,9	0,51		
6 uur	A	43,9	0,48	0,51	0,06
	B	39,6	0,47		
	C	44,9	0,57		
24 uur	A	40,6	0,49	0,54	0,17
	B	43,8	0,39		
	C	40,6	0,73		
48 uur	A	37,6	0,58	0,53	0,06
	B	36,7	0,57		
	C	42,3	0,45		

Tabel 6: Actuele 48-uurs LC50-waarden voor diverse chloorbenzenen (in mg/l).

stof	stock-bereiding	LC50	95% betrouwbaarheids-interval
DCB	ultrasoon trillen	12	9,4 - 16 *)
TCB	generator kolom	1,7	1,4 - 2,1
TeCB	generator kolom	0,73	0,64 - 0,85
TeCB	DMSO	0,54	0,40 - 0,72 *)
QCB	generator kolom	n.v.	n.v.
QCB	DMSO	0,23	0,17 - 0,30 *)

*) Geen partitiele sterfte waargenomen; interval representeert 0% - 100% sterfte.
n.v. Niet vast te stellen uit het betreffende experiment.

Tabel 7: BCF (in l/kg natgewicht), log BCF en LBB (in $\mu\text{mol/g}$ natgewicht) voor diverse chloorbenzenen.

stof	stock-bereiding	BCF (% sterfte) a)	log BCF a)	LBB (% sterfte)
DCB	ultrasoon trillen	1,5 (5%)	0,19	0,14 (58%)
TCB	b) generator kolom	9,6 (2%)	0,98	0,35 (100%) 0,29 (100%) c)
TeCB	generator kolom	$3,9 * 10^2$ (4%)	2,59	1,24 (100%)
TeCB	DMSO	$2,5 * 10^2$ (2%)	2,39	0,72 (81%)
QCB	generator kolom	$1,6 * 10^3$ (2%)	3,20	----
QCB	DMSO	$1,3 * 10^3$ (2%)	3,10	----

- a) De BCF-waarden zijn bepaald uit de lage concentratie-groepen.
 b) De concentratie in de larven is niet gecorrigeerd voor de recovery.
 c) Een "uitschieter" in de analyse-resultaten is genegeerd.
 --- Onvoldoende sterfte.

Tabel 8: BCF (in l/kg natgewicht), log BCF en LBB (in $\mu\text{mol/g}$ natgewicht) voor QCB in diverse larvale stadia.

stof	larvaal stadium	BCF (% sterfte) a)	log BCF a)	LBB (% sterfte)
QCB	2e	$1,1 * 10^3$ (85%)	3,05	1,74 (85%)
QCB	begin 3e	$1,1 * 10^3$ (2%)	3,03	----
QCB	eind 3e	$6,0 * 10^2$ (83%)	2,77	1,03 (83%)

- a) De BCF-waarden zijn bepaald uit de hoge concentratie-groepen.
 --- Onvoldoende sterfte

Tabel 9: BCF (in l/kg vetgewicht) en log BCF voor diverse chloorbenzenen.

stof	stock-bereiding	BCF (% sterfte) a)	log BCF a)	log Kow b)
DCB	ultrasoon trillen	$3,0 * 10^2$ (5%)	2,47	3,444
TCB c)	generator kolom	$1,8 * 10^3$ (2%)	3,27	4,139
TeCB	generator kolom	$7,5 * 10^4$ (4%)	4,88	4,635
TeCB	DMSO	$4,8 * 10^4$ (2%)	4,68	4,635
QCB	generator kolom	$3,0 * 10^5$ (2%)	5,48	5,183
QCB	DMSO	$2,4 * 10^5$ (2%)	5,38	5,183

a) De BCF-waarden zijn bepaald uit de lage concentratie-groepen.

b) Ref.: De Bruijn et al. (1989)

c) De concentratie in de larven is niet gecorrigeerd voor de recovery.

Tabel 10a: Afname in actuele concentratie over een testperiode van 48 uur, als percentage van de actuele concentratie op t= 0 uur; toxiciteits-experimenten.

stof	stock-bereiding	actuele concentratie op t= 48 uur in %
DCB	ultrasoon trillen	98,6
TCB	generator kolom	93,0
TeCB	generator kolom	87,0
TeCB	DMSO	80,0
QCB	generator kolom	niet bepaald
QCB	DMSO	80,0

Tabel 10b: Afname in actuele concentratie over een testperiode van 48 uur, als percentage van de actuele concentratie op t= 0 uur; lethal body burden-experimenten.

stof	stock-bereiding	actuele concentratie op t= 48 uur in %
DCB	ultrasoon trillen	88,0
TCB	generator kolom	89,8
TeCB	generator kolom	78,1
TeCB	DMSO	71,4
QCB	generator kolom	54,5
QCB	DMSO	36,5

Tabel 11: Lethal body burden-waarden (LBB) van chloorbenzenen voor diverse organismen.

verbinding	organisme	LBB in $\mu\text{mol/g}$	referentie
1,4-DCB	<i>C. riparius</i>	0,14	dit rapport
1,2,3-TCB	guppy	2,02-2,71	a)
	earthworm	2,1	b)
	<i>C. riparius</i>	0,29	dit rapport
1,2,3,4-TeCB	guppy	2,31-2,64	a)
	earthworm	3,2	b)
	<i>C. riparius</i>	0,72-1,24	dit rapport
QCB	guppy	2,11-2,54	a)
	earthworm	1,6	b)
	<i>C. riparius</i>	1,03-1,74 c)	dit rapport

a) Van Hoogen en Opperhuizen (1988)

b) Belfroid et al. (1990)

c) Waarden voor 2e, respectievelijk eind 3e stadium-larven

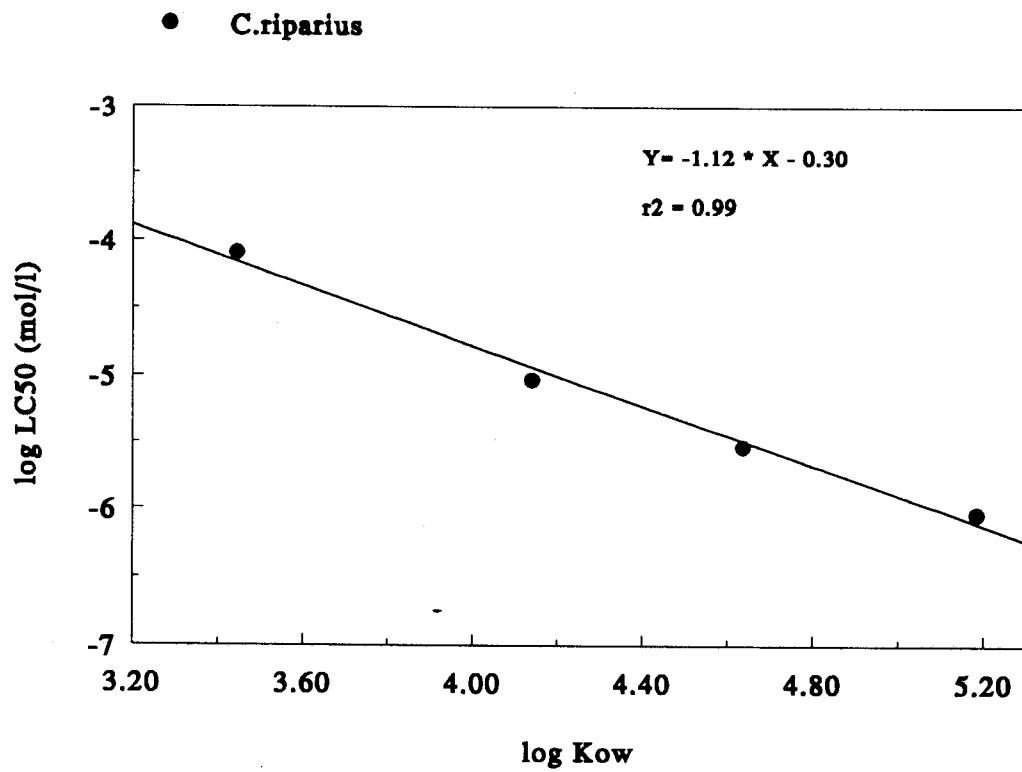
Tabel 12: Berekende lethal body burden-waarden (LBB) van chloorbenzenen voor *C. riparius*.

verbinding	LC50 mmol/l	BCF l/kg nat	LBB berekend $\mu\text{mol/g}$	LBB gemeten $\mu\text{mol/g}$
1,4-DCB	0,082	1,5	0,12	0,14
1,2,3-TCB	0,009	9,6	0,09	0,29
1,2,3,4-TeCB -generator	0,003	$3,9 * 10^2$	1,32	1,24
-DMSO	0,003	$2,5 * 10^2$	0,62	0,72
QCB -DMSO	0,001 a)	$1,3 * 10^3$ a)	1,15	1,74 b) 1,03 c)

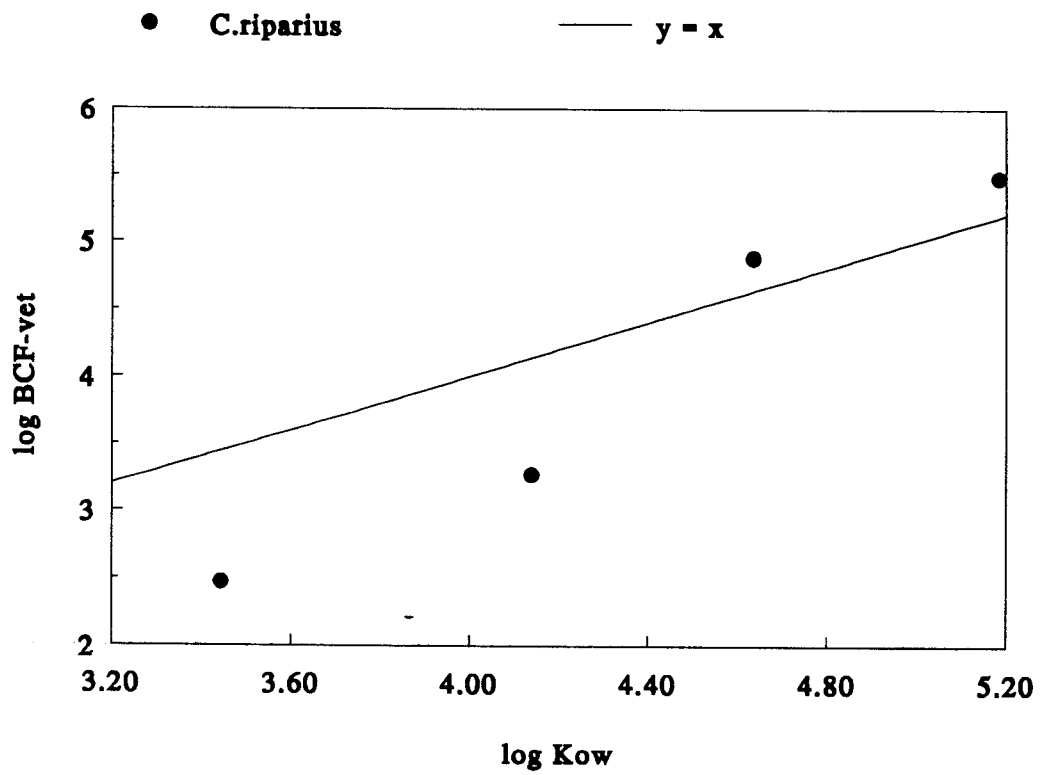
a) 3e stadium larve

b) 2e stadium larve

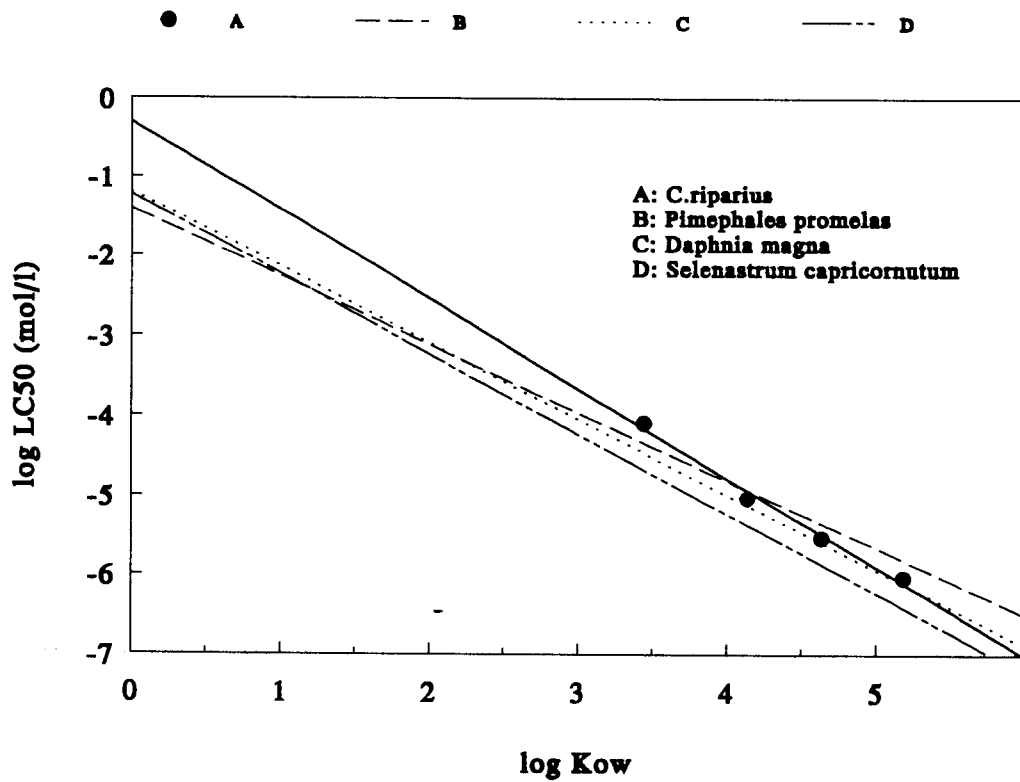
c) eind 3e stadium larve



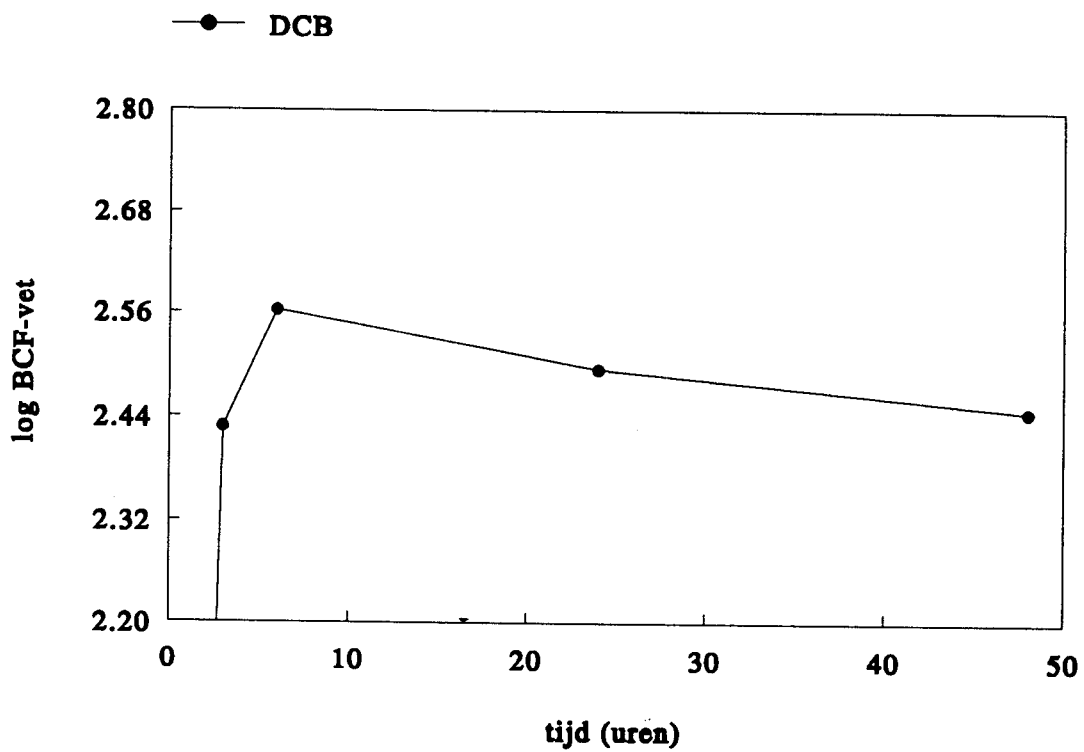
Figuur 1: Log LC50 (mol/l) van chloorbenzenen voor *C. riparius* als functie van log Kow.



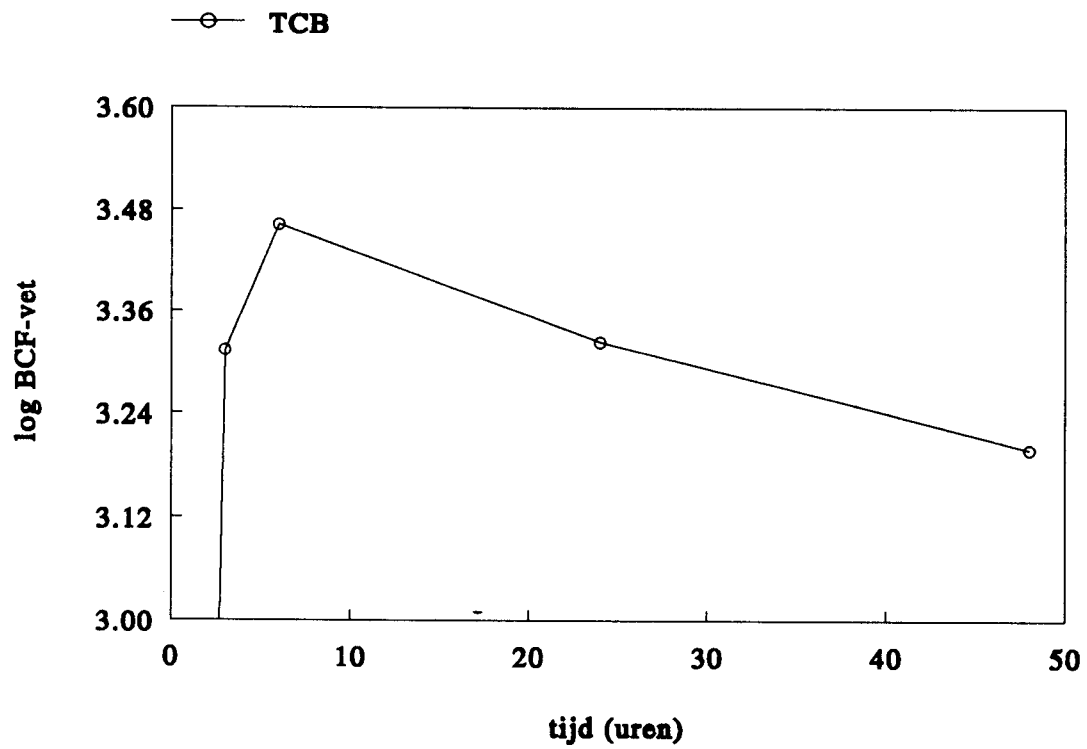
Figuur 2: Log BCF (l/kg vetgewicht) van chloorbenzenen voor *C. riparius* als functie van log K_{ow}. De getrokken lijn stelt de relatie $\log \text{BCF} = \log K_{ow}$ voor.



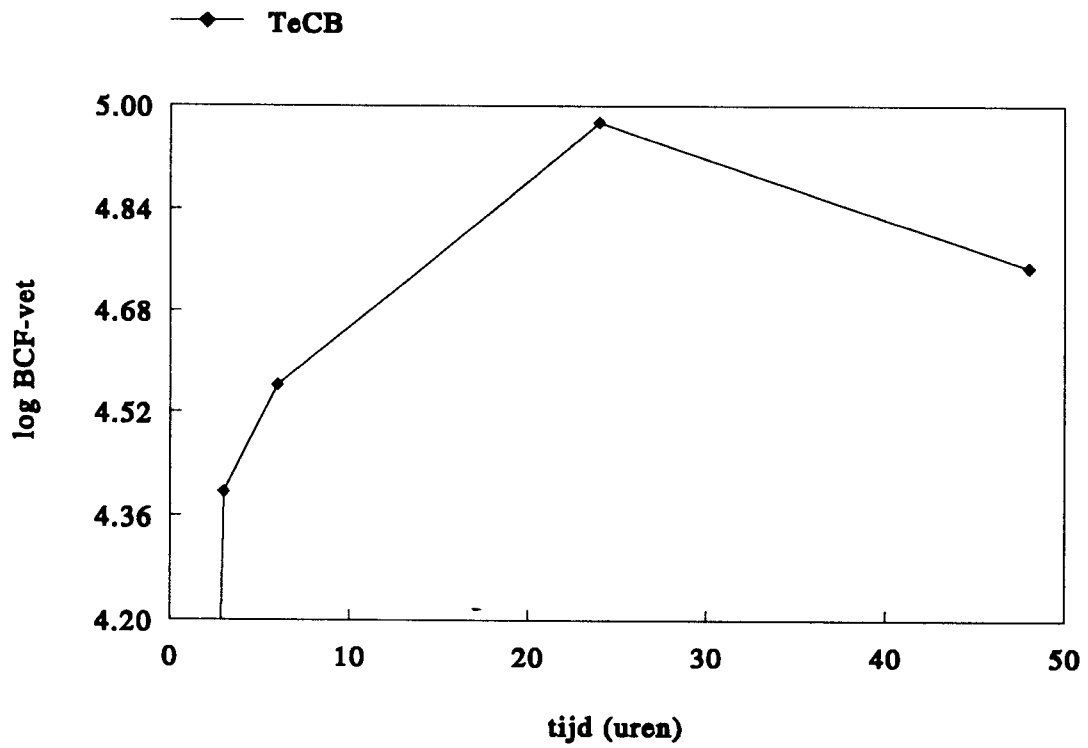
Figuur 3: Log LC50 (mol/l) van chloorbenzenen voor *C. riparius* als functie van log Kow in relatie tot QSARs van narcotisch werkende stoffen voor enkele andere aquatische organismen.



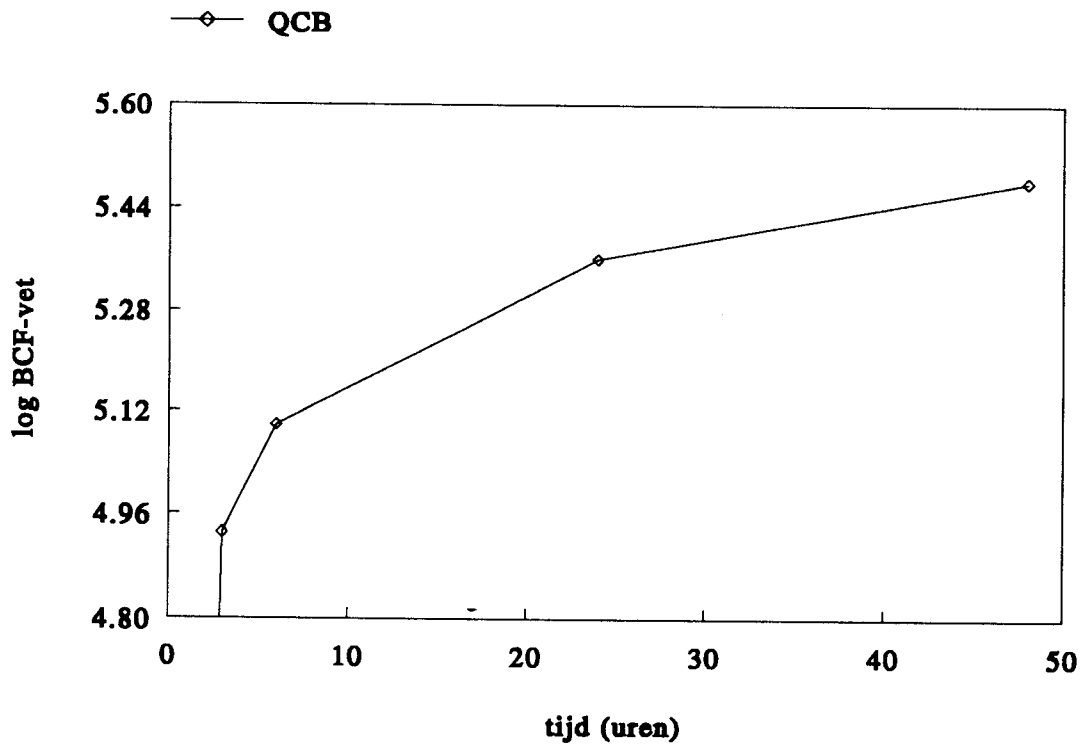
Figuur 4: Log BCF (l/kg vetgewicht) voor DCB als functie van de blootstellingstijd.



Figuur 5: Log BCF (l/kg vetgewicht) voor TCB als functie van de blootstellingstijd.



Figuur 6: Log BCF (l/kg vetgewicht) voor TeCB als functie van de blootstellingstijd.



Figuur 7: Log BCF (l/kg vetgewicht) voor QCB als functie van de blootstellingstijd.

Samenstelling van Dutch Standard Water (DSW):

- 54,5 mg/l Ca²⁺ 96,3 mg/l Cl⁻
- 17,8 mg/l Mg²⁺ 84,8 mg/l HCO₃⁻
- 27,4 mg/l Na⁺ 70,2 mg/l SO₄²⁻
- 7,8 mg/l K⁺

hardheid: 210 mg/l als CaCO₃

pH : 8,2 +/- 0,2

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,4 dichloorbenzeen, na toevoegen in oplossing gebracht d.m.v. ultrasoon trillen (in mg/l; actuele concentraties; code 91/P029)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC 3)	NOEC 4)
24 uur	---	2,9-5,2	0,94-1,7	---	0,94	
48 uur	9,4-16	---	---	1,4 (1,1-1,5)		0,94

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie (mg/l nom.)	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (2 en 24 uur)			% (sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag) op diverse tijdstippen		
	2 uur	24 uur	48 uur	2 uur	24 uur	48 uur
0,0	0	0	0	0	0	0
1,8	0	0	10	0	0	10
3,2	0	0	0	0	100	90
5,6	0	0	0	100	100	100
10	0	100	0	100	100	100
18	0	100	0	100	100	100
30	0	100	100	100	100	100

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0,0	8,18		7,42	7,49	8,4		4,9	5,5
18	---		7,35	7,36	---		4,8	5,1
30	8,18		---	---	8,1		---	---

--- = niet vastgesteld

De actuele concentratie is berekend als 52 % van de nominale concentratie.

BIJLAGE 2.2

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3-trichloorbenzeen toegevoegd via een generator kolom (in mg/l; actuele concentraties; code 91/P003)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC	NOEC
24 uur	---	1,1-1,9	0,34-0,59	---	0,34	---
48 uur	1,7 (1,4-2,1)	---	---	0,34-0,59	---	0,34

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie mg/l gewenst	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (4 en 24 uur)			% (sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag) op diverse tijdstippen		
	4 uur	24 uur	48 uur	4 uur	24 uur	48 uur
0,0	0	0	0	0	0	0
0,18	0	0	0	0	0	10
0,32	0	0	0	0	0	10
0,56	0	0	10	0	100	100
1,0	0	0	0	100	100	100
1,8	100	100	70	100	100	100
3,2	100	100	100	100	100	100

concentratie mg/l gewenst	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0,0	8,31		7,94	7,96	8,7		8,0	8,0
1,8	8,32		7,87	7,94	8,6		7,8	7,9

De actuele concentratie is berekend als 106 % van de gewenste waarde.

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen toegevoegd via een generator kolom (in mg/l; actuele concentraties; code 90/P062)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC 3)	NOEC 4
24 uur	---	0,41 (0,33-0,48)	0,19-0,35	---	0,11	---
48 uur	0,73 (0,64-0,85)	---	---	0,19-0,35	---	0,11

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie mg/l gewenst	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (4 en 24 uur)			% {sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag} op diverse tijdstippen		
	4 uur	24 uur	48 uur	4 uur	24 uur	48 uur
0,0	0	0	0	0	0	40
0,056	0	10	0	0	20	30
0,10	0	0	0	0	20	30
0,18	20	30	0	100	100	100
0,32	80	100	20	100	100	100
0,56	100	100	100	100	100	100
1,0	100	100	100	100	100	100

concentratie mg/l gewenst	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0,0	8,31		7,89	7,99	8,3		7,6	7,9
1,0	8,28		7,82	7,95	8,2		7,2	8,0

De actuele concentratie is berekend als 193 % van de gewenste concentratie.

BIJLAGE 2.4

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen toegevoegd via DMSO (in mg/l; actuele concentraties; code 90/P045)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC 3)	NOEC 4)
24 uur	---	0,40-0,72	0,23-0,40	---	0,23	---
48 uur	0,40-0,72	---	---	0,23-0,40	---	0,23

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie (mg/l nom.)	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (2 en 24 uur)			% (sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag) op diverse tijdstippen		
	2 uur	24 uur	48 uur	2 uur	24 uur	48 uur
controle DSW	0	0	0	0	0	0
0,0	0	0	0	0	0	0
0,10	0	0	0	0	0	0
0,18	0	0	0	0	0	0
0,32	0	0	0	0	0	0
0,56	0	0	0	0	100	100
1,0	0	100	100	0	100	100
1,8	0	100	100	0	100	100

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,29		----	----	9,1		---	---
0,56	8,18		7,92	7,92	8,7		8,2	8,3
1,8	8,16		7,79	7,84	8,4		7,9	8,1

--- = niet vastgesteld

De actuele concentratie is berekend als 72 % van de nominale concentratie.

BIJLAGE 2.5

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan pentachloorbenzeen toegevoegd via een generatorkolom (in mg/l; nominale concentraties; code 91/P002)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC 3)	NOEC 4)
24 uur	---	---	---	---	---	---
48 uur	> 0,32	---	---	---	---	≥ 0,18

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie (mg/l nom.)	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (4 en 24 uur)			% (sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag) op diverse tijdstippen		
	4 uur	24 uur	48 uur	4 uur	24 uur	48 uur
0,0	0	0	10	0	30	0
0,032	0	0	0	0	50	30
0,056	0	0	10	0	20	20
0,10	0	0	30	0	40	10
0,18	0	0	0	0	40	20
0,32	0	0	0	0	90	40

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0,0	8,23		----	----	8,1		----	----
0,32	8,11		----	----	8,1		----	----

--- = niet vastgesteld

De nominale concentratie werd afgeleid van een (op t = 0 - 2 uur) vastgestelde concentratie in de stock van 0,33 mg/l.

BIJLAGE 2.6

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxiciteits-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan pentachloorbenzeen toegevoegd via DMSO (in mg/l; actuele concentraties; code 90/P046)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	EC50 3)	EC50 4)	NOEC 3)	NOEC 4)
24 uur	---	0,17-0,30	0,097-0,17	---	0,097	---
48 uur	0,17-0,30	---	---	0,097-0,17	---	0,097

- 1) L = mortaliteit
 2) E = immobiliteit
 3) E = immobiliteit + afwijkend gedrag
 4) E = mortaliteit + immobiliteit + afwijkend gedrag
 --- = niet bepaald

concentratie (mg/l nom.)	% sterfte (48 uur) of immobiliteit (2 en 24 uur)			% (sterfte, immobiliteit + afwijkend gedrag) op diverse tijdstippen		
	2 uur	24 uur	48 uur	2 uur	24 uur	48 uur
controle DSW	0	0	0	0	0	0
0,0	0	0	0	0	0	0
0,10	0	0	10	0	0	10
0,18	0	0	0	0	0	0
0,32	0	0	0	0	100	100
0,56	0	100	100	0	100	100
1,0	0	100	100	0	100	100
1,8	0	100	100	0	100	100

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,29	---	---	---	9,1	---	---	---
0,32	8,17	7,85	7,86	7,86	8,6	8,2	8,2	8,2
1,8	8,18	7,76	7,83	7,83	8,5	8,0	8,1	8,1

--- = niet vastgesteld

De actuele concentratie is berekend als 54 % van de nominale concentratie.

BIJLAGE 3.1

Overzicht van de resultaten van een kortdurende toxicokinetiekttoets met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,4-dichloorbenzeen, na toevoegen in oplossing gebracht d.m.v. ultrasoon trillen (code 91/P037)

scorings- tijdstop	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte
6 uur	0,28	---	9,8	15	0
	v	v	22,2	30	0
24 uur	0,21	---	9,5	15	0
	0,12	---	19,9	30	3
48 uur	0,15	---	9,6	15	10
	0,01	20,3	20,1	30	58

- 1) = interne lethale concentratie (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (63,41 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = nominale concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 v = niet bepaald
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie (mg/l nom.)	scorings- tijdstop	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect	
15	0 uur A	10,8	---						
	B	10,4	---						
	3 uur A	10,0	10,1	1,01	0,01	0	100	0	
	B	10,1	17,9	1,78	0,25	0	100	0	
	6 uur A	9,9	20,2	2,05	0,31	0	100	0	
	B	9,8	17,1	1,75	0,24	0	100	0	
	24 uur A	9,7	14,9	1,54	0,19	0	100	0	
	B	9,3	15,9	1,71	0,23	0	100	0	
	48 uur A	9,4	17,1	1,82	0,26	20	80	0	
	B	9,9	10,8	1,09	0,04	0	100	0	
	30	0 uur A	24,2	---					
		B	22,5	---					
3 uur A		22,1	21,0	0,95	-0,02	0	100	0	
B		22,5	27,6	1,23	0,09	0	100	0	
6 uur A		22,5	---			0	100	0	
B		21,9	---			0	100	0	
24 uur A		19,5	---			5	95	0	
B		20,4	27,1	1,33	0,12	0	100	0	
48 uur A		19,5	28,1	1,44	0,16	60	40	0	
B		20,8	14,6	0,70	-0,15	55	45	0	

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (63,41 %)
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: immobiliteit en stilliggend met af en toe beweging

bijlage 3.1

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0	8,25		7,21	7,23	8,8		2,8	3,1
15	8,25		7,44	7,45	8,8		5,5	5,6
30	8,24		7,41	7,45	8,7		4,8	4,9

BIJLAGE 3.2

Overzicht van de resultaten van een kortdurende toxicokinetiekttoets met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3-trichloorbenzeen toegevoegd via een generator-kolom (code 91/P005)

scorings-tijdstip	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte *
6 uur	1,18	---	1,6	1,3	0
	1,20	---	3,5	3,2	0
24 uur	1,04	---	1,6	1,3	2
	1,41	85,7	3,4	3,2	100
48 uur	0,91	---	1,5	1,3	2
	1,14	46,0	3,3	3,2	100

- 1) = interne lethale concentratie in ng/mg natgewicht; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = gewenste concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie mg/l gewenst	scorings- tijdstip	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect	
1,3	0 uur A	1,7	---						
	B	1,8	---						
	3 uur A	1,6	---			0	100	0	
	B	1,6	17,2	10,7	1,03	0	100	0	
	6 uur A	1,6	24,7	15,0	1,18	0	100	0	
	B	1,6	24,7	15,2	1,18	0	100	0	
	24 uur A	1,6	17,3	10,7	1,03	0	100	0	
	B	1,6	17,6	11,2	1,05	4	96	0	
	48 uur A	1,5	13,7	9,19	0,96	0	100	0	
	B	1,5	10,7	7,28	0,86	4	96	0	
	3,2	0 uur A	3,5	---					
		B	3,6	---					
3 uur A		3,4	40,6	11,8	1,07	0	100	0	
B		3,9	47,0	12,1	1,08	0	100	0	
6 uur A		3,4	61,0	17,9	1,25	0	100	0	
B		3,7	53,5	14,3	1,16	0	100	0	
24 uur A		3,5	68,6	19,8	1,30	100	0	0	
B		3,3	107	32,1	1,51	100	0	0	
48 uur A		3,3	45,9	14,0	1,15	100	0	0	
B		3,4	46,1	13,7	1,14	100	0	0	

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve in ng/mg natgewicht; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethaal effect: immobiliteit

bijlage 3.2

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,28		7,51	7,56	8,4		6,4	6,6
1,3	8,30		7,75	7,80	8,6		7,1	7,1
3,2	8,30		7,63	7,69	8,4		6,8	6,9

BIJLAGE 3.3

Overzicht van de resultaten van een kortdurende toxicokinetiekttoets met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen toegevoegd via een generator-kolom (code 90/P065)

scorings- tijdstep	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte *
6 uur	2,28	---	0,47	0,42	0
	2,09	---	1,2	1,0	0
24 uur	2,69	---	0,42	0,42	8
	2,48	328	1,1	1,0	60
48 uur	2,48	---	0,40	0,42	0
	2,42	268	1,0	1,0	100

- 1) = interne lethale concentratie (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (84,16 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = gewenste concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie mg/l gewenst	scorings- tijdstep	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect	
0,42	0 uur	A	0,3						
		B	0,3						
	3 uur	A	55,2	113	2,05	0	100	0	
		B	67,2	146	2,17	0	100	0	
	6 uur	A	90,5	197	2,29	0	100	0	
		B	88,4	183	2,26	0	100	0	
	24 uur	A	202	478	2,68	8	92	0	
		B	211	502	2,70	8	92	0	
	48 uur	A	98,6	246	2,39	0	100	0	
		B	136	337	2,57	0	100	0	
	1,0	0 uur	A	0,3					
			B	0,3					
3 uur		A	78,2	63,7	1,80	0	100	0	
		B	77,6	60,1	1,78	0	100	0	
6 uur		A	131	109	2,04	0	100	0	
		B	159	137	2,14	0	100	0	
24 uur		A	367	341	2,53	68	32	0	
		B	293	266	2,42	52	48	0	
48 uur		A	232	221	2,36	100	0	0	
		B	309	297	2,47	100	0	0	

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (84,16 %)
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: immobiliteit, alleen bewegend na stimulatie en traag bewegend

bijlage 3.3

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,12		7,69	7,75	8,7		7,8	7,9
0,42	8,09		7,67	7,71	8,5		7,9	8,0
1,0	8,07		7,55	7,61	8,4		7,8	7,8

--- = niet vastgesteld

N.B. de pH-waarden werden gecorrigeerd met 0,4 eenheden zijnde de na beëindigen van het experiment geconstateerde afwijking (naar boven) in de meetwaarden van de pH-meter

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxicokinetiek-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan 1,2,3,4-tetrachloorbenzeen toegevoegd via DMSO (code 90/P047)

scorings- tijdstip	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte *
6 uur	1,72	---	0,50	0,75	0
	1,51	---	0,76	1,0	0
24 uur	2,37	---	0,44	0,75	1
	2,35	---	0,67	1,0	14
48 uur	2,39	---	0,39	0,75	3
	2,42	155	0,59	1,0	81

- 1) = interne lethale concentratie (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (84,16 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = nominale concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie (mg/l nom.)	scorings- tijdstip	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect	
0,75	0 uur	A	0,53	---					
		B	0,53	---					
	3 uur	A	0,50	0,7	1,4	0,14	0	0	100
		B	0,52	20,0	38,2	1,58	0	0	100
	6 uur	A	0,52	30,1	57,4	1,76	0	100	0
		B	0,48	22,6	47,1	1,67	0	100	0
	24 uur	A	0,45	114	252	2,40	2	98	0
		B	0,44	97,4	223	2,35	0	100	0
	48 uur	A	0,40	73,4	186	2,27	2	98	0
		B	0,39	129	328	2,52	4	96	0
1,0	0 uur	A	0,79	---					
		B	0,78	---					
	3 uur	A	0,71	21,1	29,6	1,47	0	100	0
		B	0,73	27,2	37,2	1,57	0	100	0
	6 uur	A	0,77	---			0	100	0
		B	0,76	24,7	32,4	1,51	0	100	0
	24 uur	A	0,67	171	253	2,40	18	82	0
		B	0,67	137	205	2,31	10	90	0
	48 uur	A	0,59	194	330	2,52	82	18	0
		B	---	124	211	2,32	80	20	0

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (84,16 %)
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: immobiliteit, alleen bewegend na stimulatie en

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,16	---	---	---	8,8	---	---	---
0,75	8,09	7,89	7,97		8,7	8,0	8,1	
1,0	8,11	7,92	7,93		8,6	7,9	8,1	

--- = niet vastgesteld

BIJLAGE 3.5

Overzicht van de resultaten van een kortdurende toxicokinetiekttoets met *Chironomus riparius* blootgesteld aan pentachloorbenzeen toegevoegd via een generator-kolom (code 91/P013)

scorings-tijdstip	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte *
6 uur	2,82	---	0,06	0,15	0
	2,79	---	0,11	0,30	0
24 uur	3,07	---	0,05	0,15	0
	3,17	---	0,07	0,30	0
48 uur	3,20	---	0,04	0,15	2
	3,11	---	0,10	0,30	0

- 1) = interne lethale concentratie in ng/mg natgewicht; gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = gewenste concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie mg/l gewenst	scorings- tijdstip	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect
0,15	0 uur A	0,09	---					
	B	0,08	---					
	3 uur A	0,07	29,5	420	2,62	0	0	100
	B	0,07	33,4	468	2,67	0	0	100
	6 uur A	0,06	45,1	702	2,85	0	0	100
	B	0,06	39,1	604	2,78	0	0	100
	24 uur A	0,05	67,2	1330	3,12	0	0	100
	B	0,05	53,6	1059	3,02	0	0	100
	48 uur A	0,05	76,7	1656	3,22	4	0	96
	B	0,04	64,7	1493	3,17	0	0	100
0,30	0 uur A	0,18	---					
	B	0,16	---					
	3 uur A	0,14	45,9	337	2,53	0	0	100
	B	0,14	44,9	331	2,52	0	0	100
	6 uur A	0,11	69,5	614	2,79	0	0	100
	B	0,12	70,5	605	2,78	0	0	100
	24 uur A	0,07	108	1506	3,18	0	100	0
	B	0,07	103	1408	3,15	0	100	0
	48 uur A	0,10	136	1322	3,12	0	100	0
	B	0,10	122	1254	3,10	0	100	0

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: trager bewegend dan in controle

bijlage 3.5

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
0,0	8,15		7,07	7,17	9,2		4,4	4,7
0,15	7,97	7,99	7,24	7,27	9,5	9,6	4,6	4,7
0,30	7,85		7,30	7,34	8,5		5,5	5,8

De 0 uur-waarden van 0,15 en 0,30 mg/l werden vastgesteld op t = 3 uur

BIJLAGE 3.6

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxicokinetiek-experiment met *Chironomus riparius* blootgesteld aan pentachloorbenzeen toegevoegd via DMSO (code 90/P055)

scorings-tijdstip	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	Cw 3)	% sterfte *
6 uur	2,60	---	0,47	1,0	0
	2,27	---	0,81	1,8	0
24 uur	2,74	---	0,41	1,0	0
	2,83	---	0,55	1,8	4
48 uur	3,10	---	0,35	1,0	2
	3,03	---	0,46	1,8	2

- 1) = interne lethale concentratie in ng/mg natgewicht; gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 3) = nominale concentratie in het water in mg/l
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

concentratie (mg/l nom.)	scorings-tijdstip	Cw 1)	C1 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub-lethale effecten	% zonder effect	
1,0	0 uur A	0,84	---						
	B	---	---						
	3 uur A	0,51	88,6	175	2,24	0	0	100	
	B	0,49	98,5	199	2,30	0	0	100	
	6 uur A	0,47	234	501	2,70	0	100	0	
	B	0,48	147	306	2,49	0	100	0	
	24 uur A	0,42	267	641	2,81	0	100	0	
	B	0,41	192	471	2,67	0	100	0	
	48 uur A	0,34	443	1302	3,11	0	100	0	
	B	0,37	443	1202	3,08	4	96	0	
	1,8	0 uur A	1,57	---					
		B	1,47	---					
3 uur A		0,84	110	131	2,12	0	100	0	
B		0,85	130	153	2,18	0	100	0	
6 uur A		0,82	145	177	2,25	0	100	0	
B		0,80	155	193	2,29	0	100	0	
24 uur A		0,54	402	748	2,87	8	92	0	
B		0,56	346	619	2,79	0	100	0	
48 uur A		0,45	521	1147	3,06	4	96	0	
B		0,48	471	974	2,99	0	100	0	

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 3) = C1/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: immobiliteit, stilliggend met af en toe beweging en trager bewegend dan bij inzetten

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,30		---	---	9,1		---	---
1,0	8,18		7,81	7,89	8,7		7,8	8,0
1,8	8,05		7,79	7,82	8,7		7,7	7,9

--- = niet vastgesteld

BIJLAGE 3.7

Overzicht van de resultaten van een kortdurend toxicokinetiek-experiment met verschillende larvale stadia van *Chironomus riparius* blootgesteld aan pentachloorbenzeen toegevoegd via DMSO (nominale concentratie 1,8 mg/l; code 90/P055)

scorings-tijdstip	log * BCF	ILC ** 1)	Cw ** 2)	% * sterfte
48 uur k	3,05	437	0,39	85
n	3,03	---	0,46	2
g	2,77	258	0,44	83

- 1) = interne lethale concentratie (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 2) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 k = larven 2° larvale stadium
 n = larven begin 3° larvale stadium
 g = larven eind 3° larvale stadium
 --- = niet te bepalen door geen of onvoldoende sterfte
 * = gemiddelde waarde
 ** = geometrisch gemiddelde waarde

scorings-tijdstip	Cw 1)	Cl 2)	BCF 3)	log BCF	% sterfte	% sub- lethale effecten	% zonder effect
0 uur A	1,57	---					
B	1,47	---					
24 uur k A	0,54	385	717	2,86	4	96	0
B	0,47	363	771	2,89	0	100	0
48 uur k A	0,39	517	1310	3,12	70	30	0
B	0,39	370	953	2,98	100	0	0
24 uur n A	0,54	402	748	2,87	8	92	0
B	0,56	346	619	2,79	0	100	0
48 uur n A	0,45	521	1147	3,06	4	96	0
B	0,48	471	974	2,99	0	100	0
24 uur g A	0,44	157	355	2,55	0	100	0
B	0,45	188	417	2,62	7	93	0
48 uur g A	0,50	275	544	2,74	86	14	0
B	0,38	242	635	2,80	79	21	0

- 1) = actuele concentratie in het water in mg/l; niet gecorrigeerd voor recovery
 2) = concentratie in de larve (ng/mg natgewicht); gecorrigeerd voor recovery (88,05 +/- 1,66 %)
 3) = Cl/Cw; in l/kg op basis van natgewicht
 k = larven 2° larvale stadium
 n = larven begin 3° larvale stadium
 g = larven eind 3° larvale stadium
 --- = niet vastgesteld

waargenomen sublethale effecten: immobiliteit, stilliggend met af en toe beweging en trager bewegend dan bij inzetten

concentratie (mg/l nom.)	pH				zuurstofgehalte in mg/l			
	0 uur		48 uur		0 uur		48 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max
controle DSW	8,30	---	---	---	9,1	---	---	---
1,8 k	8,05	7,76	7,82		8,7	8,1	8,2	
n	8,05	7,79	7,82		8,7	7,7	7,9	
g	8,05	7,81	7,85		8,7	8,0	8,0	

k = larven 2* larvale stadium
 n = larven begin 3* larvale stadium
 g = larven eind 3* larvale stadium
 --- = niet vastgesteld