

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 719102 012

Ontwikkeling van sedimenttoxiciteits-toetsen;
II: De chronische toxiciteit van sediment gecontamineerd met chloorpyrifos voor *Daphnia magna*

C.J. Roghair, M.A.H. Wolters en M.P.A. Huijs

januari 1993

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Directoraat-Generaal voor Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling en Directie Bodem, ten behoeve van het Speerpuntprogramma Bodemonderzoek onder project nr. 719102, ECO-effecten.

VERZENDLIJST

1 - 4	Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen, Veiligheid en Straling
5 - 8	Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Bodem
9	Directeur-Generaal Milieubeheer, ir. M.E.E. Enthoven
10	Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, dr.ir. B.C.J. Zoeteman
11	Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, mr. G.J.R. Wolters
12 - 13	Directeur PCBB
14	Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
15 - 16	Drs. C. van de Guchte, RIZA, Lelystad
17 - 18	Mw. drs. R.N. Hooftman, IMW-TNO, Delft
19	Dr. P. Leeuwangh, Staringcentrum, Wageningen
20	Prof.dr. W.C. Turkenburg, Vakgroep NWS, RUU, Utrecht
21	Directie RIVM
22	Sectordirecteur Stoffen en Risico's, dr.ir. G. de Mik
23	Adviescentrum Toxicologie, t.a.v. mw. drs. A.G.A.C. Knaap
24 - 28	Laboratorium voor Ecotoxicologie, t.a.v. prof.dr. H.A.M. de Kruijf
29 - 31	Auteurs
32	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
33	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
34 - 35	Bibliotheek RIVM
36	Bibliotheek RIVM, depot ECO/LWD
37	Depot ECO
38 - 39	Archief ECO/AET
40 - 50	Reserve-exemplaren

INHOUDSOPGAVE

Verzendlijst	i
Inhoudsopgave	ii
Abstract	iv
Samenvatting	1
1. Inleiding	2
2. Materiaal en methoden	3
2.1 Toetsorganisme	3
2.2 Toetsstof, verdunningen en analyses	3
2.3 Bereiding toetssystemen	4
2.3.1 Experimenten met DSW	4
2.3.2 Experimenten met sediment	4
2.4 Toetsmethoden	6
2.4.1 Experimenten met DSW	6
2.4.2 Experimenten met sediment	6
2.5 Berekeningen en statistische analyse	6
2.5.1 Berekening van de EC50 en LC50	6
2.5.2 Bepaling van de NOEC en NOLC	7
2.5.3 Berekening van de ammoniak-gehalten	7
3. Resultaten	8
3.1 Experimenten met DSW	8
3.2 Experimenten met sediment	8
3.3 Vergelijking van DSW-resultaten met sediment-resultaten	9
4. Discussie	10
4.1 Voorwaarden voor sediment-toetsen	10
4.2 Methodiek	10
4.3 Resultaten van experimenten met CPF	11
5. Conclusies	13
Literatuur	14
Tabellen	
1. Experimentele condities en toxicologische parameters in langdurende experimenten met <i>D. magna</i> in DSW.	16
2. Experimentele condities en toxicologische parameters in langdurende experimenten met <i>D. magna</i> in twee sediment-systemen.	18

3. Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met <i>D. magna</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 89/P100.	19
4. Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met <i>D. magna</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 90/P064.	21
5. Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met <i>D. magna</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in een sediment/water-systeem; code 90/P026.	23
6. Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met <i>D. magna</i> blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in poriewater; code 90/P026.	25
7. Gemeten minimum- en maximum-waarden van nitriet, nitraat, ammonium en chloride in de beide systemen van de langdurende experimenten met sediment; berekende ammoniak-concentraties.	28

Figuur

1. Schematische weergave van de bereiding van de twee systemen in de langdurende experimenten met sediment.	29
---	----

Bijlagen

1. Samenstelling van Dutch Standard Water (DSW)	31
2. Karakteristieken van het Schoonrewoerdse Wiel-sediment	32

ABSTRACT

This report presents several experiments carried out in a study to develop standardized sediment toxicity tests. The prolonged toxicity of chlorpyrifos (CPF) to the waterflea *Daphnia magna* was determined in a sediment/water-system, an elutriate and in Dutch Standard Water.

The toxicity of CPF could be established in the elutriate and in Dutch Standard Water. NOEC values were 0,32 mg/kg dw and 0,032 µg/l respectively (concentrations as nominal values). The results in the sediment/water-system were unreliable due to low reproduction and growth of the daphnids during the 21 day exposure period.

SAMENVATTING

Als onderdeel van een project ter ontwikkeling van een set toetsen voor de toxiciteitsbeoordeling van verontreinigde sedimenten werd de langdurende toxiciteit van de modelstof chloorpyrifos (CPF) voor de watervlo *Daphnia magna* bepaald. Het genoemde project is een gezamenlijk onderzoek van RIZA, IMW-TNO en RIVM. Onderliggend rapport beschrijft het door het RIVM uitgevoerde deel.

De langdurende toxiciteit van CPF werd bepaald in drie systemen:

- sediment/water-systeem, als uitgezakte sediment/water-suspensie,
- poriewater, als supernatant van een gecentrifugeerde sediment/water-suspensie, en
- Dutch Standard Water (DSW).

Er werd in DSW getoetst om de toxiciteit in standaardwater te bepalen.

De gevolgde methodiek met beide sediment-systemen is gebaseerd op een internationaal vastgesteld protocol voor het langdurig toetsen van *D. magna* in standaardwater. De organismen werden beoordeeld op mortaliteit, gedrag, uiterlijk, reproductie en groei. De sediment-experimenten duurden 21 dagen (blootstelling) + 2 dagen (voorbereiding sediment).

Met de poriewater-systemen kon de toxiciteit van CPF voor *D. magna* vastgesteld worden waarbij werd voldaan aan criteria voor overleving en reproductie van de controle-groep. De NOEC in deze systemen betrof 0,32 mg/kg ds. In de sediment/water-systemen waren de reproductie en groei onvoldoende om de toxiciteit betrouwbaar vast te kunnen stellen. De indruk bestaat echter dat het hier om een uitzonderlijk resultaat gaat. Het experiment is niet herhaald met CPF. Zuurstof-gehalten waren met name in de sediment/water-systemen regelmatig zeer laag. De concentratie ammoniak was zodanig hoog dat met nadelige effecten van deze stof in de beide sediment-systemen rekening gehouden moet worden.

De methodieken voldeden aan een aantal eisen welke gesteld worden aan een breed toepasbare toetsmethode.

Als laagste NOEC werd voor *D. magna* in beide DSW-experimenten een nominale waarde van 0,032 µg/l gevonden, in beide gevallen voor het effect sterfte.

De laagste nominale NOEC-waarden in de sediment-systemen waren als volgt:

- < 0,056 mg/kg ds in een sediment/water-systeem en
- 0,32 mg/kg ds in poriewater.

Het bepalende effect was in beide gevallen sterfte.

1. INLEIDING

Door het RIVM wordt in samenwerking met het RIZA en IMW-TNO een project uitgevoerd waarin kortdurende en langdurende toxiciteitstoetsen met verschillende organismen worden ontwikkeld ter beoordeling van verontreinigde waterbodems. Een uitgebreide beschrijving van dit project evenals van de doelstellingen en gemaakte keuzes met betrekking tot de uitvoering is in een eerder rapport gegeven (Roghair et al., 1991).

Eén van de potentiële toxiciteitstoetsen voor de te ontwikkelen set toetsen is een langdurende toxiciteitstoets met de watervlo *Daphnia magna*. De ontwikkeling van deze toets is begonnen met de modelstof chloorpyrifos (CPF). Onderliggend rapport beschrijft de gevolgde methodiek evenals de resultaten die met CPF behaald zijn. De doelstellingen van dit onderzoek waren drieledig:

- beoordelen van de praktische uitvoerbaarheid van de gekozen methodiek en het vermogen om de toxiciteit voor *D. magna* van het verontreinigde sediment vast te kunnen stellen;
- vaststellen van eventuele verschillen in resultaten van blootstelling in een sediment/water-systeem en blootstelling in een waterige fractie van het sediment;
- beoordelen of de toxiciteit voor *D. magna* van CPF in sediment te voorspellen is op basis van toxiciteitsgegevens in standaardwater en de sediment/water-partitiecoëfficiënt van CPF.

De gevolgde methodiek is gebaseerd op de ervaringen opgedaan met de acute toxiciteitstoets (Roghair et al., 1991) en een internationaal vastgesteld protocol voor een langdurende toets met *D. magna* (EG, 1986). Rekening is gehouden met de volgende criteria die voor alle te ontwikkelen toetsmethoden in bovengenoemd kader gelden:

- De toetsduur dient beperkt te zijn tot maximaal enkele weken.
- De toetsen dienen bij voorkeur relatief eenvoudig van uitvoering te zijn.
- De toetsen dienen standaardiseerbaar en reproduceerbaar te zijn.
- De keuze van toetsorganismen dient primair gebaseerd te zijn op hun ecologische relevantie voor Nederlandse aquatische ecosystemen.
- De toetsorganismen moeten in principe in het laboratorium te kweken zijn. Indien dit niet mogelijk is, moeten de organismen eenvoudig uit het veld kunnen worden betrokken en goed houdbaar zijn in het laboratorium.

2. MATERIAAL EN METHODEN

De volgende typen experimenten werden uitgevoerd:

- Bepaling van de chronische toxiciteit voor *D. magna* in Dutch Standard Water (DSW; code 89/P100 en 90/P064).
- Bepaling van de chronische toxiciteit voor *D. magna* in een sediment/water-systeem en in een waterige fractie bereid uit een sediment/water-suspensie (code 90/P026).

2.1 Toetsorganisme

De experimenten werden uitgevoerd met de watervlo *Daphnia magna* welke op een gecontroleerde wijze in het laboratorium werd gekweekt.

D. magna wordt gekweekt in over actief kool (Norit row 08 supra) gefilterd Dutch Standard Water (DSW, zie bijlage 1). Ter verkrijging van een stabiel reproducerende kweek wordt aan dit DSW een hoeveelheid water uit de vijver van het RIVM toegevoegd volgens een verhouding van 70% DSW en 30% vijverwater. Bijlage 1 bevat informatie over dit vijverwater als ook over het mengsel. De daphnia's gebruikt voor experiment met code 89/P100 zijn op puur DSW gekweekt volgens een oude methode. De kamertemperatuur bedraagt 19 +/- 1 °C. De dieren worden dagelijks naar behoefte gevoerd met *Chlorella pyrenoidosa*. Alleen populaties van goede kwaliteit worden gebruikt voor experimenten. De kwaliteit van de dieren wordt drie keer per week beoordeeld op optredende sterfte, conditie, voorkomen van mannetjes, voedselopname, de produktie van jonge dieren en eieren en de conditie van de jonge dieren. Eén maal per kwartaal wordt de gevoeligheid van de dieren gecontroleerd in een acute toxiciteits-toets met tetrapropyleenbenzeensulfonaat. De watervlooiën welke gebruikt werden in de experimenten waren minder dan 24 uur oud.

2.2 Toetsstof, verdunningen en analyses

De experimenten werden uitgevoerd met ethyl-chloorpyrifos (CPF) van Riedel de Haën, nr. 35925, zuiverheid 99%. Er werden twee verschillende oplosmiddelen gebruikt om CPF op te lossen in water. Experimenten in DSW werden uitgevoerd met behulp van dimethylsulfoxide (DMSO) van Merck, nr. 2931, zuiverheid ≥ 99,5%. Experimenten met sediment werden uitgevoerd met tertiair-butylalcohol (TBA) van Merck, nr. 9629, zuiverheid ≥ 99,5%. Aan dit TBA was 1% demiwater toegevoegd om stolling bij 20 °C te voorkomen.

Als verdunningswater voor het bereiden van de concentratiereeks in het DSW-experiment met code 90/P064, werd een mengsel (50%/50%) van over actief kool, Norit row 08 supra, gefilterd DSW en verrijkt RIVM-vijverwater gebruikt. In het DSW-experiment met code 89/P100 werd alleen over kool gefilterd DSW gebruikt. Dit DSW bestond uit 50% oud kweekwater en 50% vers DSW. DSW, niet gefilterd over kool, werd gebruikt om sediment/water-suspensies te maken.

Bij alle experimenten werd een stock gemaakt van CPF in het betreffende oplosmiddel.

Bij de experimenten in DSW werd ook nog een tweede stock gemaakt in DSW. Deze tweede stock werd voor gebruik 2 à 3 uur geroerd op een magneetroerder. De stock van CPF in TBA werd zodanig bereid dat in de toetsmedia uiteindelijk een hoeveelheid TBA aanwezig was van minimaal 22 µl TBA/l en maximaal 33 µl TBA/l sediment/water-suspensie. De TBA-belasting was voor alle concentratiegroepen gelijk maar varieerde in de tijd. In de experimenten in DSW bevatten de toetsoplossingen een variërende hoeveelheid DMSO met maximaal 0,5 µl DMSO/l (code 89/P100) of een gelijke hoeveelheid van 1 µl DMSO/l (code 90/P064). In experiment 89/P100 werd geen oplosmiddel-controle getoetst.

Van de experimenten zijn matrix-monsters opgestuurd naar het Staringcentrum of het Laboratorium voor Organische Chemie van het RIVM ter bepaling van het CPF-gehalte. In alle gevallen waren de uitslagen van onbruikbare kwaliteit door problemen met de opwerking van de monsters of doordat de ontwikkelde methode niet nauwkeurig genoeg was. Van verdere analyse van de monsters is afgezien.

In de experimenten met sediment zijn de gehalten van nitriet, nitraat, ammonium en chloride bepaald op verschillende tijdstippen in verschillende concentratie-groepen. Deze analyses werden uitgevoerd door de afdeling Fysische en Chemische Technieken van het Laboratorium voor Ecotoxicologie (voorheen Laboratorium voor Ecotoxicologie, Milieuchemie en Drinkwater) van het RIVM. Nitriet-, nitraat- en ammonium-gehalten zijn fotometrisch bepaald met behulp van een auto-analyzer. Nitriet en nitraat zijn bepaald volgens methoden onder andere beschreven in Standard Methods (1980a). Ammonium is bepaald volgens een methode beschreven door Verdouw et al. (1978). Chloride werd bepaald volgens een potentiometrische titratie-methode onder andere beschreven in Standard Methods (1980b).

Al het glaswerk dat gebruikt werd bij de experimenten als ook voor de analyses werd gespoeld met aceton van Chemproha Chemicals.

2.3 Bereiding toetssystemen

2.3.1 Experimenten met DSW

Met *D. magna* werden langdurende experimenten in DSW uitgevoerd om de chronische toxiciteit van CPF te bepalen volgens een gebruikelijke bepalingmethode. De media werden bereid zoals in 2.2 is beschreven.

2.3.2 Experimenten met sediment

Voor de experimenten met sediment werden twee verschillende systemen bereid:

- een sediment/water-systeem,
- supernatant van de gecentrifugeerde sediment/water-suspensie, te beschouwen als poriewater.

Figuur 1 geeft schematisch weer hoe deze systemen zijn bereid.

Voorbehandeling van het sediment

Sediment uit het Schoonrewoerdse Wiel (SW) werd bemonsterd onder leiding van het RIZA zoals beschreven in Maas-Diepeveen en Van de Guchte (1990). Dit bemonsterde ruwe sediment werd verdund met DSW-L (zie bijlage 1) in een verhouding 1:1 (v/v) en vervolgens gezeefd over een 500 μm roestvrij-stalen zeef en bestraald met 10 kGy door Gammaster te Ede. Het sediment werd in 3-liter PVC-emmers bewaard bij 4 +/- 2 °C tot gebruik. Bijlage 2 vermeldt enkele analyseresultaten van het SW-sediment.

Belasting met CPF

Van het te gebruiken sediment werd het droge stof-gehalte bepaald. Dit gebeurde door een, gedurende 30 minuten bij 100 °C gedroogd en vervolgens afgekoeld bekerglas te vullen met ca. 50 gram nauwkeurig gewogen sediment en dit geheel 24 uur te drogen bij 100 °C. Na een afkoelingsperiode van 10 minuten in een exsicator werd het droge stof-gehalte bepaald door het wegen van het gedroogde sediment. Het sediment dat voor deze experimenten werd gebruikt had een droge stof-gehalte van 11,9 - 12,4%, afhankelijk van de batch.

Een suspensie van 40 gram droge stof per liter (zie Roghair et al., 1991) werd gemaakt door een hoeveelheid homogeen sediment overeenkomend met 120 gram droge stof aan te vullen tot 3 liter met DSW en vervolgens te roeren op een magnetische roerder met een glazen roervlo. Ten behoeve van chemische analyses werden suspensies gemaakt van 180 gram droge stof aangevuld tot 4,5 liter met DSW. Voor elke gewenste concentratie werd een dergelijke suspensie gemaakt. Aan elke suspensie werd 100 μl van een stockoplossing van CPF in TBA toegevoegd. De belaste sediment-suspensie werd vervolgens 20 uur geroerd met de glazen roervlo op de magneetroerder.

Bereiding van de verschillende systemen

De sediment/water-systemen werden bereid door 50 ml suspensie in een bekerglas te pipetteren met behulp van een glazen volpipet en een pipet-aid, onder voortdurend roeren van de suspensie op de magneetroerder. Per concentratie-groep werden 20 bekersglazen gevuld. Voor het kunnen bemonsteren van bovenstaand water op tijdstip $t = 0$ uur (aanvang van de blootstelling van de dieren) ten behoeve van chemische analyses werden enige bekersglazen gevuld met suspensie. Vervolgens werden deze evenals per concentratie-groep 10 bekersglazen met de suspensies voor 24 uur weggezet bij 20 +/- 1 °C om de sediment-deeltjes uit te laten zakken. De resterende 10 bekersglazen per concentratie-groep werden weggezet bij 4 +/- 2 °C in het donker voor later gebruik.

Ten behoeve van de bereiding van de waterige systemen werden de resterende suspensies gecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij 3500 toeren per minuut (3000g) in polycarbonaat-centrifugebuizen in een Ultra Sorvall RC-3 centrifuge. Voor elke concentratie-groep werden 20 bekersglazen gevuld met 50 ml van het supernatant, waarvan 10 bekersglazen donker werden weggezet bij 4 +/- 2 °C. De overgebleven hoeveelheid supernatant werd gebruikt voor het meten van pH en zuurstofgehalte en voor het uitvoeren van analyses op het tijdstip $t = 0$ uur.

De bij 4 +/- 2 °C bewaarde systemen werden 24 uur voor gebruik bij 20 °C geplaatst om op temperatuur te komen.

2.4 Toetsmethoden

2.4.1 Experimenten met DSW

Tabel 1 geeft de experimentele omstandigheden en de toxicologische parameters van de langdurende experimenten in DSW. De gevolgde methodiek is gebaseerd op het concept EG-protocol voor de bepaling van de chronische toxiciteit voor daphnia's (EG, 1986). De toets werd in tweevoud uitgevoerd. De duur van experiment 89/P100 betrof 16 dagen (verkorte reproductie-toets) en die van 90/P064 21 dagen. Op basis van kortdurende experimenten werden concentratiereeksen opgesteld met een rede 3,2.

De pH en het zuurstofgehalte werden in experiment 89/P100 op $t = 0$, 48 en 72 uur na verversing wekelijks gemeten in de controle groep en de hoogste concentratie met levende dieren. In experiment 90/P064 werden beide controles en alle concentratiegroepen gemeten op $t = 0$ uur bij aanvang van de blootstelling en wekelijks op $t = 72$ uur na verversing. Op $t = 48$ uur na verversing werden wekelijks de controles en de hoogste concentratie met levende dieren gemeten. De pH-waarden werden bepaald met behulp van een Palintest microcomputer pH-meter PT 110. De zuurstofgehalten werden gemeten met een WTW Oxi 96 zuurstofmeter.

2.4.2 Experimenten met sediment

De experimentele omstandigheden en de toxicologische parameters voor de beide sediment-systemen zijn vermeld in Tabel 2. De experimenten werden met elk systeem in enkelvoud uitgevoerd (code 90/P026). Op basis van een range-finding studie uitgevoerd door IMW-TNO werd een concentratiereeks opgesteld met een rede 1,8. Aan de concentratiereeks werd een DSW-controle toegevoegd.

Het zuurstofgehalte werd dagelijks gemeten in alle controles en alle concentratiegroepen van zowel het sediment/water-systeem als van het poriewater. De pH werd gemeten in deze systemen op $t = 0$, 48, 72 en 96 uur na verversing. De zuurstofgehalten werden gemeten met een WTW Oxi 96 zuurstofmeter. De pH-waarden werden bepaald met behulp van een Palintest microcomputer pH-meter PT 110.

Nitraat, nitriet, ammonium en chloride werden in het sediment/water-systeem en in het poriewater tweemaal geanalyseerd op de tijdstippen $t = 0$ en $t = 96$ uur na verversing in de twee controle-groepen en in alle concentratie-groepen met levende dieren.

De experimenten zijn uitgevoerd volgens het daarvoor opgestelde werkvoorschrift B6/8995/1990-1.0.

2.5 Berekeningen en statistische analyse

2.5.1 Berekening van de EC50 en LC50

De EC50- en LC50-waarden werden berekend met behulp van een gecomputeriseerde versie (Hoekstra, 1989) van de getrimde Spearman-Kärber methode (Hamilton et al.,

1977).

2.5.2 Bepaling van de NOEC en NOLC

De NOEC-waarden voor 1) sterfte (NOLC-waarden), 2) zwemgedrag en uiterlijk en 3) tijdstip van verschijnen van eieren in de broedkamer werden vastgesteld uit de waargenomen concentratie-effect relaties. Hierbij geldt dat een NOEC een concentratie lager ligt dan de LOEC-waarde. Een concentratie met $\leq 10\%$ effect telt in dit geval als een concentratie zonder effect. NOEC-waarden voor reproductie en groei werden statistisch getoetst met behulp van een ANOVA en de Dunnett's toets zoals beschikbaar in het gecomputeriseerde programma Toxstat versie 2.1 (Gulley et al., 1988).

2.5.3 Berekening van de ammoniak-gehalten

Ammoniak-gehalten werden berekend uit gemeten ammonium-concentraties, temperatuur en pH volgens Emerson et al. (1975). Als temperatuur werd de gemiddelde kamertemperatuur genomen. Voor pH en ammonium-gehalte zijn minimale en maximale meetwaarden per concentratie genomen zodat de laagst en hoogst mogelijke ammoniak-concentraties werden berekend.

3. RESULTATEN

3.1 Experimenten met DSW

De tabellen 3 en 4 geven de resultaten van de chronische toxiciteitsexperimenten met *D. magna* in DSW weer. De experimenten werden in tweevoud uitgevoerd, experiment 89/P100 duurde 16 dagen en experiment 90/P064 21 dagen.

De laagste nominale NOEC-waarde was voor beide experimenten 0,032 µg/l, in beide gevallen voor het effect sterfte. De nominale LC50-waarden aan het einde van de experimenten bedroegen 0,032-0,10 µg/l (geen 95% betrouwbaarheidsinterval beschikbaar) en 0,13 µg/l (95% bti van 0,09-0,18 µg/l). Na de tweede week van blootstelling trad er geen sterfte meer op in overlevende dieren. Bij deze overlevende dieren werden geen significante andere effecten waargenomen. Sporadisch en niet concentratiegerelateerd werden in beide experimenten dode jongen en afgezette eieren gevonden.

In experiment 89/P100 werd een controle-mortaliteit van 20% waargenomen, 10% hoger dan wenselijk volgens de concept EG-richtlijn (1986). Er was geen controle-mortaliteit in het tweede experiment. De gemeten pH-waarden voor de beide experimenten lagen tussen 7,8 en 8,3 (89/P100) en tussen 8,0 en 8,6 (90/P064). De pH-waarden waren in dit laatste experiment aan de hoge kant vanwege de menging met RIVM-vijverwater. Om deze reden is bij drie verversingen een verhouding van 70% DSW en 30% RIVM-vijverwater gebruikt voor het verdunningswater in plaats van 50%/50%. De zuurstofniveau's voldeden aan eisen gesteld in (internationale) richtlijnen, namelijk boven 7,0 mg/l (89/P100) en boven 8,7 mg/l (90/P064).

De daphnia's die gebruikt werden voor experiment 90/P064 hadden een lichte besmetting met klokdierpjes. Een nadelig effect hiervan op de daphnia's werd niet gevonden.

3.2 Experimenten met sediment

De tabellen 5 en 6 geven de resultaten weer van de chronische toxiciteitsexperimenten met *D. magna* in een sediment/water-systeem en in poriewater. De experimenten werden in enkelvoud uitgevoerd.

De laagste nominale NOEC-waarden bedroegen:

- < 0,056 mg/kg ds in een sediment/water-systeem en
- 0,32 mg/kg ds in poriewater.

De nominale LC50-waarden aan het einde van de experimenten bedroegen:

- 0,11 mg/kg ds in een sediment/water-systeem met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 0,08-0,14 mg/kg ds en
- 0,32-0,56 mg/kg ds in poriewater.

Opvallend voor zowel het sediment/water-systeem als het poriewater waren de verschillen in reproductie en groei vergeleken met die van de DSW-controle. In het sediment/water-systeem waren de reproductie en groei van de controle en de oplosmiddelcontrole significant verminderd in vergelijking met die van de DSW-controle (Tabel 5). Voor het poriewater geldt, met uitzondering van de groei in de controle, dat de reproductie en groei significant vermeerderd zijn in vergelijking met die van de DSW-

controle (Tabel 6). In het sediment/water-systeem was de vertraging in groei al vanaf de eerste dagen van de toets zichtbaar. Eieren in de broedkamer werden niet voor dag 14 waargenomen terwijl de eerste eieren bij de DSW-controle op dag 6 werden waargenomen. De DSW-controle gaf tijdens de toetsduur van 21 dagen 4 broeden per daphnia. De controle en de oplosmiddel-controle gaven in deze periode maximaal 2, in de meeste gevallen kleine, broeden per daphnia. In het poriewater gaven de controle en de oplosmiddel-controle 4 broeden tijdens de toetsduur van 21 dagen maar deze broeden waren over het algemeen groter dan die van de DSW-controle, resulterend in een significant verhoogde reproductie. Tevens waren er enige verschillen tussen controle en oplosmiddel-controle. In het sediment/water-systeem was de groei van de oplosmiddel-controle groter dan die van de controle. In het poriewater was de reproductie van de controle significant groter dan die van de oplosmiddel-controle.

In beide sediment-systemen werd, op een enkele uitzondering na, als enig effect sterfte waargenomen. Wel nam de reproductie in het sediment/water-systeem af met toenemende concentratie maar dit is niet statistisch significant. In het poriewater leek CPF de reproductie bij lage concentraties te stimuleren.

De sterfte in de controle's was in beide sediment-systemen aanvaardbaar volgens de concept EG-richtlijn voor toetsen in standaardwater (EG, 1986). De gemeten pH-waarden voor de sediment/water-systemen lagen tussen 7,6 en 7,9 en voor de poriewater-systemen tussen 7,9 en 8,4. De zuurstof-niveaus waren met name in de sediment/water-systemen soms zeer laag, namelijk tussen 0,3 en 6,0 mg/l. De meest lage waarden traden de dag na verversing op. Op de andere dagen waren de gemeten zuurstofgehalten vrijwel allemaal boven de 2,0 mg/l, een minimum-grens die in de EG-richtlijn voor standaardwater wordt genoemd (EG, 1986). In het poriewater lagen de zuurstofgehalten tussen de 2,1 en 9,7 mg/l.

In Tabel 7 zijn de in de beide systemen gemeten concentraties nitriet, nitraat, ammonium en chloride getabelleerd. Tevens is de berekende concentratie ammoniak, NH_3 , van de systemen vermeld. De maximaal mogelijke concentratie ammoniak is berekend op 3,28 mg NH_3 /l in poriewater. De maximale gemeten concentratie nitriet was 0,16 mg NO_2 /l, eveneens in poriewater. In de meeste systemen is de concentratie ammonium voor een verversing (=96 uur na een verversing) lager dan vlak na een verversing (=0 uur na een verversing). De concentratie nitriet is hoger voor een verversing dan na verversing.

3.3 Vergelijking van DSW-resultaten met sediment-resultaten

Doordat de actuele CPF-concentraties in de beide sediment-systemen niet bepaald konden worden is het niet mogelijk om de toxiciteit van CPF in DSW te vergelijken met die in de sediment-systemen. Het maken van een schatting van de toxiciteit in sediment-systemen met behulp van DSW-resultaten en een geschatte partitiefcoëfficiënt sediment/water van CPF werd niet zinvol geacht omdat actuele en nominale concentraties van chloorpyrifos in waterige systemen aanzienlijk kunnen verschillen.

4. DISCUSSIE

4.1 Voorwaarden voor sediment-toetsen

Met de gevolgde werkwijze werd aan vrijwel alle in de inleiding gestelde voorwaarden voldaan. De toetsduur is 21 dagen en de voorbereiding duurt 2 dagen. De methode is eenvoudig uit te voeren door ecotoxicologen die ervaring hebben met het uitvoeren van reproductie-toetsen met *D. magna*. Standaardisatie is mogelijk waarbij de kanttekening gemaakt moet worden dat de keuze van en variatie in referentie-sedimenten nog aandacht behoeft. De keuze van toetsorganismen is reeds besproken in Roghair et al. (1991). De reproduceerbaarheid van de hier gevolgde methode is niet vastgesteld binnen het RIVM maar zal in een zogenaamde covernotitie bediscussieerd worden. In deze notitie zal een vergelijking gemaakt worden van de resultaten van de methode behaald door RIZA, IMW-TNO en RIVM.

4.2 Methodiek

Het meest opvallende resultaat in de sediment-experimenten was de slechte reproductie en groei in de sediment/water-systemen. De reproductie voldoet niet aan de validiteits-criteria die voor dit type experiment in de concept richtlijn van de EG (1986) worden gesteld. Het aantal jongen in de controle-groep bereikte niet de 60 per ouder-daphnia en de variantie-coëfficiënt bedroeg meer dan de gestelde 25% voor de controle (EG, 1986). Op basis van dit enkele resultaat zou men kunnen concluderen dat daphnia's niet in sediment/water-systemen getoetst kunnen worden. Nog niet gerapporteerd onderzoek heeft echter aangetoond dat de in dit experiment waargenomen slechte reproductie en groei uitzonderlijk waren. De reden is ons niet bekend.

In de poriewater-systemen gaven de daphnia's een goede reproductie en groei te zien. De significant verhoogde reproductie ten opzichte van DSW is vermoedelijk het gevolg van de extra voeding die de daphnia's uit het poriewater kunnen halen.

Met betrekking tot de methode van belasting van het sediment met CPF zijn in het eerste rapport in deze serie (Roghair et al., 1991) enige opmerkingen gemaakt die ook hier van toepassing zijn maar die niet herhaald zullen worden.

De chronische toxiciteit van het verontreinigde sediment werd in twee verschillende systemen bepaald: een sediment/water-systeem en een waterige fractie die beschouwd moet worden als poriewater. De bereiding van het sediment/water-systeem is niet veranderd vergeleken bij de eerdere experimenten, bepaling van de acute toxiciteit van CPF. De bereiding van het zogenaamde poriewater is dat wel. Bij de eerdere experimenten werd het "poriewater" bereid als 1) gecentrifugeerd bovenstaand water van een sediment/water-systeem, 2) bovenstaand water van een sediment/water-systeem en 3) poriewater, namelijk supernatant van gecentrifugeerd nat sediment. Uit vergelijking van de resultaten bereikt met deze drie soorten poriewater werd geconcludeerd (Hooftman et al., covernotitie in voorbereiding) dat de verschillende bereidingswijzen niet tot verschillen in toxiciteit leidden. Blijkbaar was de beschikbare concentratie CPF in al deze waterige fracties gelijk. Om deze reden is met het bepalen van de chronische toxiciteit volstaan met één soort poriewater. Gekozen werd om de bereiding in prak-

tische zin te vereenvoudigen waarmee tijdswinst werd bereikt. Het poriewater wordt nu gemaakt door een sediment/water-suspensie te centrifugeren. Het supernatant moet als poriewater worden beschouwd. Met deze bereidingswijze geldt sterker de opmerking over het bereiken van evenwicht in de verdeling van de stof over sediment en water (Roghair et al., 1991). De tijdsduur dat dit evenwicht zich kan instellen is teruggebracht van circa 44 uur naar circa 20 uur.

De zuurstofniveau's in de sediment/water-systemen waren met name de dag na verversing van de systemen laag. Concentraties lagen meestal boven de 2,0 mg/l, een grens die als aanvaardbaar minimum in het EG-protocol is gesteld (EG, 1986). Beluchting is niet toegepast omdat dit tot strippen van het CPF zou hebben geleid. Een verhoging van de zuurstofniveau's kan wellicht bereikt worden door het sediment zodanig voor te behandelen dat de zuurstofbehoefte (BOD) tijdens de blootstelling minder wordt. Hier zal nader aandacht aan worden besteed.

4.3 Resultaten van experimenten met CPF

CPF bleek in de sediment/water-systemen toxischer voor *D. magna* dan in het poriewater. De LC50 in de poriewater-systemen lag een factor 4 hoger dan die in de sediment/water-systemen. De laagste NOEC lag tenminste 4 concentratie-stappen hoger. Deze resultaten moeten echter beschouwd worden in het licht van de slechte "performance" van de daphnia's in de sediment/water-systemen. Een verklaring voor deze verschillen zou kunnen zijn dat de concentratie beschikbaar CPF in de sediment/water-systemen groter was dan in de poriewater-systemen. CPF dat ontsnapt uit de waterige fase naar de gasfase wordt, door een streven naar thermodynamisch evenwicht, aangevuld met CPF vanuit de vaste fase. In de poriewater-systemen zal de concentratie CPF in de waterige fase ook afnemen maar aanvulling kan alleen plaatsvinden vanuit zwevende deeltjes, die slechts in een zeer geringe hoeveelheid voorkomen in poriewater. Of deze concentratieverschillen in beschikbaar CPF aanwezig waren kan niet worden vastgesteld door ontbreken van analyse-resultaten.

De aard van de effecten was in de sediment-systemen en in DSW identiek: sterfte werd als enig type effect waargenomen.

De gemeten pH-waarden lagen tussen 7,6 en 7,9 in de sediment/water-systemen en 7,9 en 8,4 in de poriewater-systemen. De verandering in pH is daarmee klein en voldoet aan veranderingen die worden toegestaan in experimenten met standaardwater (EG, 1986). De pH in DSW-experiment 90/P064 was met een maximum van 8,6, 0,1 eenheid hoger dan toegestaan (EG, 1986). De gemeten zuurstof-concentraties waren met een minimum van 0,3 mg/l lager dan acceptabel wordt geacht in de concept-EG-richtlijn (EG, 1986).

In de meeste testvaten van beide sediment-systemen lijkt nitrificatie plaats te vinden. De concentraties nitriet en nitraat zijn van vergelijkbare grootte als die gemeten in de acute toxiciteitsexperimenten. De concentraties ammonium en ammoniak zijn iets hoger (Roghair et al., 1991).

De hoogst gemeten concentratie nitriet was 0,16 mg/l, gemeten in poriewater. Chronische toxiciteitsgegevens voor nitriet en crustaceeën zijn niet beschikbaar voor zover ons

bekend (Speijers et al., 1987).

De maximaal mogelijke concentratie ammoniak werd berekend voor poriewater, 3,3 mg/l. Deze waarde ligt boven de NOEC's van 1,2 en 2,4 mg/l die in langdurende experimenten met *D. magna* werd vastgesteld (Roghair et al., rapport in voorbereiding). Ook de berekende, maximale waarde voor ammoniak in de sediment/water-systemen, 1,6 mg/l, overschrijdt de NOEC. In de hier uitgevoerde experimenten kan ammoniak daarom hebben bijgedragen aan de waargenomen effecten.

5. CONCLUSIES

De langdurende toxiciteit van de modelstof chloorpyrifos (CPF) kon met de gevolgde methodiek vastgesteld worden in een waterige fractie van het sediment, te beschouwen als poriewater. De NOEC is 0,32 mg/kg ds (nominale waarde). Overleving en reproductie van de controle-groep voldeden aan de validiteitscriteria die voor dit type toets in standaardwater worden gehanteerd in internationale richtlijnen. In een sediment/water-systeem kon de toxiciteit niet naar tevredenheid worden vastgesteld doordat de reproductie en groei van de daphnia's tijdens de duur van het experiment onvoldoende waren. De indruk bestaat dat deze slechte "performance" van de daphnia's uitzonderlijk is en een herhaling van het experiment tot betere resultaten zou leiden. In het sediment/water-systeem werden regelmatig zeer lage zuurstofconcentraties gemeten. Ammoniakconcentraties waren zo hoog in beide sediment-systemen dat deze hebben kunnen bijdragen aan de effecten.

De gevolgde methodiek is eenvoudig uit te voeren door ecotoxicologen die ervaring hebben met het uitvoeren van langdurende toetsen met *D. magna*. Standaardisatie van de methodiek is mogelijk; criteria voor de keuze van een referentie-sediment dienen nog opgesteld te worden. De toets duurt 21 + 2 dagen.

De toxiciteit van CPF in het sediment/water-systeem bleek verschillend van die in poriewater. Door de slechte kwaliteit van de resultaten in het sediment/water-systeem is een vergelijking van de toxiciteiten en daarmee een mogelijke verklaring niet betrouwbaar.

Er is geen voorspelling gemaakt van de toxiciteit in de sediment-systemen op basis van toxiciteit in standaardwater door ontbreken van een actuele sediment/water-partitiec coefficient. Deze partitiec coefficient kon niet worden vastgesteld omdat analyse-resultaten van gehalten CPF in sediment en waterige fractie onbetrouwbaar waren.

De tweede en derde doelstelling van dit onderzoek is slechts ten dele respectievelijk niet bereikt. Herhaling van de sediment-experimenten is nodig om de beoogde methodiek voor de modelstof chloorpyrifos te kunnen toetsen.

Dankwoord

Wij willen D. Gielen bedanken voor het kweken van de daphnia's en de afdeling Fysische en Chemische Technieken voor het uitvoeren van de ondersteunende analyses.

LITERATUUR

EG, 1986.

Prolonged toxicity study with *Daphnia magna*: effects on reproduction. Draft 4, XI/681/86. Commission of the European Community, Brussel.

Emerson, K., R.C. Russo, R.E. Lund and R.V. Thurston, 1975.

Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board. Can., **32**, pp 2379-2383.

Gulley, D.D., A.M. Boelter and H.L. Bergman, 1988. Toxstat release 2.1. University of Wyoming, Laramie, Wyoming 82071, U.S.A.

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**, pp 714-719. Correction: **12**, p 417, 1978.

Hoekstra, J., 1989. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven.

Maas-Diepenveen, J.L. en C. van de Guchte, 1990.

Ecotoxicologische testen voor de beoordeling van verontreinigde waterbodems; Methodebeschrijvingen. RIZA werkdocument nr. 90.173X. Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling, Lelystad.

Roghair, C.J., M.A.H. Wolters en M.P.A. Huijs, 1991. Ontwikkeling van sediment-toxiciteits-toetsen; I: De acute toxiciteit van sediment gecontamineerd met chloorpyrifos voor *Daphnia magna* en *Chironomus riparius*. Rapport nr. 719102 004, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven.

Speijers, G.J.A., G.F. van Went, M.E. van Apeldoorn, G.K. Montizaan, J.A. Janus, J.H. Canton, C.A.M. van Gestel, C.A. van der Heijden, E. Heijna-Merkus, A.G.A.C. Knaap, R. Luttkik en D. de Zwart, 1987. Integrated Criteria Document Nitrate: Effects. Appendix to report nr. 758473 007. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven.

Standard Methods, 1980a.

Nitrite and nitrate. In: Standard methods for the examination of water and waste water, 15th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p 378.

Standard Methods, 1980b.

Chloride. In: Standard methods for the examination of water and waste water, 15th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p. 273.

Verdouw, H., C.J.A. Echteveld en E.M.G. Dekkers, 1978.

Water Research, **12**, p 399.

Tabel 1: Experimentele condities en toxicologische parameters in langdurende experimenten met *D. magna* in DSW.

dosering	semi-statisch
duur	16 dagen (89/P100); 21 dagen (90/P064)
verversing	3 * / week
concentraties	controle - 0,010 - 0,032 - 0,10 - 0,32 - 1,0 µg/l (89/P100) controle - 0,0 (oplosmiddel-controle) - 0,0032 - 0,010 - 0,032 - 0,10 - 0,32 - 1,0 µg/l (90/P064)
leeftijd daphnia's	< 24 uur
dieren/concentratie	10 (individueel blootgesteld)
toetsvolume	40 ml (89/P100) en 50 ml (90/P064)
beluchting	niet
temperatuur	20 +/- 1 °C
licht	12L 12D
voedsel	dagelijks <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , naar behoefte
toxicologische parameters	sterfte, zwemgedrag, uiterlijk, tijdstip waarop eieren verschijnen in de broedkamer, aantal levende jongen, lengte
observatietijden	3 * / week bij verversing en dagelijks ten tijde van verschijnen van eieren in de broedkamer

Tabel 2: Experimentele condities en toxicologische parameters in langdurende experimenten met *D. magna* in twee sediment-systemen.

dosering	semi-statisch
duur	21 dagen
verversing	dag 4, 11 en 18: daphnia's werden overgezet op systemen die 4 dagen oud en in de koelkast bewaard waren dag 7 en 14: daphnia's werden overgezet op vers bereide systemen
concentraties	DSW-controle - controle - 0,0 (oplosmiddel-controle) - 0,056 - 0,10 - 0,18 - 0,32 - 0,56 mg/kg ds
leeftijd daphnia's	< 24 uur
dieren/concentratie	10 (individueel blootgesteld)
toetsvolume	50 ml
beluchting	niet
temperatuur	20 +/- 1 °C
licht	12L 12D
voedsel	dagelijks <i>Chlorella pyrenoidosa</i> naar behoefte
toxicologische parameters	sterfte, zwemgedrag, uiterlijk, tijdstip waarop eieren verschijnen in de broedkamer, aantal levende jongen, lengte
observatietijden	2 * / week bij verversing en dagelijks ten tijde van verschijnen van eieren in de broedkamer

Tabel 3: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 89/P100 (in µg/l; nominale concentraties)

scorings- tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	NOLC 1)	NOEC 2)	NOEC 3)	NOEC 4)	NOEC 5)
dag 8	0,09	0,09	0,032	0,032	----	----	≥ 0,10
dag 13	0,032- 0,10	0,032- 0,10	0,032	0,032	----	----	----
dag 16	0,032- 0,10	0,032- 0,10	0,032	0,032	≥ 0,032	≥ 0,032	----

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

3) E = reproductieremming

4) E = groeiremming

5) E = vertraging in tijdstip waarop eieren in broedkamer verschijnen

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

concentratie	% sterfte op diverse tijdstippen			% (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen		
	dag 8	dag 13	dag 16	dag 8	dag 13	dag 16
controle	0	10	20	0	10	20
0,0	---	---	---	---	---	---
0,010	0	0	10	0	10	10
0,032	0	0	0	0	0	0
0,10	60	100	100	60	100	100
0,32	100	100	100	100	100	100
1,0	100	100	100	100	100	100

--- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

vervolg Tabel 3: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 89/P100 (in µg/l; nominale concentraties)

reproductie (x = gemiddeld aantal levende jongen per vrouwtje na 16 dagen; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; % = percentage reproductie t.o.v. de controle; P = significantie afwijkende reproductie)

	contr.	0,0	0,010	0,032	0,10	0,32	1,0
x	70,1	----	72,7	74,1	----	----	----
s	8,0	----	5,7	14,1	----	----	----
n	8	----	9	10	----	----	----
%	100	----	104	106	----	----	----
P							

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
* P < 0,05; ** P < 0,01

groei (x = gemiddelde lengte in oculair micrometer eenheden; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; P = significantie afwijkende groei)

	contr.	0,0	0,010	0,032	0,10	0,32	1,0
x	5,1	----	5,1	5,1	----	----	----
s	0,1	----	0,2	0,1	----	----	----
n	8	----	9	10	----	----	----
P							

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
* P < 0,05; ** P < 0,01

concentratie	pH						zuurstofgehalte in mg/l					
	0 uur		48 uur		72 uur		0 uur		48 uur		72 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
controle	7,98	7,98	8,10	8,24	7,97	8,23	7,4	7,4	8,5	9,4	7,6	9,3
0,0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
0,010	----	----	----	----	7,79	8,01	----	----	----	----	7,0	9,2
0,032	----	----	8,04	8,04	7,94	7,99	----	----	9,2	9,2	7,5	9,2
0,10	----	----	8,11	8,28	8,04	8,27	----	----	8,4	9,3	8,1	8,6
0,32	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
1,0	8,11	8,11	----	----	----	----	8,8	8,8	----	----	----	----

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

vervolg Tabel 4: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in DSW; code 90/P064 (in µg/l; nominale concentraties)

reproductie (x = gemiddeld aantal levende jongen per vrouwtje na 21 dagen; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; % = percentage reproductie t.o.v. de controle; P = significantie afwijkende reproductie)

	contr.	0,0	0,0032	0,010	0,032	0,10	0,32	1,0
x	145,9	157,1	149,8	151,1	142,4	133,6	----	----
s	21,0	22,3	14,6	24,3	14,9	17,0	----	----
n	10	10	10	10	10	7	----	----
%		100	95	96	91	85	----	----
P								

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
 * P < 0,05; ** P < 0,01

groei (x = gemiddelde lengte in oculair micrometer eenheden; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; P = significantie afwijkende groei)

	contr.	0,0	0,0032	0,010	0,032	0,10	0,32	1,0
x	6,2	6,2	6,2	6,2	6,3	6,2	----	----
s	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	----	----
n	10	10	10	10	10	7	----	----
P								

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
 * P < 0,05; ** P < 0,01

concentratie	pH						zuurstofgehalte in mg/l					
	0 uur		48 uur		72 uur		0 uur		48 uur		72 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
controle	8,55	8,56	8,09	8,49	8,20	8,50	9,2	9,3	8,9	9,3	9,0	9,7
0,0	8,56	8,58	8,10	8,42	8,18	8,51	9,2	9,3	8,7	9,8	8,9	9,9
0,10	8,55	8,55	7,95	8,38	8,00	8,49	9,3	9,3	8,7	9,5	9,0	9,9
0,32	8,53	8,54	----	----	8,22	8,24	9,4	9,5	---	---	9,1	9,8
1,0	8,55	8,56	----	----	8,32	8,32	9,4	9,4	---	---	9,5	9,7

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

Tabel 5: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in een sediment/water-systeem; code 90/P026 (in mg/kg ds; nominale concentraties)

scorings-tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	NOEC 1)	NOEC 2)	NOEC 3)	NOEC 4)	NOEC 5)
week 1	0,16	0,16	0,10	0,10	----	----	≥ 0,10
week 2	0,12	0,12	0,056	----	----	----	----
einde	0,11	0,12	< 0,056	< 0,056	≥ 0,10	≥ 0,10	----

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

3) E = reproductieremming

4) E = groeiemming

5) E = vertraging in tijdstip waarop eieren in broedkamer verschijnen

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

concentratie	% sterfte op diverse tijdstippen			% (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen		
	week 1	week 2	einde	week 1	week 2	einde
controle	0	0	10	0	0	10
0,0	0	0	10	0	0	10
0,056	0	10	20	0	30	40
0,10	0	20	40	0	20	40
0,18	70	100	100	70	100	100
0,32	100	100	100	100	100	100
0,56	100	100	100	100	100	100
DSW-controle	0	0	0	0	0	0

vervolg Tabel 5: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in een sediment/water-systeem; code 90/P026 (in mg/kg ds; nominale concentraties)

reproductie (x = gemiddeld aantal levende jongen per vrouwtje na 21 dagen; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; % = percentage reproductie t.o.v. de controle; P = significantie afwijkende reproductie)

	contr.	0,0	0,056	0,10	0,18	0,32	0,56	DSW
x	15,6	23,2	17,4	12,3	----	----	----	89,4
s	12,2	14,5	19,1	8,3	----	----	----	8,4
n	9	9	8	6	----	----	----	10
%		100	75	53	----	----	----	
P								

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
* P < 0,05; ** P < 0,01

groei (x = gemiddelde lengte in oculair micrometer eenheden; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; P = significantie afwijkende groei)

	contr.	0,0	0,056	0,10	0,18	0,32	0,56	DSW
x	3,9	4,4	4,1	4,3	----	----	----	5,4
s	0,2	0,3	0,8	0,2	----	----	----	0,2
n	7	9	8	6	----	----	----	10
P								

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets
* P < 0,05; ** P < 0,01

concentratie	pH						zuurstofgehalte in mg/l					
	0 uur		72 uur		96 uur		0 uur		72 uur		96 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
controle	7,59	7,89	7,75	7,91	7,80	7,90	1,0	4,4	2,5	5,2	4,2	5,5
0,0	7,59	7,78	7,74	7,94	7,79	7,86	0,8	5,2	2,4	4,9	3,3	5,5
0,056	7,62	7,69	7,74	7,86	7,78	7,86	1,2	4,7	3,3	5,0	4,4	5,2
0,10	7,61	7,76	7,74	7,85	7,80	7,88	1,3	5,6	1,2	5,0	3,9	5,9
0,18	7,60	7,81	7,86	7,87	7,75	7,81	1,5	6,0	1,4	4,9	3,5	4,8
0,32	7,58	7,74	----	----	7,77	7,80	1,3	3,2	4,1	4,4	5,0	5,1
0,56	7,67	7,68	----	----	----	----	2,5	3,8	----	----	----	----
DSW-controle	8,35	8,49	8,10	8,45	8,06	8,46	8,4	9,8	7,2	9,1	8,2	9,2

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

Tabel 6: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in poriewater; code 90/P026 (in mg/kg ds; nominale concentraties)

scorings-tijdstip	LC50 1)	EC50 2)	NOLC 1)	NOEC 2)	NOEC 3)	NOEC 4)	NOEC 5)
week 1	0,45	0,44	0,32	0,32	----	----	≥ 0,32
week 2	0,32- 0,56	0,32- 0,56	0,32	0,32	----	----	----
einde	0,32- 0,56	0,32- 0,56	0,32	0,32	≥ 0,32	≥ 0,32	----

1) L = mortaliteit

2) E = mortaliteit, afwijkend gedrag en afwijkend uiterlijk

3) E = reproductieremming

4) E = groeiremming

5) E = vertraging in tijdstip waarop eieren in broedkamer verschijnen

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

concentratie	% sterfte op diverse tijdstippen			% (sterfte + afwijkend gedrag en uiterlijk) op diverse tijdstippen		
	week 1	week 2	einde	week 1	week 2	einde
controle	0	0	0	0	0	0
0,0	0	0	0	0	0	0
0,056	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	80	100	100	90	100	100
DSW-controle	0	0	0	0	0	0

vervolg Tabel 6: Overzicht van de resultaten van een reproductie/groei-experiment met *D. magna* blootgesteld aan ethyl-chloorpyrifos in poriewater; code 90/P026 (in mg/kg ds; nominale concentraties)

reproductie (x = gemiddeld aantal levende jongen per vrouwtje na 21 dagen; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; % = percentage reproductie t.o.v. de controle; P = significantie afwijkende reproductie)

	contr.	0,0	0,056	0,10	0,18	0,32	0,56	DSW
x	128,5	116,8	117,5	123,2	117,6	120,6	----	89,4
s	5,4	4,8	3,8	6,0	4,8	3,8	----	8,4
n	10	9	10	10	10	10	----	10
%		100	101	105	101	103	----	
P				*				

---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

* P < 0,05; ** P < 0,01

groei (x = gemiddelde lengte in oculair micrometer eenheden; s = standaardafwijking; n = aantal vrouwtjes; P = significantie afwijkende groei)

	contr.	0,0	0,056	0,10	0,18	0,32	0,56	DSW
x	5,5	5,6	5,5	5,5	5,5	5,4	----	5,4
s	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	----	0,2
n	10	9	10	10	9	10	----	10
P								

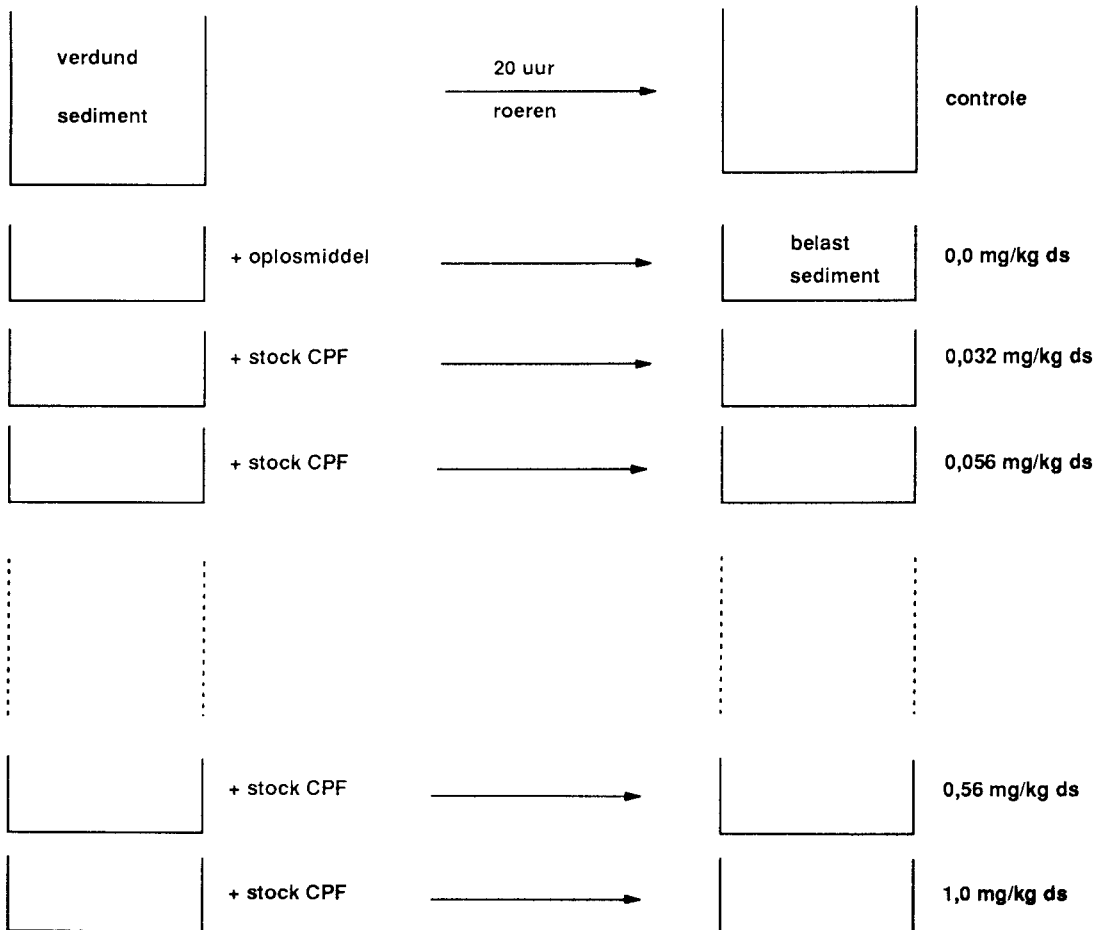
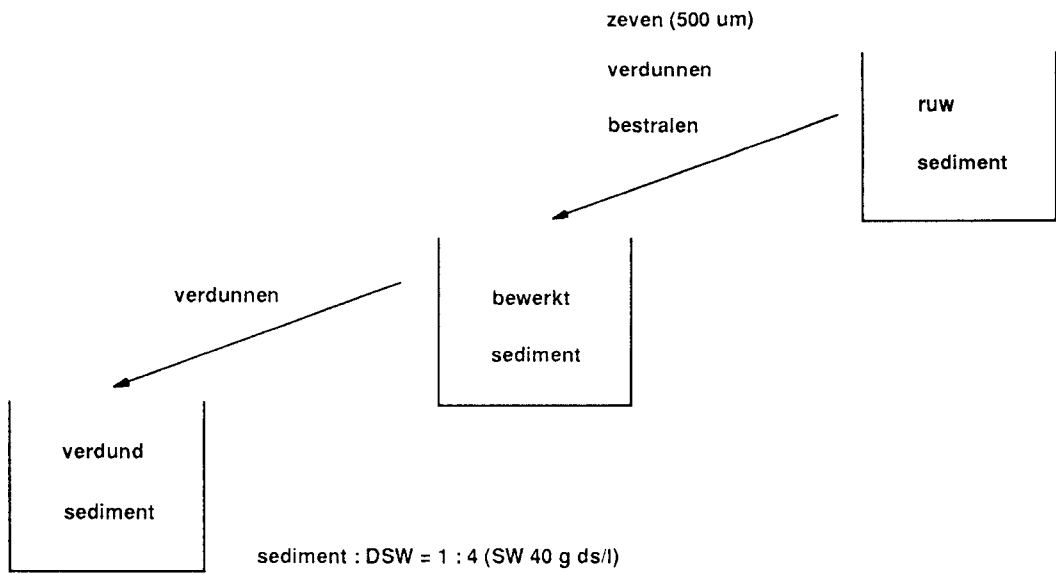
---- = niet vast te stellen/vastgesteld uit betreffende toets

* P < 0,05; ** P < 0,01

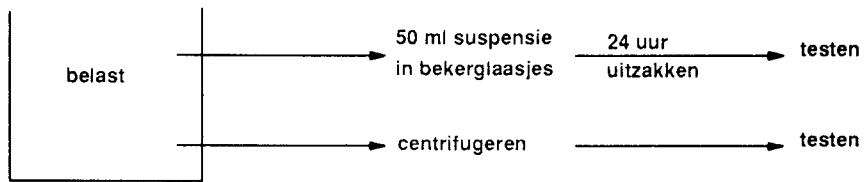
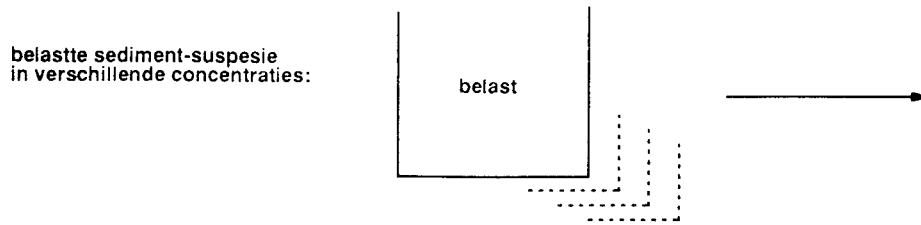
concentratie	pH						zuurstofgehalte in mg/l					
	0 uur		72 uur		96 uur		0 uur		72 uur		96 uur	
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
controle	8,07	8,27	7,96	8,31	7,99	8,40	7,4	8,9	2,1	8,1	5,0	8,4
0,0	8,14	8,26	7,97	8,29	8,04	8,36	8,2	9,4	3,0	7,9	4,9	9,1
0,32	8,10	8,23	7,86	8,26	8,02	8,32	8,2	9,7	2,5	7,6	5,3	8,1
0,56	8,13	8,20	8,22	8,29	8,31	8,32	8,2	8,7	5,6	7,7	7,9	8,0
DSW-controïe	8,35	8,49	8,10	8,45	8,06	8,46	8,4	9,8	7,2	9,1	8,2	9,2

Tabel 7: Gemeten minimum- en maximum-waarden van nitriet (in mg N-NO₂/l), nitraat (in mg N-NO₃/l), ammonium (in mg N-NH₄/l) en chloride (in mg Cl/l) in de beide systemen van de langdurende toxiciteits-experimenten met sediment. Tevens is de berekende ammoniak-concentratie vermeld (in mg NH₃/l).

systeem	minimum t=0 uur	maximum t=0 uur	minimum t=96 uur	maximum t=96 uur
sediment/water				
- nitriet	< 0,001	0,015	< 0,001	0,013
- nitraat	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
- ammonium	18,0	39,1	14,8	23,5
* ammoniak	0,33	1,56	0,29	0,89
- chloride	88,6	102,8	92,2	103,2
poriewater				
- nitriet	< 0,001	0,009	0,007	0,048
- nitraat	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,07
- ammonium	14,1	30,1	15,1	18,0
* ammoniak	0,48	3,28	0,36	2,41
- chloride	90,8	99,3	95,4	104,6



Figuur 1: Schematische weergave van de bereiding van de twee systemen in de langdurende experimenten met sediment.



vervolg Figuur 1

Samenstelling van Dutch Standard Water (DSW)

Aan gedemineraliseerd water (Elgastat-patroon) worden zouten toegevoegd waarbij de volgende concentraties van ionen ontstaan.

Ca 2+	54,5 mg/l	1,36 mmol/l
Mg 2+	17,8 mg/l	0,73 mmol/l
Na +	27,4 mg/l	1,19 mmol/l
K +	7,8 mg/l	0,20 mmol/l
Cl -	96,3 mg/l	2,72 mmol/l
HCO ₃ -	84,8 mg/l	1,39 mmol/l
SO ₄ 2-	70,2 mg/l	0,73 mmol/l

hardheid 11,7 DH, overeenkomend met 210 mg/l CaCO₃
pH 8,2 +/- 0,2

DSW-L is DSW waarbij de zouten zijn toegevoegd aan Lindschoter grondwater.

RIVM-vijverwater

De vijver van het RIVM heeft een inhoud van ca. 1000 m³ en wordt gevoed door regenwater. Na bemonstering wordt dit water gefiltreerd over een 0,45 µm-filter. Vervolgens wordt aan het zachte water een hoeveelheid zouten toegevoegd zoals gebruikelijk is bij DSW-bereiding. De hardheid van het water varieert als gevolg daarvan van 13 tot 15 °DH, overeenkomend met 233 - 269 mg/l als CaCO₃. Na verrijken wordt het vijverwater belucht totdat de pH stabiel is. Het water is dan gereed voor gebruik. Na maximaal 1 maand wordt nieuw medium bereid. Tijdens de bewaarperiode wordt het water continu belucht.

Mengsel DSW en RIVM-vijverwater

De hardheid van een mengsel van 70% DSW en 30% aangehard vijverwater varieert van 13 tot 15 DH, overeenkomend met 233 - 269 mg/l als CaCO₃. De pH van dit mengsel is meestal enkele tienden van een eenheid hoger dan die van DSW.

Karakteristieken van het Schoonrewoerdse Wiel-sediment

Bemonsteringsdatum sediment ten behoeve van analyses: 07.11.89

Behandeling sediment: verdunning met DSW-L (zie bijlage 1) volgens sed/DSW-L = 2:1 v/v, zeven over 500 µm r.v.s. zeef, bestralen met 10 kGy.

Analyses uitgevoerd door RIZA.

organisch C-gehalte	9,4 %
anorganisch C-gehalte	5,0 %
korrelgrootte, KGF < 63 µm	16,6 %
< 50 µm	15,4 %
< 16 µm	8,2 %
< 10 µm	5,8 %
< 02 µm	1,4 %

zware metalen	gehalte in mg/kg ds
As	8,8
Cd	2,0
Cr	24
Cu	30
Fe	34600
Hg	0,2
Mn	1450
Ni	15
Pb	70
Zn	204

PAKs	gehalte in mg/kg ds
BaP	0,1
BbF	0,1
BghiPe	0,1
BkF	< 0,1
Flu	0,2
Inp	0,1
