

Rapport nr. : CL 81/100b
RIVM 668114 003
Datum : 84-09-05
Opdracht nr.: 30113

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



postbus 217
2600 AE delft

bezoekadres
schoemakerstraat 97

telex 38071 zptno
telefoon 015 - 56 93 30

Bijlage 2:

Onderzoek naar de bruikbaarheid van
Lemna minor (eendekroos) voor routine
toxiciteitsonderzoek en vergelijking
van deze waterplant met eencellige
groenalgen

Auteurs :

Mw. D.M.M. Adema (MT-TNO)
Drs. D. de Zwart (RIVM)

Het onderzoek is uitgevoerd in opdracht
van Het ministerie van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer

„Niets uit deze uitgave mag worden
vermenigvuldigd en/of openbaar
gemaakt door middel van druk, foto-
copie, microfilm of op welke andere
wijze dan ook, zonder voorafgaande
toestemming van TNO.”

Indien dit rapport in opdracht werd
uitgebracht, wordt voor de rechten
en verplichtingen van opdracht-
gever en opdrachtnemer verwezen
naar de „Algemene Voorwaarden
voor Onderzoeks- en Ontwikke-
lingsopdrachten aan TNO, 1979”
dan wel de desbetreffende terzake
tussen partijen gesloten overeen-
komst.

Verzendlijst

Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer

1. Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne
2. Plv. Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne, tevens de Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid, belast met het toezicht op de hygiëne van het milieu
3. Hoofd van de afdeling Algemene Coördinatie
4. Directeur van de afdeling Bodem, Water, Stoffen, Dr. J.H. Dewaide
5. Dr. J.G. Wessels Boer, Hafd. Stoffen
6. Dr. C.L.C. Meyer, Hafd. Water
7. Dr. W.H. Könemann, Hafd. Stoffen
8. Drs. C.Y.I. Bootsma, Hafd. Water
- 9 - 23. Reserve-exemplaren Min. VROM

Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne

24. Directie
25. Drs. G.J. van Esch
26. Dr. H.A.M. De Kruijf
27. Dr. W. Slooff
28. Drs. R.C.C. Wegman
29. Drs. D. de Zwart
30. Drs. J.H. Canton
31. Mw. E.A.M. Mathijssen-Spiekman
32. Dhr. G.J. Piet
33. Projecten- en Rapportenregistratie R.I.V.M. Bilthoven
34. Administratie R.I.V.M. Bilthoven
- 35 - 49. Administratie ECOWAD R.I.V.M. Leidschendam
50. Archief R.I.V.M. Leidschendam
- 51 - 65. Reserve-exemplaren R.I.V.M. Bilthoven

Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie TNO

- 66. Directie
- 67. Drs. J.S.A. Langerwerf
- 68. Dr. C.J. Pries
- 69. Ir. G.J. Vink
- 70. Drs. W.Chr. de Kock
- 71. Ir. J.F. de Kreuk
- 72. Mw. D.M.M. Adema
- 73. Drs. A.O. Hanstveit
- 74. Dr. S.A.L.M. Kooijman
- 75. Mw. G.H. Bakker
- 76. Mw. J. Kauffman
- 77. Hr. L. Henzen
- 78. Hr. H. Oldersma
- 79 - 83. Archief
- 84 - 98. Reserve-exemplaren TNO

INHOUD

	Blz.
SAMENVATTING	3
1. INLEIDING	4
2. MATERIALEN EN METHODEN	5
2.1 Modelstoffen	5
2.2 Organisme	5
2.3 Methode	5
2.4 Verwerking van de gegevens	6
3. RESULTATEN	8
4. DISCUSSIE	14
5. CONCLUSIES	15
6. REFERENTIES	15
Appendix 1	

SAMENVATTING

Als aanvulling op het project "Onderzoek naar een geschikte combinatie toetsmethoden ter bepaling van de aquatische toxiciteit van milieugevaarlijke stoffen" werd vergelijkend onderzoek verricht naar de bruikbaarheid en gevoeligheid van eendekroos (*Lemna minor*) als toetsorganisme.

Deze waterplant bleek goed bruikbaar als proefplant: de toetsen zijn met eenvoudige middelen en binnen twee weken uit te voeren.

De gevoeligheid van *L. minor* voor 6 "non regulated" chemicaliën was vergelijkbaar met die van eencellige groenalgen.

Ten opzichte van het "standaardpakket", "alg - crustacee - vis", verschaften de toetsen met *L. minor* géén extra informatie.

1. INLEIDING

In de jaren 1979 t/m 1981 werd door MT-TNO en de toenmalige instituten RIV en RID onderzoek uitgevoerd naar een geschikte combinatie toetsmethoden ter bepaling van de aquatische toxiciteit van milieugevaarlijke stoffen. Over dit project is een verslag onder dezelfde naam verschenen (Adema et al., 1981).

Bij dit onderzoek werden zes soorten eencellige algen, de crustacee *Daphnia magna* en drie soorten vis gebruikt. In de daarop volgende jaren werd het onderzoek uitgebreid met een aantal andere organismen waaronder één hogere waterplant: eendekroos (*Lemna minor*).

De resultaten verkregen met *L. minor* worden weergegeven in dit verslag, dat als aanvulling moet worden gezien op bovengenoemd onderzoek.

Voor de doelstelling van het totale onderzoek wordt verwezen naar Adema et al. Om de mate van reproduceerbaarheid ook bij dit onderzoek te betrekken, werden de toetsen zowel bij het RID (nu RIVM) als bij TNO uitgevoerd.

2. MATERIALEN EN METHODEN

2.1 MODELSTOFFEN

In principe werden dezelfde modelstoffen gekozen als voor het eerste onderzoek. De keuze hiervan is toegelicht in Adema et al. Daar bij het eerste onderzoek was gebleken, dat de slecht in water oplosbare stoffen di(2-ethylhexyl)-ftalaat en tricresylfosfaat, tot en met een concentratie welke gelijk is aan de oplosbaarheid in water, niet toxisch waren voor de eencellige algen, werd besloten deze twee stoffen niet te betrekken bij het onderzoek met L.minor.

De onderzochte stoffen waren derhalve:

Kaliumbichromaat ($K_2Cr_2O_7$); diisopropylamine (DIPA); 2,4-dinitrotolueen (2,4-DNT); 2,6-dimethylquinoline (2,6-DMQ); 2,4-dichlooraniline (2,4-DCA) en tetrapropyleenbenzeensulfonaat (TPBS). Voor verdere bijzonderheden zie referentie 1.

2.2 ORGANISME

Om de resultaten verkregen met de eencellige, autotrofe organismen, de groenalgen, te kunnen vergelijken met die verkregen met een hogere plantensoort, werd Lemna minor als proefplant gekozen.

Gebruikt werd de stam M 19, afkomstig van de collectie van het Hugo de Vries - Laboratorium te Amsterdam.

Deze stam was op het RID reeds in gebruik bij aquatisch toxicologisch onderzoek.

2.3 METHODE

Daar er voor toetsen met L.minor geen gestandaardiseerde methoden zijn beschreven, werden de toetsen uitgevoerd zoals dit gebruikelijk was op het RID:

Erlenmeyers van 300 ml werden gevuld met een bepaalde hoeveelheid gesteriliseerd en afgekoeld medium, bereid volgens Appendix 1. Er werd zoveel ml van een geconcentreerde oplossing van de toetsverbinding in medium toegevoegd dat de gewenste concentraties werden bereikt bij een eindvolume van

200 ml. De erlenmeyers werden geënt met elk drie Lemna-blaadjes, afkomstig van een twee-weken oude voorcultuur en geplaatst bij 25 ± 2 °C en een belichting van 35 watt/m² met TL buizen type 57 RS de luxe. De proeven werden in duplo uitgevoerd.

Elke dag werden de blaadjes geteld en zo mogelijk op kleur en uiterlijk beoordeeld. Zodra er circa 75 blaadjes per erlenmeyer aanwezig waren werd de proef gestopt, doch niet eerder dan na 7 dagen en niet later dan na 10 dagen. De dosering van de toetsverbinding was dus eenmalig. De gehalten aan toetsverbinding zijn voor de meeste stoffen bij het begin en bij het einde van de proef bepaald in twee concentraties. Na enkele "range-finding"-toetsen werden, afhankelijk van de steilheid van de concentratie-effect relatie, minimaal vijf en maximaal negen concentraties per stof getoetst, welke een factor 1,8 of 3,2 verschilden.

De visuele waarnemingen van kleur en grootte van de blaadjes bij het einde van de proef werden uitsluitend bij MT-TNO gedaan door vijf waarnemers die onbekend waren met de concentratie toetsverbinding, waarna het oordeel van de meerderheid is weergegeven in tabel 1.

2.4 VERWERKING VAN DE GEGEVENS

Het effect van de stoffen op de groei van L.minor wordt weergegeven als EC50- en NOEC-waarden.

De EC50-waarde is hier die concentratie van de toetsverbinding, waarbij de groeisnelheid van L.minor de helft is van die in de culturen waaraan geen toetsverbinding is toegevoegd; deze EC50-waarde is dan onafhankelijk van de blootstellingstijd. De EC50-waarden werden berekend m.b.v. een parametrisch model dat werd ontwikkeld bij TNO (Kooijman et al., 1983).

Aannamen in dit model zijn:

1. Het aantal blaadjes in de cultuur neemt exponentieel toe.
2. De groeisnelheid vermindert volgens een logistische functie van de logaritme van de concentratie van de toetsverbinding.

De parameters van dit model werden uit de waarnemingen geschat op grond van een kleinste-kwadraten aanpassing van het model aan de niet getransformeerde waarnemingen.

De NOEC-waarde ("no observed effect concentration") is de hoogste getoetste concentratie waarvan ten opzichte van de blanco geen afwijkingen zijn waargenomen wat betreft tevoren vastgestelde criteria. Het is vanzelfsprekend een tamelijk subjectieve parameter voor het gebruik waarvan goede onderlinge afspraken moeten worden gemaakt.

Beoordeeld werden bij TNO het aantal Lemna-blaadjes (geschat en geteld) en hun grootte en kleur (zie ook § 2.3).

Bij RID werd alleen het getelde aantal Lemna-blaadjes beoordeeld op "afwijken" van dat in de controle.

Onder "afwijkend" werd voor het getelde aantal verstaan minder dan 80 % van het aantal in de controle.

3. RESULTATEN

De resultaten worden weergegeven in de tabellen 1 t/m 4.

Tabel 1 bevat in detail de resultaten behaald bij TNO en tabel 2 die bij RID. In tabel 3 worden de resultaten behaald bij TNO en RID vergeleken en in tabel 4 worden de resultaten vergeleken met die van de eencellige groenalgen behorende tot het eerste deel van dit project (Adema et al., 1981), nl. *Scenedesmus pannonicus*, *Chlorella pyrenoidosa* en *Selenastrum capricornutum*.

Twee voorbeelden van groeikrommen van *L.minor* worden gegeven in de figuren 1 en 2.

De geanalyseerde gehalten aan toetsverbinding waren zowel bij RID als bij TNO in redelijke overeenstemming met de gedoseerde hoeveelheden. Bij het einde van de proef was nog minstens 60 % van het uitgangshehalte aanwezig.

De, bij TNO geschatte, grootte van de blaadjes bij het einde van de proef bleek geen betrouwbaar criterium: verschillende waarnemers oordeelden geheel verschillend en ook bleek er niet altijd per waarnemer een concentratie-effect relatie te zijn. Dit criterium is daarom niet gebruikt bij de bepaling van de NOEC-waarden (tabel 1).

Table 1 Results of the tests carried out at TNO with Lemna minor, expressed as EC50 values (mg.l^{-1}) and NOEC values (mg.l^{-1}) for several criteria

compound	EC50, growth (confidence interval)	NOEC			
		number of leaves (estimated)	number of leaves (counted)	colour of leaves	lowest of NOEC's
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ¹⁾	7.2 (5.0-10.3)		0.032	< 0.032	≤ 0.032
	0.45 (0.3-0.6)	< 0.032	< 0.032	< 0.032	
DIPA	200 (120-330)	100	100	100	100
2,4-DNT	2.2 (1.7-2.8)	0.32	0.32	0.32	0.32
2,6-DMQ	16 (14 - 18)	5.6	5.6	abt.10	5.6
2,4-DCA ¹⁾	7.8 (6.0-9.0)				
	9.1 (7.9-10.4)	1.8-1.0	1.8	1.0	1.0
	15 (13 - 18)				
TPBS	21 (18 - 24)	5.6	5.6	5.6	5.6

1) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ was tested twice and 2,4-DCA three times.

In Tables 3 and 4 the average values are given for these compounds.

Conclusie bij tabel 1.

Er waren bijna geen verschillen tussen de NOEC-waarde, indien het aantal blaadjes visueel werd geschat en wanneer het aantal nauwkeurig werd geteld. Bij die concentratie waarbij het aantal blaadjes gelijk was aan dat in de controle, was de kleur van de blaadjes meestal gelijk aan die van de blaadjes in de controle. De NOEC bepaald aan het getelde aantal blaadjes bleek dus als enige criterium voldoende gevoelig om de proefresultaten weer te geven. Bovendien is dit het minst subjectieve criterium. In de tabellen 3 en 4 werd daarom uitsluitend de NOEC voor het getelde aantal blaadjes vermeld.

Table 2 Results of the tests carried out at RID with Lemna minor, expressed as EC50 values (mg.l^{-1}) and NOEC values (mg.l^{-1})

compound	EC50, growth (conf.interval)	NOEC number of leaves (counted)
$\text{K}_2\text{CR}_2\text{O}_7$	4.4 (2.6 - 7.4)	0.032
DIPA	72 ¹⁾ (64 - 81)	18 ¹⁾
2,4-DNT	1.6 (1.4 - 1.8)	0.32
2,6-DMQ	28 (25 - 32)	10
2,4-DCA	25 (21 - 30)	< 1.8
TPBS	18	10

1) pH of test solutions not adjusted to that of the blank medium.

Table 3 Comparison, between TNO and RID, of results with Lemna minor (mg.l⁻¹)

compound	EC50		NOEC (number of leaves)	
	RID	TNO	RID	TNO
K ₂ Cr ₂ O ₇	4.4	3.8	0.032	0.032
DIPA	72 ¹⁾	200 ²⁾	18 ¹⁾	100 ²⁾
2,4-DNT	1.6	2.2	0.32	0.32
2,6-DMQ	28	16	10	5.6
2,4-DCA	25	10	< 1.8	1.0
TPBS	18	21	10	5.6

- 1) pH of test solutions not adjusted to that of the blank medium.
- 2) pH of test solutions adjusted to that of the blank medium (= about 8).

Table 4 Comparison of EC50 values and NOEC values ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of Lemna minor and three different green algal species

compound	EC50					NOEC				
	L.minor		S.pann	C.pyr	S.capri	L.minor		S.pann	C.pyr	S.capri
	TNO	RID				TNO	RID			
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	3.8	4.4	2.6	2.0	5.1	0.032	0.032	0.32	0.18	0.56
DIPA	200	-	190	360		100		100	56	
2,4-DNT	2.2	1.6	2.3	3.8	1.6	0.32	0.32	0.32	0.56	0.56
2,6-DMQ	16	28	25	19	17	5.6	10	3.2	1.8	
2,4-DCA	10	25	11	14	abt.9	1.0	< 1.8	1.0	1.8	
TPBS	21	18	42	19	113	5.6	10	10	5.6	

Fig. 1 Groeikrommen van Lemna minor onder invloed van verschillende concentraties TPBS

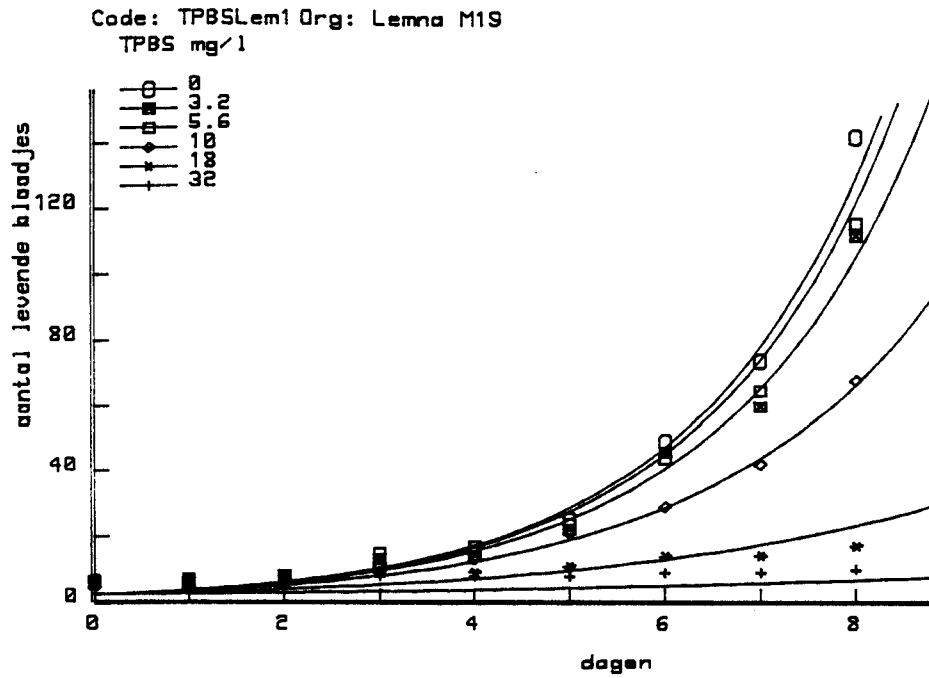
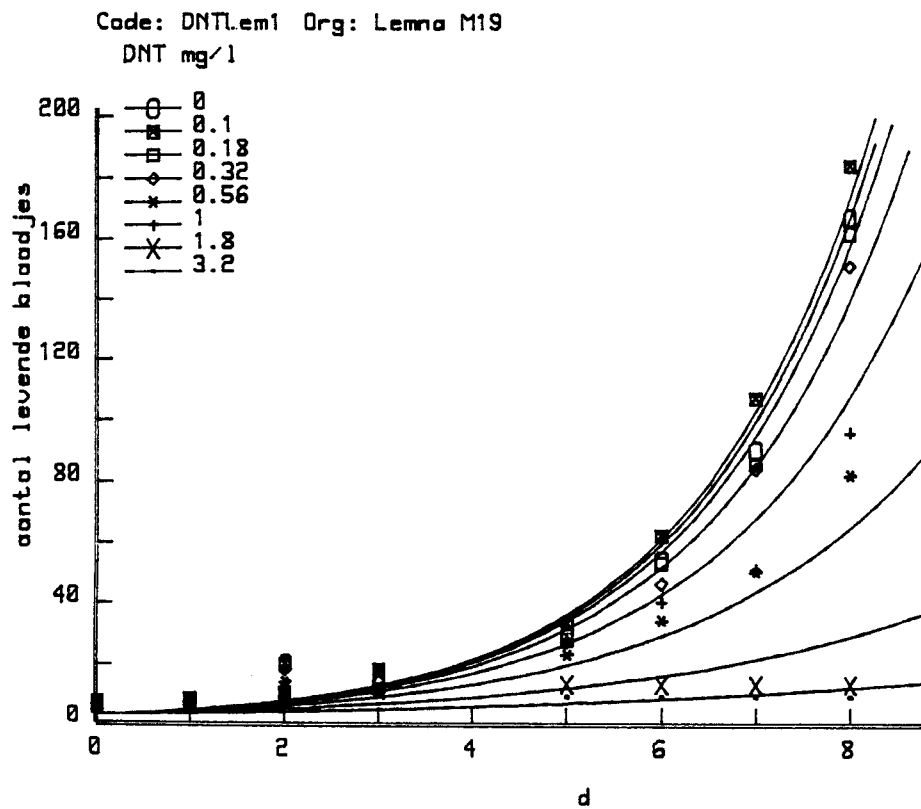


Fig. 2 Groeikrommen van Lemna minor onder invloed van verschillende concentraties 2,4-DNT



4. DISCUSSIE

- Het concentratie interval van $K_2Cr_2O_7$ waarbij een gedeeltelijk effect optrad, strekte zich over een groot gebied uit (tenminste van 0,1 t/m 32 mg.l^{-1}). Ook werden effecten op de groei bij steeds lagere concentraties zichtbaar naarmate de proefduur langer werd. Bovendien volgde de concentratie-effect relatie géén sigmoïde curve.

Hierdoor kunnen grote verschillen in EC50- en NOEC-waarden worden gevonden uit meerdere proeven.

(De aannamen, gesteld in § 2.4, passen niet op het verloop van de proef).

- Diisopropylamine is een basische verbinding waarvan de dissociatiegraad en daarmee de toxiciteit afhankelijk is van de pH van het medium.

De pH van de toetsoplossingen werd bij TNO wél en bij RID niét gebracht op die van blanco medium, waardoor vermoedelijk de EC50- en NOEC-waarden bij RID lager uitkwamen dan bij TNO.

5. CONCLUSIES

1. Lemna minor is een bruikbaar organisme voor te standaardiseren toxiciteitstoetsen.
2. De toetsen zijn in principe goed reproduceerbaar.
3. Voor de meeste toetsverbindingen was de gevoeligheid van Lemna minor gelijk aan die van eencellige groenalgen.

6. REFERENTIES

- 1) Adema, D.M.M., J.H. Canton, W. Slooff en A.O. Hanstveit (1981).
Onderzoek naar een geschikte combinatie toetsmethoden ter bepaling van de aquatische toxiciteit van milieugevaarlijke stoffen.
Rapport nr. CL 81/100, RIV 627905 001, RID CBH 81/11.
- 2) Kooijman, S.A.L.M., A.O. Hanstveit and H. Oldersma (1983).
Parametric analyses of population growth in bio-assays.
Water Res. 17, pp. 527-538.

APPENDIX 1 Medium voor toetsen met Lemna minorGeconcentreerde voorraadoplossingen (gram per liter)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	27,6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	19,8
NaHCO_3	20,7
NaCl	11,1
KNO_3	3,0
NH_4Cl	1,6
K_2HPO_4	1,5

Sporenelementoplossing (mg per liter)

H_3BO_3	572
$\text{Co}(\text{NO}_2)_3$	16
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	16
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	596
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	80
$\text{VOSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	4
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,6

Breng deze oplossing op pH 8,0

Fe-EDTA-oplossing (mg per liter)

FeCl_3	560
Na_2EDTA	800

Breng deze oplossing op 8,0 pH

Bereiding van het medium:

Voeg toe per liter gedestilleerd water:

10 ml van elke geconcentreerde voorraadoplossing

5 ml van de FeEDTA-oplossing

5 ml van de sporenelementoplossing

Steriliseer vervolgens bij 120 °C gedurende 20 minuten.

De pH van het medium is dan $8,0 \pm 0,2$.