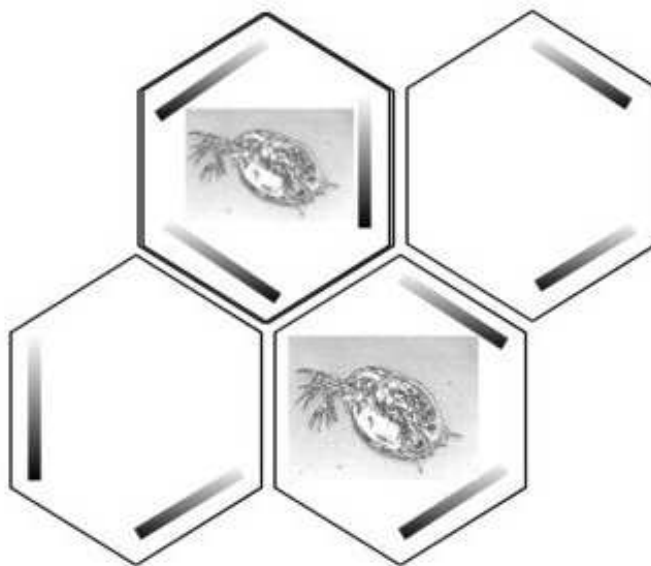




Toxiciteit van pyreen voor *Daphnia magna*

acute en chronische testen met *Daphnia magna*





Toxiciteit van pyreen voor *Daphnia magna*

acute en chronische testen met *Daphnia magna*

12 augustus 2002

Auteur: M.A.A.J. Kamps-Mulder
Afdeling: WSC
RIZA Werkdocumentnr.: 2002.134X

Samenvatting

In dit rapport worden de resultaten weergegeven van acute en chronische testen met de watervlo *Daphnia magna* blootgesteld aan een concentratie reeks van pyreen.

De toxiciteitstesten zijn uitgevoerd volgens de OECD 202 en 211 richtlijnen. Voor het berekenen van de concentratie waarbij 50% van de testorganismen sterft wordt gebruikt gemaakt van een LC50-computerprogramma van het RIZA (1996). De waarden waarbij wel en geen significant verschil ten opzichte van de controles zijn gevonden, zijn bepaald met het statistische programma Toxstat (Gulley, 1990).

Voor het bepalen van de werkelijke blootstellingconcentraties zijn tijdens het inzetten van de acute test met *Daphnia magna* ook monsters genomen om het pyreen gehalten te meten. Gedurende de chronische test met *Daphnia magna* zijn tijdens het inzetten en het verversen van de test monsters genomen waarvan het pyreen gehalten werd bepaald. In dit geval kon er een afbraaksnelheid worden bepaald van 12,5% in twee dagen tijd.

Uit de resultaten van de testen, uitgevoerd met de watervlo *Daphnia magna*, zijn de volgende chronische en acute waarden voor pyreen afgeleid.

Tabel 0: Overzicht van de acute en chronische gemeten toxiciteitwaarden van pyreen voor *Daphnia magna*.

Blootstelling	parameter	waarde	Eenheid
acuut	LC50	265.5	µg/l
acuut	NOEC	62.5	µg/l
chronisch	LC50	7.2	µg/l
chronisch	LOECsterfte/ reproductie	5.0	µg/l
chronisch	NOECsterfte/reproductie	1.6	µg/l

Inhoudsopgave

1	Inleiding	5
2	Materiaal en Methode	6
2.1	Test organismen	6
2.2	Acute test met <i>Daphnia magna</i>	6
2.3	Chronische test met <i>Daphnia magna</i>	6
2.4	Gebruikte stoffen en chemische analyses	7
2.5	Gebruikte statistiek	7
3	Resultaten	8
3.1	Chemische analyses	8
3.2	Acute en chronische testen met <i>Daphnia magna</i>	9
4	Discussie en Conclusie	11
5	Referenties	12

1 Inleiding

Voor het vaststellen van effecten door verontreinigingen op organismen en populaties in het veld is het nodig om de toxiciteit van afzonderlijke stoffen op verschillende organismen te kennen.

In dit rapport worden acute en chronische test resultaten weergegeven van *Daphnia magna* blootgesteld aan pyreen. Pyreen behoort tot de groep polycyclische aromatische koolwaterstof verbindingen die samengesteld zijn uit twee of meer aromatische (benzeen-)ringen. Er bestaat een groot aantal verschillende PAK-verbindingen, waarvan de wateroplosbaarheid varieert van ongeveer 20 mg/l (naftaleen) tot 0,5 µg/l (peryleen). Polycyclische aromatische koolwaterstoffen en PAK-verbindingen komen veel voor in fossiele brandstoffen, met name olie en steenkool. Lozing van aardolie uit schepen en olieverwerkende offshore-industrie vormt een belangrijke directe bron van PAK in het milieu. Een andere, hoewel lokale, directe bron van PAK in het aquatische milieu wordt gevormd door met carbolineum behandelde palen in het water. Deze toepassing is sinds enkele jaren verboden. Indirect worden ook PAK in het milieu geloosd, met name bij onvolledige verbranding van organisch materiaal. Hoewel er veel bekend is van de structuur en eigenschappen van polycyclische aromatische koolwaterstoffen is er over de toxiciteit voor waterdieren weinig bekend. Wel is bekend dat watervlooiën in grote mate PAK kunnen ophopen (Southworth *et al*, 1978). Door het uitvoeren van acute en chronische toxiciteitstesten wordt er geprobeerd inzicht te verkrijgen bij welke concentraties er effect op overleving en/of reproductie optreedt bij de watervlo *Daphnia magna*.

2 Materiaal en Methode

2.1 Test organismen

Daphnia magna is een veel gebruikt testorganismen in de aquatische ecotoxicologie, omdat het dier veel voorkomt in zoete waterren, een groot verspreidingsgebied heeft en gevoelig is gebleken voor toxische stoffen. In de afgelopen decennia is er veel onderzoek gedaan aan het optimaliseren van het kweken van watervlooien, zodat er nu standaard protocollen voor zijn.

De gebruikte watervlooien zijn afkomstig van de gestandaardiseerde kweek van het RIZA, gekweekt volgens protocol AOCE / 02.

2.2 Acute test met *Daphnia magna*

De acute test met *Daphnia magna* is uitgevoerd volgens OECD richtlijn 202 part I. Per concentratie zijn 25 watervlooien jonger dan 24 uur voor 48 uur blootgesteld aan ½ liter oplossing. Dagelijks is er gekeken naar overleving en immobiliteit. Aan het begin en aan het eind van de test zijn verschillende randvoorwaarden gemeten. De test is met twee verschillende concentratiereeksen uitgevoerd nl. 0, 0.56, 1, 3.2, 5.6, 10 100 en 1000 µg/l en 0 10, 32, 56, 100, 320, 560 en 1000 µg/l.

De testen worden in duplo uitgevoerd en tijdens de test is niet gevoerd. Na afloop van de test wordt de LC50, 48 uur van pyreen voor *Daphnia magna* en de 95 % betrouwbaarheidsintervallen bepaald.

2.3 Chronische test met *Daphnia magna*

De chronische test met *Daphnia magna* is uitgevoerd volgens OECD richtlijn 211. Per concentratie (0, 3.2, 10, 32, 56 en 100 µg/l) worden 10 watervlooien jonger dan 24 uur gedurende 21 dagen individueel blootgesteld. Dagelijks worden de watervlooien bekeken, geteld en gevoerd met $1,75 \cdot 10^7$ cellen algen (*Chlorella pyrenoidosa*) per watervlo, wat overeen komt met 0.1 tot 0.2 mg/l C. Tweemaal per week worden de oplossingen ververs, waarbij van de oude en de nieuwe concentratie de randvoorwaarden worden gemeten. Na afloop van de test wordt de chronische LC50, 21 dagen, NOECsterfte en NOECreproductie van pyreen bepaald. De reproductiewaarden wordt berekend met behulp van een iteratief programma waarbij gebruikt wordt gemaakt van de formule van Lotka (v. Leeuwen et al., 1985):

$$\sum L_x \cdot M_x \cdot e^{-rxm} = 1$$

Waarbij Lx de fractie is van het aantal overlevende vrouwtjes per concentratie, en Mx het aantal gereproduceerde jongen per overlevende vrouwtje op tijdstip x.

2.4 Gebruikte stoffen en chemische analyses

Pyreen (cas. Nr. 129-00-0; syn. Benzo(*def*)phenanthreen; MF: C₁₆H₁₀) heeft een molecuul gewicht van 202,26 en oplosbaarheid in water bij 25 °C is 1,35 mg/l (Miller, *et al*, 1985). Er is gebruik gemaakt van een stockoplossing met 5,04 mg pyreen in 1 ml. methanol. Chemische analyses zijn uitgevoerd door de afdeling IMLC van het RIZA, volgens methode B355. Voor het bepalen van de gehalten aan pyreen in de oplossingen zijn aan het begin van de test uitvoer en aan het einde van de test de concentraties doorgemeten.

2.5 Gebruikte statistiek

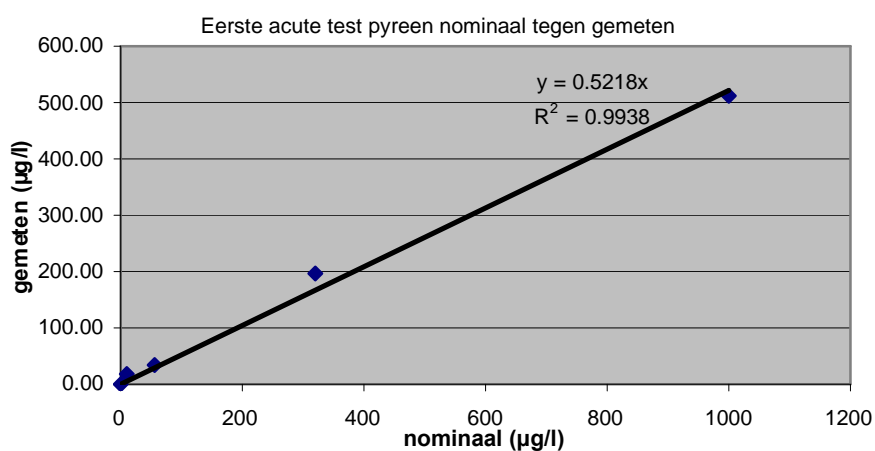
Voor het berekenen van de LC50 is gebruikt gemaakt van een computerprogramma van het RIZA, 1995. In dit programma wordt de Lethal Concentration geschat volgens de "maximum likelihood" methode met gebruikmaking van een iteratieve benaderingswijze (Kooijman, 1981). Als beginschatters voor deze benadering worden de parameterschattingen volgens Spearman-Kärber methoden (Hamilton *et al.*, 1977) gebruikt.

De No Observed Effect Concentration (NOEC) voor sterfte wordt bepaald door de hoogste concentratie waarin ≤ 20 % sterfte optreedt. De LOEC (Lowest Observed Effect concentration)/NOEC-waarden voor reproductie wordt bepaald met de toets van Williams (1971, 1972). Hiervoor wordt het statistische programma TOXSTAT (versie 3.2; Gulley *et al.*, 1991) gebruikt.

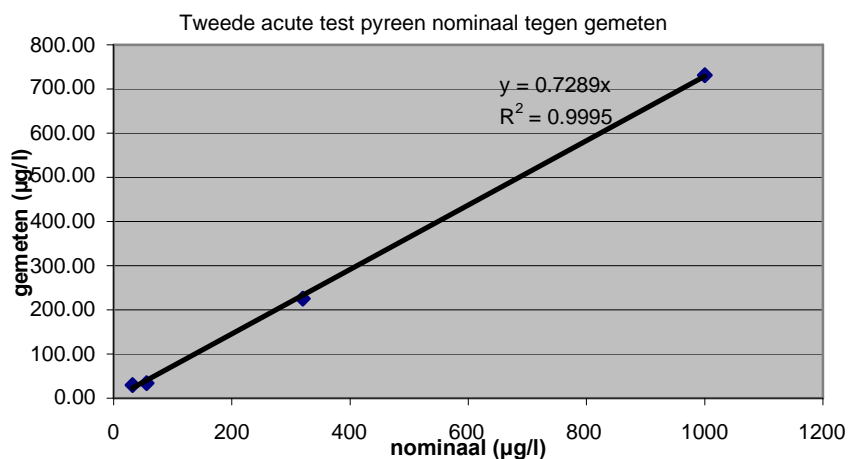
3 Resultaten

3.1 Chemische analyses

Van de acute testen zijn per test een aantal concentraties geanalyseerd om het werkelijke pyreen gehalten bepalen. In bijlage 2 staan alle afzonderlijke resultaten weergegeven. In figuur 1 en 2 zijn de gemeten concentraties van de acute Daphnia testen uitgezet tegen de nominale concentraties.

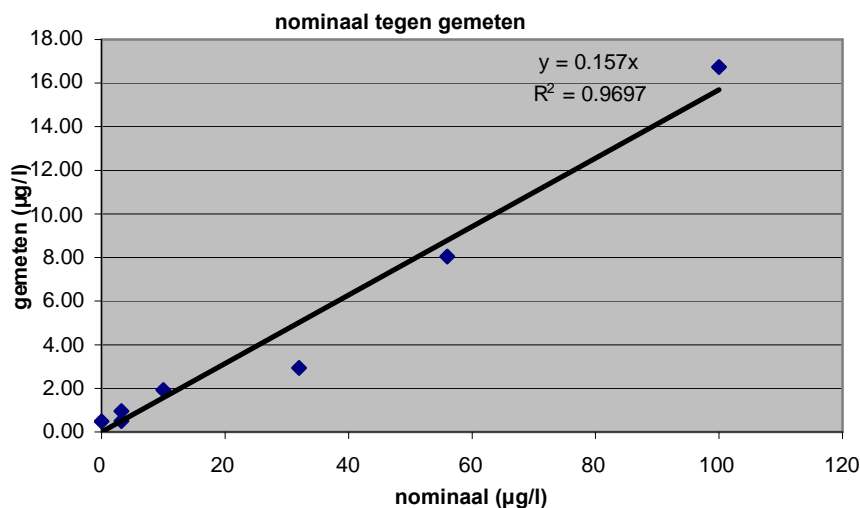


Figuur 1: Gemeten gehalten uitgezet tegen nominale gehalten van pyreen van de eerste acute test met *Daphnia magna*.



Figuur 2: Gemeten gehalten uitgezet tegen nominale gehalten van pyreen van de tweede acute test met *Daphnia magna*.

Van de chronische Daphnia test zijn van een aantal concentraties voor de test en na de test de gehalten aan pyreen gemeten om eventuele afbraak van pyreen te kunnen bepalen. In bijlage 2 staan alle afzonderlijke meetgegevens weergegeven. In figuur 3 zijn de gemeten gehalten van de chronische test van voor en na de test samengevoegd.



Figuur 3: Gemeten gehalten uitgezet tegen nominale gehalten van pyreen van de chronische acute test met *Daphnia magna*.

3.2 Acute en chronische testen met *Daphnia magna*

Voor een goede test uitvoer werd aan alle randvoorwaarden voldaan. De gegevens zijn vermeld in bijlage 3 (acute test resultaten) en bijlage 4 (chronische test resultaten). De nominaal berekende LC50 waarden zijn ook weergegeven in bijlage 3 en 4. De werkelijke LC50, _{48 uur} waarden voor pyreen zijn per test berekend door de nominale LC50 in de afgeleide vergelijking (zie figuur 1 en 2) in te vullen.

Overzicht van de LC50 waarden (in µg/l) na 48 uur blootstelling van de twee acute Daphnia testen.

test	Vergelijking	LC50 _{48 uur} nominaal	LC50 _{48 uur} berekend
1 ^{ste}	Y = 0.5218X	536 (314 – 913)	280 (164-476)
2 ^{de}	Y = 0.7289X	345 (293 – 406)	251 (214-296)

De NOEC-waarden (No Observed Effect Concentration) is de hoogste concentratie waarbij nog geen 20% verschil is gevonden met de blanco.

Overzicht van de NOEC-waarden (in µg/l) na 48 uur blootstelling van twee acute Daphnia testen.

test	Vergelijking	NOEC _{48uur} nominaal	NOEC _{48uur} berekend
1 ^{ste}	$Y = 0.5218X$	100	52
2 ^{de}	$Y = 0.7289X$	100	73

Voor het bepalen van de werkelijk LC50, NOEC en LOEC waarden in de chronische test met *Daphnia magna* zijn de analyses van voor en na de test samen genomen. Dit is gedaan om de invloed van eventuele afbraak van pyreen mee te nemen in de test resultaten. Dit levert de volgende vergelijking: $Y = 0.157 X$ (zie figuur 3).

Overzicht van de toxiciteitwaarden van de chronische Daphnia test met pyreen in µg/l na 21 dagen blootstelling.

parameter	nominaal	berekend
LC50	45.8 (41.1-51.0)	7.2 (6.5 – 8.0)
NOECsterfte	10	1.6
LOECsterfte	32	5.0
NOECreproductie	10	1.6
LOECreproductie	32	5.0

4 Discussie en Conclusie

In de chronische test werd een afbraak van 12,5 % (van 1.6 naar 1.4 µg/l) in twee dagen gemeten. De halfwaarden tijd zou dan op acht dagen liggen. Hierbij moet wel vermeld worden dat de testen bij 20 graden celsius worden uitgevoerd en maar 8 uur aan licht zijn blootgesteld.

De halfwaarden tijden vermeld in de literatuur liggen rond de 4,2 dagen, gemeten in de zomer onder zonlicht (Mill, *et al.*, 1985; Zepp, *et al.*, 1979).

Uit de resultaten van de testen, uitgevoerd met *Daphnia magna*, beschreven in deze rapportage kunnen de volgende chronische en acute data voor pyreen worden afgeleid.

Tabel 1: Overzicht van de gemeten toxiciteitwaarden

Blootstelling	parameter	waarde	Eenheid
acuut	LC50	265.5	µg/l
acuut	NOEC	62.5	µg/l
chronisch	LC50	7.2	µg/l
chronisch	LOECsterfte/ reproductie	5.0	µg/l
chronisch	NOECsterfte/reproductie	1.6	µg/l

5 Referenties

- Gulley, D.D., Boelter, A.M. and Bergman, H.L. (1991)
Toxstat, release 3.1. Fish Physiology and Toxicology Laboratory
Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming,
Wyoming, USA.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. and Thurston, R.V. (1977)
Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal
concentration in toxicity bioassays. *Envir. Sci. Technol.*, 11(7): 714-719.
Correction 12(4): 417 (1978).
- Kooijman, S.A.L.M. (1981)
Parameter analyses of mortality rates in bioassays. *Water res.*, 15: 107-
119.
- Lampert, W. (1987)
Feeding and Nutrition in *Daphnia*. R.H. Peters and R. de Bernardi (Eds.)
"Daphnia". *Mem. Ist. Ital. Idrolbiol.*, 45: 143-192.
- Leeuwen, C.J. van, Luttmer, W.J. and Griffioen, P.S. (1985)
The use of cohort and populations in chronic toxicity studies with
Daphnia magna. I. A cadmium example. *Ecotoxicology and
Environmental Safety*, 29: 26-39.
- Miller, M.M, Wasik, S.P., Huang, G., Shui, W. and MacKay, D. (1985)
Relationships between octanol-water partition coefficients and
aqueous solubility. *Environmental Science Technology*, vol. 19: 522-9.
- Mill, T. and Mabey, W. (1985)
Photochemical transformations: Environmental Exposure from
chemicals. Vol. 1. Neely, W.B. and Blau, G.E. Eds. Boca Raton, Fl: CRC
press pp. 175-216.
- OECD 202 (1984)
Daphnia sp., Acute immobilisation test and reproduction test.
- OECD 211 (1998)
Daphnia magna Reproduction test
- RIZA (1996)
LC50-computerprogramma, update Modelco.
- Southworth, G.R., Beauchamp, J.J., and Schmieder, P.K. (1978)
Water Res. 12, pp. 97.

Williams, D.A. (1971)

A test for differences between means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.

Williams, D.A. (1972)

The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 529-531.

Zepp, R.G. and Schlotzhauer, P.F. (1979)

Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: Polynuclear aromatic hydrocarbons. Jones, P.W. and Leber, P. Eds. Iann Arbor, M.I.: Ann Arbor Science Publishers, Inc. pp. 141-58.

Bijlage 1: Info Daphnia



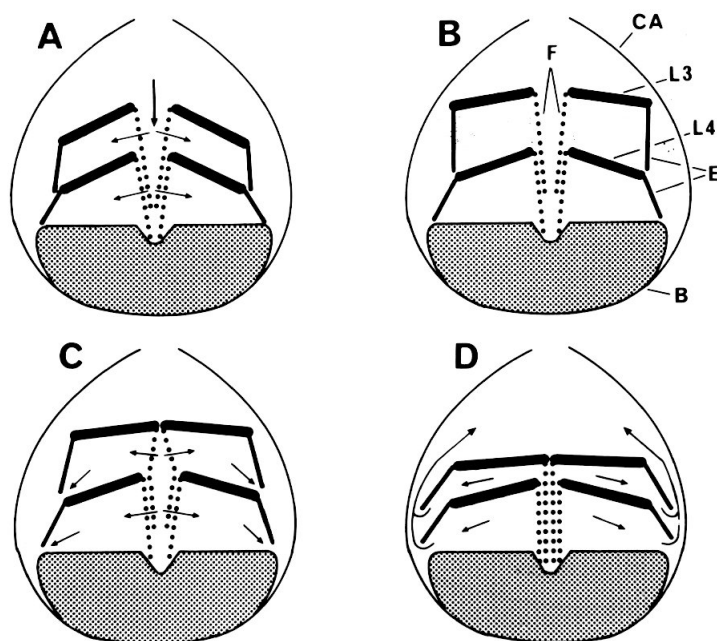
Afbeelding 1: Watervlo *Daphnia magna* (foto D. Kalmeijer)

De crustacea *Daphnia magna*, is waarschijnlijk het oudste en meest gebruikte testorganisme (Naumann, 1934). Ze worden beschouwd als een van de belangrijkste filter-feeders onder de zoöplankton met een belangrijke rol in het zoetwater ecosysteem. Vrijwel alle vissoorten hebben in een bepaald levensstadium, vooral jonge vissen, *Daphnia* op het menu staan. Maar ook de aasgarnaal, het glaskreeftje en de grote roeipootkreeftjes eten daphnia's.

Daarnaast zijn ze redelijk makkelijk te kweken en de laboratorium populatie bestaat onder normale omstandigheden maar uit één genotype (vrouwtjes) door parthenogenese. Onder bepaalde milieu-omstandigheden ontstaan er ook mannetjes en vind er een amphigonese reproductie plaats.

De *Daphnia* bezit een hoog gespecialiseerd aanhangsel op haar borst voor het verzamelen van voedseldeeltjes. Dit is waarschijnlijk het meest ontwikkelde filterapparaat binnen de cladocera. Het aanhangsel bestaat uit vijf vertakkingen en samen met de carapax vormen zij een pompsysteem. De derde en vierde vertakking bezitten filterachtige schermen waardoor deeltjes van het doorstromende water worden gescheiden (afbeelding 2). De schermen scheiden de middenruimte van de filterkamer (F) van de ruimtes tussen de kleppen. Bij een voor- en zijwaartse beweging van het aanhangsel ontstaat een gering vacuüm in de ruimtes tussen de kleppen (L3 en L4), waardoor water van de

middenkamer door de schermen naar de ruimtes tussen de kleppen wordt gezogen.



Afbeelding 2: Schematisch overzicht van de werking van het filterapparaat. (afkomstig van W. Lampert, 1987)

Tijdens de achterwaartse beweging van het aanhangsel wordt het water via zijkleppen en de carapax weer uit de ruimte tussen de kleppen geperst. Deeltjes die achter blijven op het scherm worden getransporteerd naar de ventrale voedsel groeve en vandaar naar de mond verplaatst. Hier wordt het voedsel met behulp van de mandibels vermalen voordat het wordt opgenomen. *Daphnia* is een relatieve passieve filter feeder, alhoewel ongewenst voedsel, bijvoorbeeld draadalg of overmatig voedsel kan worden verwijderd uit de voedsel groeve door de postabdominale klauw of geweigerd door de monddelen. De maximale grootte van de deeltjes die door de carapax kunnen is gelimiteerd door de afstand tussen de hoeken van carapax kleppen. De grootte van de openingen wordt bij een grote dichtheid van algen verkleind waardoor verstopping van het filter apparaat wordt voorkomen. De doorlaat grootte van het filter apparaat is ongeveer 1 μm voor *Daphnia magna*. Zowel de doorlaat grootte als het oppervlakte van het filtratiescherm nemen toe met het toenemen van de lichaamsgrootte.

Een karakteristieke eigenschap van *Daphnia* is de verticale migratie onder invloed van licht. 's Nachts voedt de *Daphnia* zich met algen in het epilimnion (bovenste waterlaag) en gedurende de dag verblijft de *Daphnia* in het hypolimnion (diepere waterlaag) om voedsel te verteren. De biologische relevantie van deze eigenschap wordt verondersteld het ontsnappen aan visuele predators zoals vis, te zijn.

Onder optimale condities verloopt de levenscyclus van de Daphnia als volgt: bij 20 °C., een dagelijkse fotoperiode van ongeveer 12 uur en voldoende voedsel ontwikkelen zich in circa 3 dagen de eieren in de broedzak. De jonge verlaten de moeder als vrij zwemmende miniatuur volwassenen. Na een juveniele periode van 7 tot 10 dagen, waarin 5 tot 6 keer vervelling plaats vindt, wordt het eerste broedsel geboren. Opeenvolgende broedsels komen om ongeveer 3 dagen welke gevolgd wordt door een vervelling. De lichaamsgrootte kan alleen maar toenemen als de carapax nog zacht is, wat resulteert in een sprongsgewijze groei.

In één enkel vrouwtje kunnen drie broedsel zich tegelijkertijd ontwikkelen. Eén broedsel ontwikkeld zich in de broedzak, terwijl het tweede broedsel wordt aangemaakt in de eierstokken. Op hetzelfde ogenblik ontwikkeld zich een derde broedsel vanuit kweekcellen tot oöcyten.

Onder minder gunstige omstandigheden worden er mannetjes geboren. De mannetjes bevruchten de vrouwtjes en er ontstaan zogeheten wintereieren. Deze eieren worden na te zijn bevrucht, uitgeworpen in de broedzak, welke is aangepast om ephippium (bescherm vlies) te kunnen maken. De eieren worden ingesloten in het ephippium waarna ze tijdens vervelling van de moeder, worden uitgestoten. Na een rustperiode ontwikkelen de eieren zich tot vrouwelijke Daphnia's, welke zelf weer zomer eieren aanmaken. In de regel, na het vrijkomen van wintereieren, produceren de vrouwtjes weer zomereieren.

Bijlage 2: Resultaten chemische analyse

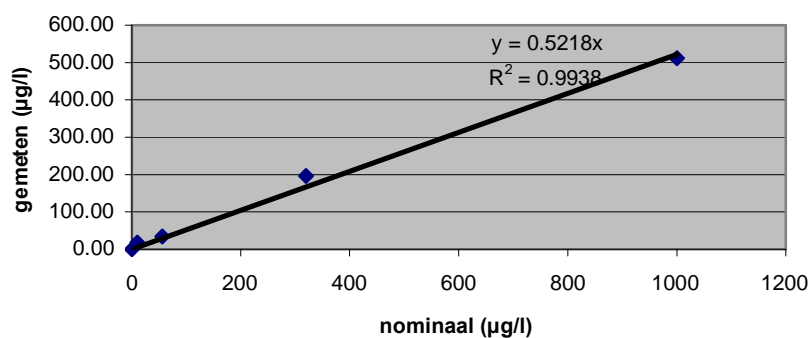
Resultaten van de afzonderlijke meetgegevens en de verschillende testen. De stockoplossing is voor alle testen gelijk geweest.

testen met pyreen

acute testen met *Daphnia magna*

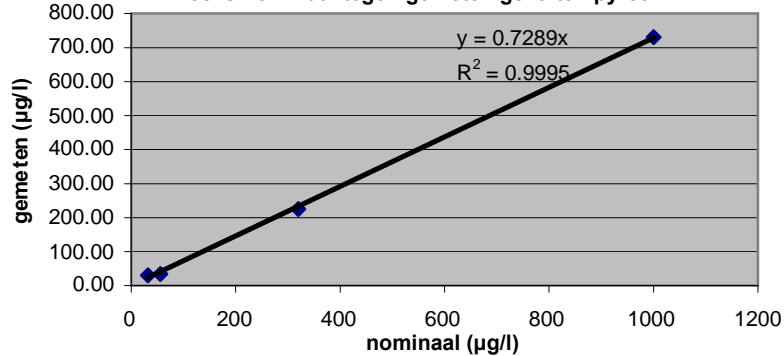
Eerste test	nominaal µg/l	gemeten µg/l
Monstercode		
A1	0	0.00
A2	10	18.28
A4	56	34.00
A6	320	196.50
A8	1000	512.00

A-reeks nominaal tegen gemeten gehalten pyreen



Tweede test	nominaal µg/l	gemeten µg/l
Monstercode		
B3	32	30.00
B4	56	34.02
B6	320	225.50
B8	1000	731.50

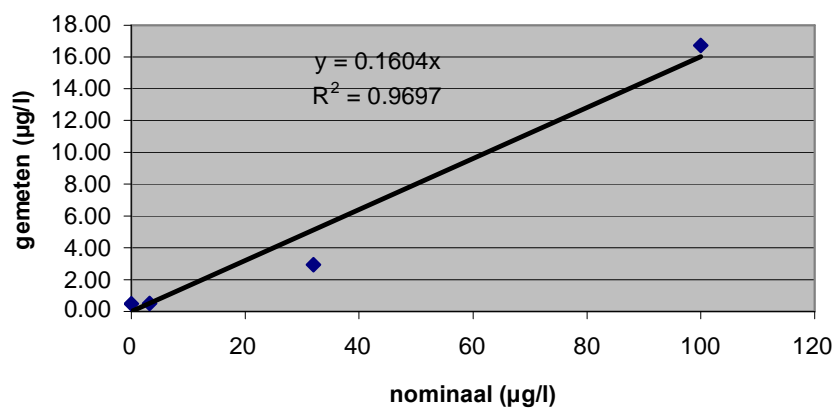
B-reeks nominaal tegen gemeten gehalten pyreen



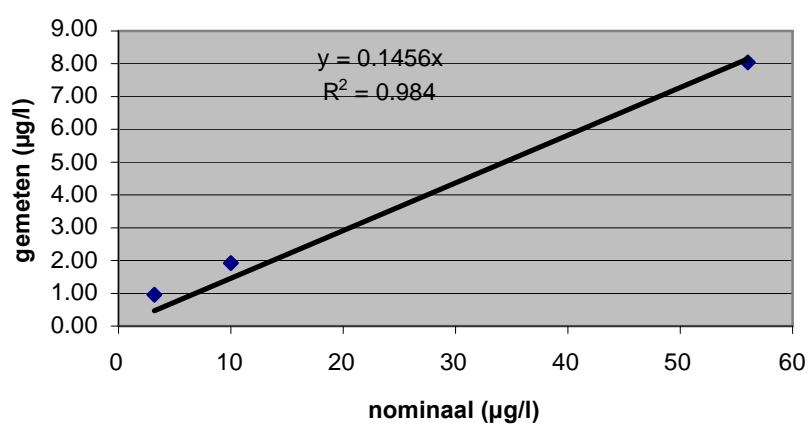
chronische testen

monstercode	nominaal µg/l	gemeten µg/l
Begin van de test		
Vbl	0	0.49
V3,2	3.2	0.50
V32	32	2.94
V100	100	16.74
Eind van de test		
NA 3,2	3.2	0.96
NA10	10	1.92
NA56	56	8.04

nominaal uitgezet tegen gemeten voor de test



nominaal uitgezet tegen gemeten na de test



Bijlage 3: Acute Daphnia test

.....

Gemeten randvoorwaarden van de eerste acute Daphnia test

parameters	Blanco voor	Blanco na	Hoogste conc. voor	Hoogste conc. na
pH	7.2	7.2	7.2	7.2
O ₂ (mg/l)	8.5	8.4	8.4	8.3
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0	0

Gemeten randvoorwaarden van de tweede acute Daphnia test

parameters	Blanco voor	Blanco na	Hoogste conc. voor	Hoogste conc. na
pH	7.8	7.8	7.8	7.9
O ₂ (mg/l)	8.6	8.5	8.4	8.2
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0	0
Gel. (mS/m)	43	43	43	43

Gegevens LC50 eerste acute test met Daphnia magna

Experiment table

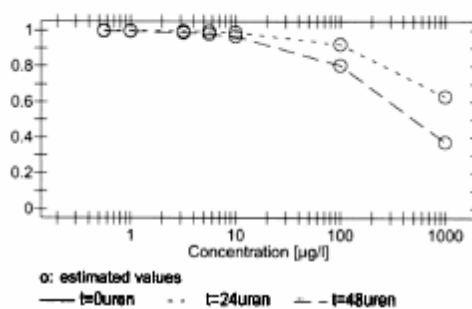
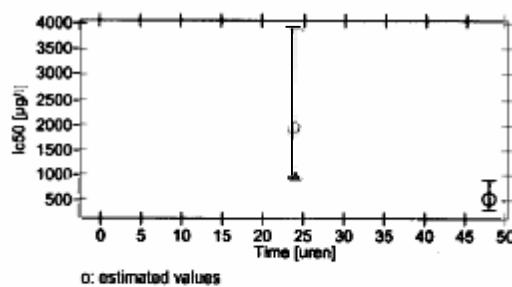
Tijd (uren)	C=0 µg/l	C=0.56 µg/l	C=1 µg/l	C=3.2 µg/l	C=5.6 µg/l	C=10 µg/l	C=100 µg/l	C=1000 µg/l
0	100	50	50	50	50	50	50	50
24	100	50	50	50	50	47	44	34
48	100	50	50	50	50	45	42	16

NOEC = 100 µg/l

Estimated statistical parameters

Tijd (uren)	LC 50 (µg/l)	95% con. interval
24	1890.16	921.03 – 3879.00
48	535.95	314.45 - 913.48

Slope parameter: 0.209523



Gegevens LC50 tweede acute test met Daphnia magna

Experiment table

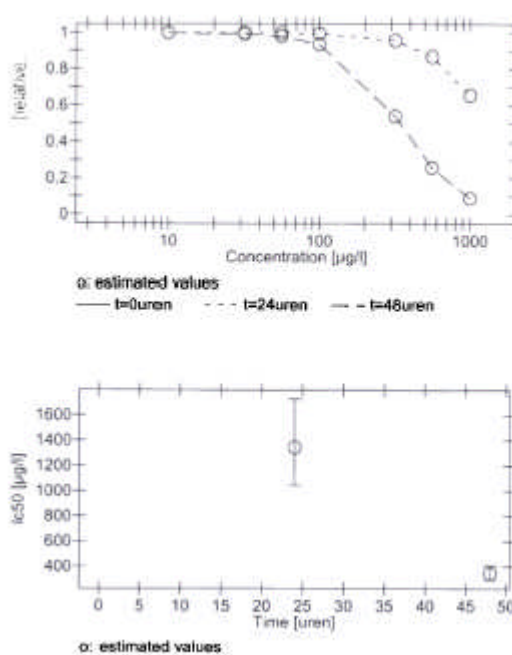
Tijd (uren)	C=0 µg/l	C=10 µg/l	C=32 µg/l	C=56 µg/l	C=100 µg/l	C=320 µg/l	C=560 µg/l	C=1000 µg/l
0	100	50	50	50	50	50	50	50
24	100	50	50	50	49	50	50	25
48	100	50	50	50	42	25	25	0

NOEC = 100 µg/l

Estimated statistical parameters

Tijd (uren)	LC 50 (µg/l)	95% con. interval
24	1343.62	1045.74 – 1726.35
48	344.96	292.91 - 406.26

Slope parameter: 0.544572



Bijlage 4: Resultaten chronische Daphnia test

Testorganisme: *Daphnia magna* (jonger dan 24 uur)
 Toetsstof: pyreen (cas. Nr. 129-00-0)
 Stockoplossing: 5,04 mg / ml methanol
 Concentratiereeks: 0, 0+100µl methanol, 3.2, 10, 32, 56, 100 µg/l
 Testduur: 21 dagen
 Temperatuur: 20 ± 1 °C
 Verdunningsmedium: DSW
 Hardheid: ± 240 mg/l
 Inhoud proefbak: 50 ml. met 1 testorganismen in 10-voud
 Voedsel: *C. pyrenoidosa* (1,75 x 10⁷ cellen/potje/dag)
 Verversing: 2x per week

concentratie: controle											concentratie: controle+100 µl MeOH										
dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1											1										
2											2										
3											3										
4											4										
5											5										
6											6										
7											7										
8											8										
9											9			*		*					
10		8								9	10	9	11		8		7			9	8
11	10		8	6	5	16	6	9	12		11						5	3			
12											12										
13		10								9	13	11	6				9			2	
14											14							20			
15	18		25	23	27	26	29	30	31		15				10				16		
16		22								18	16	17	12				20			18	11
17								1			17							33			
18			14	7	31	28	23		16		18				30				31		
19	6	22		*				32		30	19	14	32				29			38	35
20											20										
21	19		8								21				15			11			16
Rm	0.2768		0.2588		0.2862		0.2781		0.2904		Rm	0.2649		0.2739		0.2614		0.2595		0.2668	

* watervlo dood

concentratie: 3.2 µg/l											concentratie: 10 µg/l										
dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1											1										
2											2										
3											3										
4											4										
5											5										
6											6										
7											7										
8											8										
9											9			*		*					
10			7	6		7	6				10	9	11		8		7			9	8
11	5	5			8			8	16	4	11							5	3		
12											12										
13			7	7	9	7	14				13	11	6				9			2	
14		25									14							20			
15								30	26	29	15				10				16		
16	14		23	14	20	17	15				16	17	12				20			18	11
17											17							33			
18		19						25	14	22	18				30				31		
19	17	*	14	29	34	36	24				19	14	32				29			38	35
20											20										
21	14							10	15	13	21				15			11			16
Rm	0.2528		0.2689		0.2791		0.2810		0.2820		Rm	0.2886		0.2191		0.2309		0.2613		0.2728	

Concentratie: 32 µg/l											concentratie: 56 µg/l										
dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1											1										
2											2										
3											3										
4											4										
5											5										
6											6										
7											7										*
8											8										
9					*		*				9	*									
10											10										
11	*	10				3		10	5		11			*				*			
12											12										
13				9							13										
14			20							6	14										
15				1		20		21	10		15				1		9		4	5	
16				21							16		9								
17											17										
18		7	22			33		22	26	10	18				14	*	26		18	17	
19				33							19		26								
20										18	20										
21		18	25			18		32	22		21				22		18		27	21	
Rm	0.1823		0.2507		0.2138		0.2323		0.2536		Rm	0.1583		0.1497		0.1677		0.1809		0.1636	

* watervlo dood

Concentratie: 100 µg/l

dag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										
6	*	*	*							
7										*
8				*						
9					*	*	*	*	*	
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
Rm										

* watervlo dood

Gemeten randvoorwaarden chronische test met *Daphnia magna*

De metingen zijn verricht aan de oude oplossingen behalve bij T = 0. Tussen 7 en 14 dagen bleken alle watervlooien in de hoogste concentratie te zijn gestorven, hierna zijn de metingen aan de randvoorwaarden in 56 µg/l gedaan.

T = 0

Parameters	blanco	Blanco + MeOH	100 µg/l
pH	7.6	7.7	7.8
O ₂ (mg/l)	8.3	8.2	8.3
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0
Gel. (mS/m)	42	40	40

T = 7

Parameters	blanco	Blanco + MeOH	100 µg/l
pH	7.7	7.7	7.8
O ₂ (mg/l)	7.8	7.9	7.9
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0
Gel. (mS/m)	42	40	40

T = 14

Parameters	blanco	Blanco+ MeOH	56 µg/l	100 µg/l
pH	7.6	7.6	7.6	7.7
O ₂ (mg/l)	8.5	8.2	8.2	8.1
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0	0
Gel. (mS/m)	43	41	42	42

T = 21

Parameters	blanco	Blanco + MeOH	56 µg/l
pH	7.8	7.8	7.8
O ₂ (mg/l)	8.6	8.1	8.3
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0	0	0 -10
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0
Gel. (mS/m)	41	40	41

Statistische verwerking met TOXSTAT
reproductie D. magna pyreen chronisch

File: d:\pyreench.dat

Transform: NO TRANSFORM

t-test of Solvent and Blank Controls

Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN = 0.2781 CALCULATED t VALUE = 2.1322
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN = 0.2653 DEGREES OF FREEDOM = 8
 DIFFERENCE IN MEANS = 0.0128

TABLE t VALUE (0.05 (2), 8)= 2.306 NO significant difference at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 8)= 3.355 NO significant difference at alpha=0.01

TRANSFORM: NO TRANSFORM

NUMBER OF GROUPS: 5

GRP	IDENTIFICATION	REP	VALUE	TRANS VALUE
1	GRPS 1&2 POOLED	1	0.2768	0.2768
1	GRPS 1&2 POOLED	2	0.2588	0.2588
1	GRPS 1&2 POOLED	3	0.2862	0.2862
1	GRPS 1&2 POOLED	4	0.2781	0.2781
1	GRPS 1&2 POOLED	5	0.2904	0.2904
1	GRPS 1&2 POOLED	6	0.2649	0.2649
1	GRPS 1&2 POOLED	7	0.2739	0.2739
1	GRPS 1&2 POOLED	8	0.2614	0.2614
1	GRPS 1&2 POOLED	9	0.2595	0.2595
1	GRPS 1&2 POOLED	10	0.2668	0.2668
2	3.2	1	0.2528	0.2528
2	3.2	2	0.2689	0.2689
2	3.2	3	0.2791	0.2791
2	3.2	4	0.2810	0.2810
2	3.2	5	0.2820	0.2820
3	10	1	0.2886	0.2886
3	10	2	0.2191	0.2191
3	10	3	0.2309	0.2309
3	10	4	0.2613	0.2613
3	10	5	0.2728	0.2728
4	32	1	0.1823	0.1823
4	32	2	0.2507	0.2507
4	32	3	0.2138	0.2138
4	32	4	0.2323	0.2323
4	32	5	0.2536	0.2536
5	56	1	0.1583	0.1583
5	56	2	0.1497	0.1497
5	56	3	0.1677	0.1677
5	56	4	0.1809	0.1809
5	56	5	0.1636	0.1636

Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	GRPS 1&2 POOLED	10	0.259	0.290	0.272
2	3.2	5	0.253	0.282	0.273
3	10	5	0.219	0.289	0.255
4	32	5	0.182	0.254	0.227
5	56	5	0.150	0.181	0.164

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM
1	GRPS 1&2 POOLED	0.000	0.011	0.004
2	3.2	0.000	0.012	0.006
3	10	0.001	0.029	0.013
4	32	0.001	0.029	0.013
5	56	0.000	0.012	0.005

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1 GRPS 1&2 POOLED	10	0.272	0.272	0.272
2 3.2	5	0.273	0.273	0.272
3 10	5	0.255	0.255	0.255
4 32	5	0.227	0.227	0.227
5 56	5	0.164	0.164	0.164

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
GRPS 1&2 POOLED	0.272				
3.2	0.272	0.035		1.71	k= 1, v=25
10	0.255	1.649		1.79	k= 2, v=25
32	0.227	4.344	*	1.82	k= 3, v=25
56	0.164	10.358	*	1.83	k= 4, v=25

s = 0.019

Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Gegevens LC50 chronische test met Daphnia magna

Experiment table

Tijd (dagen)	C=0 µg/l	C=3.2 µg/l	C=10 µg/l	C=32 µg/l	C=56 µg/l	C=100 µg/l
0	20	10	10	10	10	10
10	20	10	8	8	8	0
15	20	10	8	7	6	0
21	19	9	8	7	5	0

Estimated statistical parameters

Tijd (uren)	LC 50 (µg/l)	95% con. interval
10	57.94	47.68 – 70.39
15	47.21	42.79 – 52.08
21	45.79	41.11 – 51.01

Slope parameter: 0.950029

