

EFFEKT VAN DICHLOBENIL OP DE VOEDSELOPNAMEN  
VAN DAPHNIA MAGNA.

september 1979 - maart 1980.

door H.K. Parmentier.

Een stageverslag in het kader  
van een praktijktijd voor de  
studie Biologie aan de  
Landbouwhogeschool Wageningen.

Rijksinstituut voor  
Natuurbeheer Leersum.  
afd. Hydrobiologie.  
projectleider Dr. K. Kersting

1980

Overname van gegevens is allen toegestaan na  
overleg met de projectleider.

137756

Inhoudsopgave:

<u>Hoofdstuk:</u>	<u>pagina:</u>
Samenvatting	1
Summary	2
1. Inleiding.	3
2. Proefobjecten.	8
3. Vraagstelling, doel van het onderzoek.	15
4. Materiaal en methode.	16
5. Resultaten.	27
6. Discussie.	36
7. Conclusies/Vermoedens.	40
8. Literatuurlijst.	41
9. Appendix.	45

### Samenvatting:

Door het nog steeds toenemende gebruik van pesticiden en de voortschrijdende belasting met sommige verbindingen van ondermeer het aquatisch milieu, dienen methoden in het toxicologisch onderzoek ontwikkeld te worden, die betrouwbare grenzen kunnen aangeven voor de maximale belasting van het water met diverse stoffen.

In toenemende mate wordt onderkend dat de traditionele statische lethale doses-bepalingen, hoewel nuttig voor snelle informatie, niet toereikend zijn om de complexe factoren, die een rol spelen bij de werking van pesticiden op levende organismen en hun lot in het milieu, weer te geven. Een nieuwe tendens is het gebruik van zogenaamde microecosystemen, stukjes levende natuur, waarmee onder laboratoriumomstandigheden de complexiteit van de natuurlijke ecosystemen beter benaderd kan worden.

In dit verslag worden de methode die gevolgd werd en de resultaten die verkregen werden besproken, bij de belasting van *Daphnia magna* Str. met dichlobenil, een herbicide, m.b.v. een vereenvoudigd type microecosysteem: een doorstroomopstelling. *Daphnia magna* werd gedurende maximaal 6 uur blootgesteld aan dichlobenilconcentraties respectievelijk van 0.5 tot 4 ppm. Hierbij werd de invloed van dichlobenil op de voedselopname bestudeerd. Uit de resultaten bleek dat dichlobenil, afhankelijk van de concentratie, een negatief effect op de voedselopname uitoefent. De bepaling van de voedselopname blijkt een gevoelige parameter voor dichlobenil te zijn.

Tevens bleek dat, mits enige ongemakken worden opgeheven, een doorstroomopstelling in principe een bruikbaar instrument is om ook langduriger toxiciteitsexperimenten uit te voeren.

Summary:

On behalf of the still increasing use of pesticides and the proceeding loading of the aquatic environment with persistent compounds, methods have to be developed in the toxicological research to give reliable limits for the use of these compounds in the aquatic environment.

At the moment the traditional static lethal-dose-methods are more and more acknowledged not to be sufficient enough to describe the complex factors which play a part in the operation of the pesticides on living organisms and their fate in the environment. A new tendency is the use of so called microecosystems, pieces of living nature under lab-conditions, which are used to approach the constitution of nature.

In this paper a method is given to study to exposure of *Daphnia magna* Str. to dichlobenil, a herbicide, with help of a continuous-flowing system, a kind of simplified microecosystem.

The effect of dichlobenil on the food-uptake of *Daphnia magna* was studied. The daphnids were exposed to concentrations of DCB, which varied from 0.5 - 4 ppm. Results will be discussed.

As it appears from the results DCB, depending on the concentration, has a negative effect on the food-uptake of *Daphnia magna*.

The results show that measuring the food-uptake is a sensitive parameter for DCB.

It seems that the use of a continuous-flowing system is a useful method for studying the effects of some compounds over a longer period.

## 1. Inleiding:

Onder de methoden die toegepast worden bij de bestrijding van waterplanten in sloten of drainage- en irrigatiekanalen nemen de chemische bestrijdingswijzen een belangrijke plaats in. Door hun relatieve goedkoopte ten opzichte van mechanische bestrijdingsmethoden met hun hoge arbeidskosten, de inzetbaarheid op grote schaal, de mogelijke selektieve werking op bepaalde soorten en de aanvullende werking bij mechanische en biologische methoden, worden de chemische middelen nog dikwijls in veel landen op soms grote schaal ingezet.

Daarnaast is echter het besef gegroeid dat het toenemend gebruik van herbiciden in het aquatisch milieu (en van pesticiden in het algemeen) tot nadelige gevolgen voor mens, dier en plant kan leiden.

Nadelige gevolgen van het gebruik van herbiciden (vergiften die gebruikt worden om op grote schaal plantenaantallen te reguleren) in aquatische gemeenschappen of als gevolg van het uitspoelen van landbouwvergiften kunnen ondermeer zijn:

- afname van de voor het herbicide gevoelige aantallen planten met als gevolg een mogelijk optredend zuurstoftekort door de afbraak van het plantemateriaal. Geen substraat meer voor bepaalde organismen om zich aan te hechten of in te schuilen. Verminderde voedselhoeveelheid voor planteeters en door het vrijkomen van grote hoeveelheden nutriënten kans op algenbloei, waarbij toxische verbindingen vrij kunnen komen.

Dit zijn de zogenaamde indirecte effecten.

- direkt toxische effecten op de fauna met mogelijk aantalsafname van bepaalde soorten.

Deze effecten kunnen acuut (op korte termijn) zijn of chronisch (op langere termijn) afhankelijk van de wijze van toediening, de bestendigheid in het water, absorptie aan de bodem of andere materialen en fysische omstandigheden in het water (licht, temperatuur etc.). Door het wegvallen van bepaalde soorten kunnen voedselketens ontregeld raken. Tenslotte kunnen bepaalde stoffen door hun grote bestendigheid en hun goede oplosbaarheid in vet t.o.v. water accumuleren in organismen en dus in de loop van de voedselketens zich ophopen met catastrofale ge-

volgen voor de toporganismen.

In Nederland werd aandacht geschonken aan deze problematiek ondermeer in het Indicatief Meerjarenplan van het ministerie van Verkeer en Waterstaat van 1975, waarin gesteld wordt dat aandacht besteed moet worden aan de instandhouding en terugwinning van het natuurlijk ecosysteem, daar gebleken was dat indien het ecosysteem optimaal funktioneert, de kwaliteiten van zwem-, drink- en viswater ook goed bleken te zijn. De organismen in een aquatische ecosysteem zijn immers in een veel direkter contact met de gifstoffen. Het I.M.P. stelt dat onderzoek gedaan moet worden naar gaten in de kennis van de effecten van allerlei stoffen in het aquatisch milieu.

Toxicologisch onderzoek moet dan voor de verschillende stoffen de gevarengrenzen aangeven.

In de toxicologie wordt in principe bij de bepaling van toxische eigenschappen van een stof met twee typen testen gwerkt:

1. de acute toxiciteitsproeven en
2. de chronische toxiciteitsexperimenten.

Bij de acute testen wordt het niveau van een stof bepaald dat een effect veroorzaakt bij een bepaald percentage van de testorganismen in een bepaalde periode. Algemeen is dat de mortaliteit; LD<sub>50</sub> of LC<sub>50</sub> (lethale doses of -concentratie waarbij 50% van de organismen sterft binnen een bepaalde periode; meestal 48-96 uur of korter) en de immobilisatie; EC<sub>50</sub>. Bij deze werkwijze, die snel informatie geeft, zijn echter wel enige nadelen verbonden (Leeuwangh, 1978):

1. de onmogelijkheid in een laboratorium een natuurlijk systeem na te bootsen met alle combinaties van biologische, chemische en fysische condities als absorptie van de stof aan klei, temperatuur, tijdsduur/wijze van blootstelling, pH, biodegradatie enz.
2. het moeilijk onderkennen van secundaire effecten, bijvoorbeeld metaboliëten of het optreden van zuurstofgebrek in het water tengevolge van de afbraak van plantaardig materiaal. Deze effecten kunnen lethaler zijn dan de oorspronkelijke stof.
3. dood of onbeweeglijkheid zijn eenvoudig herkenbare stadia, maar vormen daarom nog geen veilige criteria, daar lagere concentraties over langere tijd (chronisch) ook nadelige effecten kunnen veroorzaken; mutagenese, carcinogenese, gedragsafwijkingen, verminderde voortplanting etc., effecten die voor een populatie eveneens bedreigend zijn.

De gegevens worden verkregen bij geselecteerde testorganismen onder

geconditioneerde omstandigheden. Dit is echter niet voldoende voor een zekere representativiteit voor een natuurlijk milieu. Dit geldt ook in zekere mate voor de chronische testen, die echter wel over langere tijd lopen.

Wil men toch de complexiteit van een natuurlijk systeem in een test betrekken dan kan men natuurlijk veldexperimenten uitvoeren. Deze hebben echter als nadeel de moeilijk te realiseren repliceerbaarheid, de grote invloed van wisselende omgevingsfactoren, de bemonsteringsproblemen en de verschillende eigenschappen van de proefdieren, wat de interpreteerbaarheid van de resultaten niet vereenvoudigt.

Een andere mogelijkheid is het op laboratoriumniveau opbouwen van een natuurlijk ecosysteem, een werkwijze die de laatste tijd meer in zwang lijkt te komen. Aquatische microecosystemen zijn bijvoorbeeld ontwikkeld door Kersting (1978), Cooper en Copeland (1973), Hueck en Adema (1968). Deze microecosystemen zijn echte systemen met levende en abiotische componenten. Basaal bestaan ze uit een kunstmatig gevormd of getransplanteerd stukje natuur. De kracht van de microecosystemen ligt in het feit dat enerzijds waarnemingen aan enkele organismen geen informatie geven over de effecten die veroorzaakt worden door de complexiteit van de natuurlijke omstandigheden en anderzijds waarnemingen bij veldexperimenten moeilijk interpreteerbaar zijn en controle-systemen moeilijk realiseerbaar.

De microecosystemen dienen om responsen van een systeem op een bepaalde stimulus aan te tonen met zoveel mogelijk konstante parameters. Ze dienen echter wel aan bepaalde voorwaarden te voldoen (Ringelberg en Kersting, 1978):

1. de systemen dienen herkenbare eigenschappen van een natuurlijk systeem te vertonen, de waargenomen resultaten moeten natuurlijke situaties beter helpen begrijpen.
2. voordat experimenten gedaan kunnen worden moeten ze in een steady-state fase zijn of zo bekend functioneren dat men hun situatie voorspellen kan indien er geen experimenten gedaan worden.
3. observaties moeten over langere tijd mogelijk zijn, daar ecologische processen en effecten daarop langere tijd vergen om tot uiting te komen.

Is aan deze voorwaarden voldaan, dan heeft men de mogelijkheid verschillende ecologische processen te bestuderen; bijvoorbeeld de interactie tussen populaties, het lot van elementen, de groei naar rijpheid van een systeem of het effect van toxische stoffen. Er kan dus gemanipuleerd en gerepliceerd worden onder zelf te handhaven condities.

Volgens Ringelberg en Kersting (1978) zijn er vanuit technisch en biologisch standpunt gezien verschillende typen (aquatische) micro-ecosystemen:

- technisch: het gesloten type wat betreft mineralen (Taub, 1971).  
het open type: mineralen worden kontinu toegevoerd (Taub, 1971, Cooper, 1973) of diskontinu (Uhlman, 1971).
- biologisch: komplete samenlevingen uit de natuur worden samengebracht (Odum en Hoskins, 1957, Whittaker, 1961).  
Dus een flinke diversiteit en open systemen wat betreft de organismen.  
slechts enkele soorten worden samengebracht onder steriele condities, zogenaamde gnotobiotische micro-ecosystemen (Nixon, 1969, Hairston, 1968).

Verschillende combinaties zijn dus mogelijk.

Micro-ecosystemen kunnen dus gebruikt worden om eigenschappen van ecosystemen beter te begrijpen, heeft men bepaalde steady state condities, dan kan men experimenten uitvoeren met bepaalde te variëren factoren.

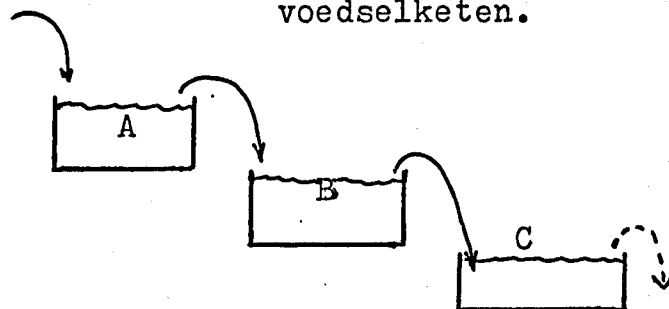
Zo heeft Kersting m.b.v. een micro-ecosysteem proeven gedaan over het effect van diuron op *Daphnia magna*. Het micro-ecosysteem was opgebouwd uit 3 niveau's: een compartiment geënt met *Chlorella vulgaris* is aangesloten op een compartiment met een *Daphnia magna*-populatie, die weer een afvoer heeft naar een decomposercompartiment. Dit laatste staat weer in verbinding met het algencompartiment. Na het bereiken van een steady state (interne factoren), kan de te testen stof toegevoegd worden. Optredende effecten kunnen dan op naam van de stof geschreven worden. Deze werkwijze past Kersting ook op het ogenblik toe met dichlobenil als te testen stof. Het voordeel is dat je precies weet waar iets gebeurt, op welk niveau de te testen stof effecten oproept en bovendien



vermindert men de kans op uitroeiing van een soort door de daaropvolgende soort.

Hueck en Adema (1968) wijzen op het belang van langdurige (chronische) toxiciteitstesten en vestigen daarbij de aandacht op (kontinue) doorstroomsystemen. Hun betoog is hierop gebaseerd dat indien men de toxische eigenschappen van een stof wil testen, men in principe één soort kan beproeven. Wil men meerdere soorten aan de stof onderwerpen dan kan men deze soorten gescheiden testen, maar dan ontbreken eventuele gegevens over mogelijke interacties. Men kan ook de verschillende soorten samenbrengen: het micro-ecosysteem-idee, maar dat is moeilijk op te bouwen en een goede analyse van wat er biologisch of chemisch gebeurd is niet eenvoudig. Bovendien kan één soort de andere(n) uitroeien. De oplossing is dus een systeem waarbij de organismen in principe met elkaar verbonden zijn, maar toch afzonderlijk analyseerbaar. In schema: fig 1.

fig 1. A → C organismen opeenvolgend in een voedselketen.



Zulk een systeem kan dus (mineralen-) open of gesloten zijn. In het schema van fig 1. open.

Een voordeel van een doorstroomopstelling is bovendien dat in tegenstelling tot een statische proef de concentratie van de te testen stof goed op het juiste niveau te handhaven is. De concentratie kan in statische testen afnemen ten gevolge van afbraak, evaporatie, precipitatie etc. In een doorstroomopstelling wordt de stof continu aangevoerd. Ook het eventuele noodzakelijke voedselaanbod is eenvoudiger op peil te houden, zodat hongereffekten uitgeschakeld kunnen worden. De doorstroomopstellingen kunnen in principe lange tijd lopen, zodat op langere termijn optredende effecten meetbaar zijn en de verschillende factoren zijn eenvoudiger manipuleerbaar

zonder dat de proef weer afgebroken of opnieuw gestart moet worden. Deze methode biedt de mogelijkheid de invloed van een toxische stof op de organismen over langere tijd te bepalen met continue metingen.

## 2. Proefobjecten:

Alvorens de vraagstelling van het onderzoek en de doorstroomopstelling te bespreken zullen nu kort enkele eigenschappen van de te testen stof: dichlobenil en het te testen organisme: *Daphnia magna* Str. gerecapituleerd worden, die van belang kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten die met behulp van de doorstroomopstelling werden verkregen. Voor een uitgebreide beschrijving verwijs ik naar het verslag van Henk van de Honing (1979).

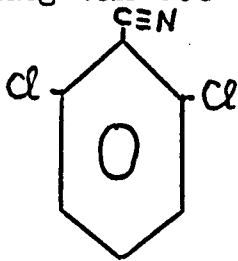
### Dichlobenil:

Dichlobenil (2,6-dichloorbenzonitril) is een herbicide dat op de markt is gebracht door Philips-Duphar B.V. onder de merknaam Casoron. De stof is een zogenaamd totaal-herbicide en werkt in het aquatisch milieu op vrijwel alle makrofyten. Drijvende planten en algen worden niet aangetast. Dichlobenil wordt door de wortels opgenomen en werkt remmend op delend planteweefsel en ook kiemingsremmend, het doodt dus voornamelijk jonge en groeiende planten (Newbold, 1975). Oudere en volgroeide planten worden alleen bij hoge doseringen beschadigd (Koopman, 1960).

Dichlobenil wordt op twee wijzen aan het aquatisch milieu toegevoerd: als wettable powder en in granulaire vorm, de laatste vorm is vooral ontworpen om de stof langzaam in oplossing te doen gaan en werkt dus langere tijd.

De oplosbaarheid in water is vrij slecht: 18 mg/l bij 20°C en dichlobenil kan weer snel uit het water verdwijnen door verdamping, absorptie aan materialen als lignine, humus en lipiden of door adsorptie aan de bodem, waar het lange tijd kan blijven (Frank en Comes (1967) vonden 160 dagen na dosering nog dichlobenil in de modder). Micro-organismen kunnen de stof omzetten in 2,6-dichloorbenzamide (Verloop, 1972). Toch kan dichlobenil nog lange tijd na dosering in het water voorkomen; van Valin (1966) vond 189 dagen

na dosering van 0.6 mg/l nog 1.05 ppb.



mol. gewicht: 172

smeltpunt: 145-146°C

kookpunt: 270°C bij 1.013 bar

Als gevolg door sterfte van de makrofyten na gebruik van dichlobenil neemt het  $O_2$ -gehalte in het water af. Deze kan echter door het optreden van algenbloei, veroorzaakt door het vrijkomen van nutriënten, weer sterk oplopen (Walsh, 1971). Walsh vond na dosering van 1 ppm in een water geen veranderingen in de temperatuur, geleidingsvermogen, nitraat-stikstofgehalte, fosfaatgehalte, hardheid,  $CO_2$ -gehalte en pH in het water. Wel traden er verschuivingen in de fytoplanktonaantallen op.

Dichlobenil heeft een lage (acute) toxiciteit voor de meeste invertebraten, maar kan een hoge (acute) toxiciteit voor vissen hebben en zich in weefsels ophopen (Cope, 1969, Van Valin, 1966, Tooby, 1972), waar het zich lange tijd na dosering nog kan bevinden. Ook beschadiging van weefsels (o.a. kieuwen) bij vissen zijn beschreven (Wiersma-Roem, 1978). Voor enkele acute toxiciteitsgegevens zie tabel 1.

Voor warmbloedige dieren is de toxiciteit vrij laag (Beynon, 1972), dichlobenil wordt snel via urine en faecalieën uitgescheiden, voornamelijk in de vorm van 2,6-dichloro-3-hydroxy-benzonitril, de 4-hydrxyvorm en 2,6-dichloro-3-hydroxy-benzoïsch zuur en andere verwante derivaten. Accumulatie lijkt niet op te treden. De effecten verschillen echter van soort tot soort (Wit en van Genderen, 1966). Een belangrijke eigenschap van dichlobenil is ook de sterke affiniteit voor materialen als polytheen, PVC-rubber en Para-rubber, zowel vanuit waterige oplossing als dampfase (Verloop, 1972).

#### Daphnia magna:

Daphnia's behoren tot de familie der Daphnidae, subfamilie Daphnoïdae, orde Cladocera, subklasse Brachiopoda, klasse Crustaceae, phylum Arthropoda. Er zijn maar weinig wateren in Nederland die niet

Tabel 1: Acute toxiciteitsgegevens van dichlobenil.

<u>soort:</u>	<u>tijdsduur:</u>	<u>T in °C</u>	<u>LD/LC<sub>50</sub></u>	<u>auteur:</u>
Daphnia magna	48 uur	21	10 mg/l	Sanders (1970).
Daphnia magna	48 uur	18	3.6 mg/l	v.d. Honing (1979)
Daphnia pulex	48 uur	-	3.7 mg/l	Cope (1966).
Gammarus fasciatus	48 uur	15.5	18 mg/l	Sanders (1970).
Gammarus lacustris	24 uur	-	16 mg/l	Sanders (1969).
Asellus brevicaudus	48 uur	15.5	34 mg/l	Sanders (1970).
Cypridopsus vidua (garnaal)	48 uur	21	7.8 mg/l	Sanders (1970).
Oronectes nails (rivierkreeft)	48 uur	15.5	22 mg/l	Sanders (1970).
Lepomis macrochirus (vis)	48 uur	24	20 mg/l	Sanders (1970).
Rutilus rutilus (vis)	10 dagen	-	1.6 mg/l	Tooby (1972).
Salmo gaviderni (vis)	24 uur	13	23 mg/l	Van Valin (1966).
Ptenonarcys species (Plecoptera)	24 uur	-	42 mg/l	Cope (1965).
rat	14 dagen	-	4500 mg/kg lich.gew.	van Genderen (1968)
konijn	14 dagen	-	270 mg/kg lich.gew.	van Genderen (1968)
muis (oraal)	-	-	> 6 gr/kg lich.gew.	Koopman (1960).
muis (intraperiton.)	-	-	> 3 gr/kg lich.gew.	Koopman (1960).

door een soort van de Daphnidae bewoond worden. Het genus *Daphnia* bestaat uit ongeveer 30 soorten over de gehele wereld met 5 daarvan in Nederland die aanmerkelijk verschillen in grootte en gewicht en in habitats. *Daphnia magna*, de grootste soort, woont in kleine en ondiepe plasjes met modderige of organische bodems. Ze kunnen in grote concentraties (1000 individuen per liter) voorkomen.

#### Biologie van *Daphnia magna*:

In fig. 2 is de morfologie/anatomie aangegeven naar Green (1957). Vrouwelijke exemplaren kunnen tot 5 à 6 mm groot worden, mannetjes blijven veel kleiner en komen ook veel minder voor. Het dier wordt omgeven door een carapax, een harde en onbuigzame chitine laag die aan de ventrale zijde van het dier open is en als twee kleppen om het dier sluit. Deze cuticula kan niet meegroeien en wordt periodiek vervangen door een nieuwe laag die onder de oude aangelegd wordt. Het tijdsinterval tussen twee opeenvolgende "vervelingen" wordt instar genoemd. Vanaf de geboorte van een *Daphnia* (als volledig copy van een adult) tot de sexuele volwassenheid worden 4-6 instars doorlopen, in het adulte stadium kunnen er nog  $\pm$  24 volgen. De levensduur van het dier varieert met de temperatuur; 108 dagen bij 8°C, 45 dagen bij 18°C en 29 dagen bij 28°C (Anderson, 1942). Voor de voortbeweging maakt een *Daphnia* gebruik van zijn antennes die roebewegingen maken en het dier sprongsgewijs door het water stuwten. Tussen de beide valvae van de carapax bevinden zich de thoracale extremiteiten die door het voor- en achterwaarts bewegen een vloeistofstroom in stand houden. Via 'haren' op de thoracale extremiteiten worden voedseldeeltjes; algen, bacteriën en flagellaten afgefilterd en dorsaal naar de voedselgleuf getransporteerd, waarvandaan het naar de mandibulae wordt getransporteerd. *Daphnia*'s zijn dus filterfeeders. Het voedsel doorloopt de darmtractus vrij snel (een half uur bij 18-20°C) en faecaliën worden weer uitgescheiden. De thoracale extremiteiten zouden door de aanwezigheid van epipodyten tevens een rol in de zuurstofvoorziening kunnen spelen.

Over de voedingswijze van *Daphnia*-soorten en de factoren die daarbij een rol spelen is veel literatuur verschenen. Achtereenvolgens zullen nu de factoren besproken worden die een rol kunnen spelen bij de voedselopname van *Daphnia magna*.

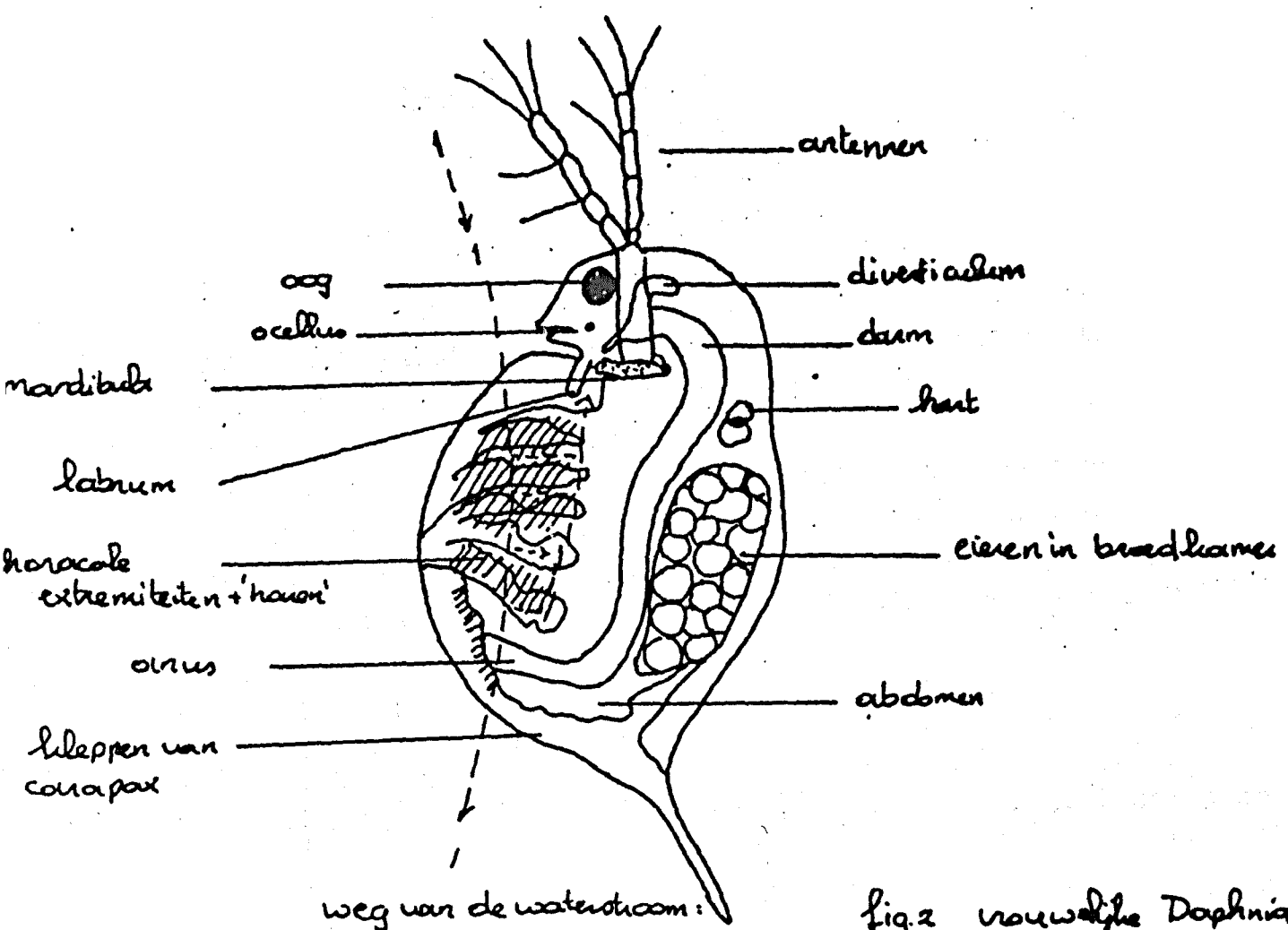


fig. 2 vrouwelijke *Daphnia magna*

- hoofdstroom van versd water van voren naar achteren.
- dorsaalgerichte transportstroom van afgefilterd sardon.
- oraal gericht transport van afgefilterd sardon.

Voedselconcentratie: de feeding-rate (het totaal volume voedsel per tijdseenheid door een Daphnia gegeten) is proportioneel aan de voedselconcentratie tot een zekere grens, boven deze kritieke concentratie (incipiënt limiting level) is de feeding-rate onafhankelijk van de voedselconcentratie (Kersting en van der Leeuw, 1976, McMahon en Rigler, 1965, Burns, 1968). De filtering-rate (het volume van een medium bevattende het aantal gegeten cellen in een bepaalde tijd gefilterd) is aan de feeding-rate op de volgende wijze gerelateerd:

$$\text{feeding-rate} = \text{filtering-rate} \times \text{voedselconcentratie.}$$

Dus is de filtering-rate konstant beneden de kritieke concentratie en neemt de filtering-rate af boven de i.l.l. Kersting en van der Leeuw (1976) vonden een i.l.l. van  $2.9 \times 10^6 \mu/\text{ml.D.}$  bij  $18^\circ\text{C}$ . Zie fig. 3.

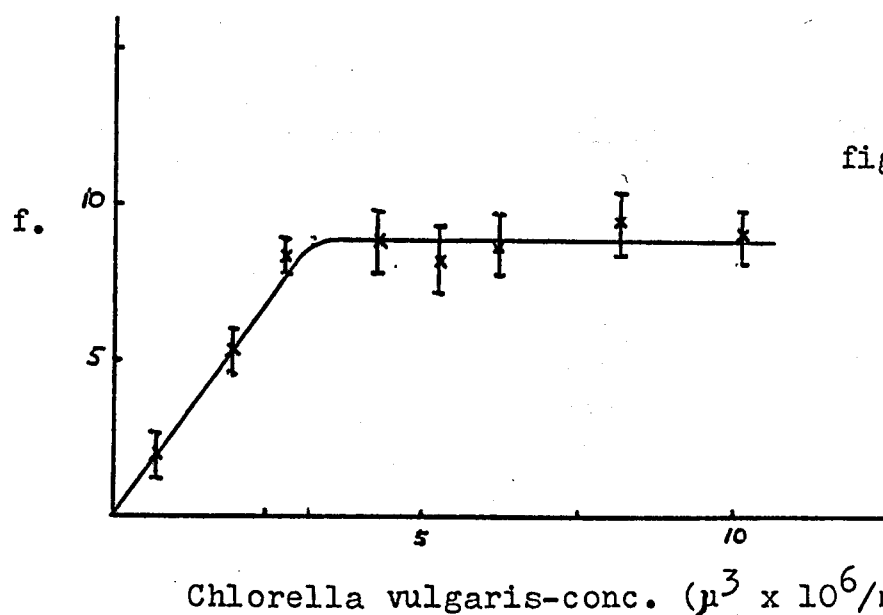


fig. 3: Feeding-rate van *Daphnia magna* bij verschillende *Chlorella vulgaris* concentraties in  $\mu^3 \times 10^6 / \text{hr.D.}$  (Kersting en van der Leeuw, 1976).

De gemiddelde maximale feeding-rate is  $9.2 \times 10^6 \mu^3/\text{hr.D.}$ , de gemiddelde maximale filtering-rate (onder de i.l.l.) is  $3.2 \text{ ml/hr.D.}$  (Kersting en van der Leeuw, 1976).

Kersting en Holterman (1973) vonden dat *Daphnia magna* non-selectief *Chlorella vulgaris* eet tussen 2 en  $165 \mu^3$  celgrootte van *C. vulgaris*. Gedeeltelijk afgebroken cellen (faecalieën) kunnen opnieuw door *Daphnia magna* opgenomen worden; deeltjes kleiner dan  $15 \mu^3$ . McMahon en Rigler (1965) vonden dat de filtercapaciteit van *Daphnia magna* onafhankelijk is van de grootte van

voedseldeeltjes tussen  $0.9$  en  $1.8 \times 10^4 \mu^3$ . Het opgenomen voedselvolume zou bepaald worden door de verteerbaarheid van de deeltjes. McMahon (1965) en Burns (1969) zagen een toename in de filtering-rate van 4 Daphnia soorten bij toenemende lichaamsgrootte en lichaamsgewicht. Ook nemen de feeding-rate en de i.l.l. toe. De filtering-rate is positief-gecorrleerd via een wortelfunctie aan de lichaamsgrootte van de Daphnia's.

Ook de temperatuur kan van invloed zijn; een stijgende temperatuur lijkt de filtering- en feeding-rates doen toenemen (McMahon, 1965, Burns, 1966, Nauwerk, 1959 en Schindler, 1968). McMahon (1965) vond optimale filtering- en feedingrates bij  $24^\circ\text{C}$ . Ook de i.l.l. is temperatuursafhankelijk, de maximale i.l.l. is  $2.9 \times 10^6 \mu^3/\text{ml}$  bij  $18^\circ\text{C}$  (Kersting, 1976).

Nauwerk (1959) wijst op een seizoensinvloed op het eetgedrag van Daphnia longispinna. Deze soort vertoont hogere filtering-rates in de maanden mei t/m augustus en dit zou kunnen samenhangen met de hogere temperatuur en -lichtintensiteit en het reproductiestadium van het dier.

Onderzoek betreffende het effect van licht op de filtering-rate hebben weinig consistente resultaten opgeleverd; Schindler (1968) rapporteerde geen significant verschil in filtering-rates in groepen van Daphnia magna in donker en 1000 ft-c lichtintensiteit. McMahon (1965) vond geen verschil tot 500 ft-c met iets grotere filtering-rates onder hogere lichtintensiteiten. Buikema (1973) vermeldt de invloed van lichtintensiteit en acclimatisatie in filtering-rates bij Daphnia pulex bij donker tot 115 ft-c.

Nauwerk (1959) indiceert dat de voedselopname van D. longispinna s'nachts groter is dan overdag. Ook Haney (1975) wijst op een toename s'nachts, afhankelijk van de verticale migratie naar hogere sferen. Starkweather (1975) vond dat Daphnia magna s'nachts een hogere filtering-rate vertoonde, die bovendien temperatuursafhankelijk is en endogeen van oorsprong bleek te zijn; een circadiane ritmiek.

De pH is volgens Kring (1963) ook van invloed. Kring vond een maximale feeding-rate bij Daphnia pulex bij de pH waarbij het dier was opgegroeid.

Crowding resulteert normaliter in een afname van de filtering-rate (Marshall en Orr, 1955, 1962) bij planktonische Crustaceae.



McMahon en Rigler (1963) vonden dat de feeding-rate beïnvloed wordt door de hoeveelheid voedsel in de darm, een uitgehongerd dier eet in een bepaalde tijdseenheid meer dan een gevoed dier als er voldoende voedsel aanwezig is, dus ook de conditie van het dier is van invloed. Volgens Schindler (1968) consumeert *D. magna* minder detritus en nutriëntenarme algen dan energierijk voedsel. De laatste hier te noemen faktor en waar dit onderzoek goed op te baseren is, is de invloed van toxische stoffen op de voedselopname. McMahon en Rigler (1965) vonden een verschil in opname van senescente *Chlorella vulgaris* algen en cellen die in log-phase waren door *Daphnia magna*. Bij senescenten (oude cellen) trad een effect op bij de filtering-rate beneden de i.l.l.-concentratie en bij de feeding-rate. De filtering-rate bij de log-phase cellen was 2.7-3.4 ml/hr.D. en bij senescenten 0.7 ml/hr.D. De maximale feeding-rate was  $30 \times 10^4$  cellen/hr. en  $3 \times 10^4$  cellen/hr. bij log-phase cellen en senescenten respectievelijk. Ook Ryther (1954) vond een dergelijk effect. Hierbij werd waargenomen dat *D. magna* cellen gaat 'weigeren' doormiddel van een verminderde slagfrequentie van de thoracale extremiteiten, weigering van voedsel uit de voedselgroeve door deflectie van het labrum en afname van de kaakbewegingen. Ook de stand van de carapaxkleppen veranderde (Burns, 1968). Deze effecten werden ook waargenomen bij het aanbod van diverse blauwgroene algen (*Anabaena*, *Oscillatoria*). Dit impliceert dus dat senescente algen producten afscheiden die de filtratie door *Daphnia*'s belemmeren; om minder senescenten of andere slechte voedseldeeltjes binnen te krijgen neemt de filtering-rate af, waarschijnlijk onder controle van sensoren in de darm, mogelijk in combinatie met externe receptoren. De conclusie die hieruit opgemaakt kan worden, is dat verminderd opneembare of toxische voedseldelen of stoffen in het water de voedselopname doen afnemen en dus ontdekt zouden kunnen worden aan hun effect op de filtering-rate beneden de i.l.l.-concentratie. Dan is de bepaling van de filtering-rate voldoende om na te gaan of een voedsel(medium) giftig is of niet. McMahon en Rigler (1965) noemen een abnormaal filtering-rate de beste en eenvoudigste aanwijzing van remming, gemeten als de slagfrequentie van de thoracale extremiteiten of de snelheid van voedselopname in een beperkte concentratie te

onderzoeken voedsel.

Daphnia's zijn door veel onderzoekers bij uiteenlopende experimenten als proefdieren gebruikt. Hun gebruik heeft vele voordelen: Ze zijn klein en hebben een relatief korte levensduur. Eenvoudig te kweken zijn ze snel volwassen en ze reproduceren vlot, zodat ze meestal in voldoende aantallen voorhanden zijn. Door de voornamelijk parthenogenetische voortplanting blijft genetische Konsttheid gewaarborgd (bij Daphnia's komen alleen mannetjes voor onder ongunstige omstandigheden, waarna na paring zogenaamde wintereieren geproduceerd worden). Hun grootte en doorzichtigheid laat microscopische observatie toe. Bovendien vormen de Daphnia's door hun herbivore levenswijze een belangrijke schakel in het aquatisch milieu. Voor toxicologische experimenten zijn ze naast bovengenoemde eigenschappen ook nog zeer geschikt door hun grote gevoeligheid voor diverse pesticiden (Frear en Boyd, 1967). Het is echter van belang rekening te houden met de diverse factoren die een rol spelen bij de Daphnia's als leeftijd, sexualiteit, reproductiestadium, fysisch/chemische omgeving etc. en van invloed kunnen zijn bij toxicologische experimenten. Standaardisatie is geboden (Anderson, 1942).

### 3. Vraagstelling, doel van het onderzoek:

Uit eerdere experimenten van H. van de Honing (1978) was gebleken dat dichlobenil een negatieve invloed uitoefent op de voedselopname van Daphnia magna. Er waren aanwijzingen dat er in de loop der tijd herstelmechanismen op zouden kunnen treden. Getracht werd nu na te gaan of dichlobenil inderdaad een negatief effect uitoefent op de filtering/feeding-rate van D. magna en of er in de loop der tijd herstel optreedt. De experimenten werden nu echter met een doorstroomopstelling uitgevoerd. Het voordeel van deze methode is dat over redelijk lange tijd continue metingen verricht kunnen worden, zodat de vraag wanneer effecten optreden te beantwoorden is. Manipulatie is eenvoudig en de opstelling biedt een goede acclimatisatiemogelijkheid voor de Daphnia's. Eventuele hongereffekten die bij statische testen voorstelbaar zijn of het verlies aan DCB zullen in een doorstroomopstelling minder optreden.

#### 4. Materiaal en methode:

Voor de bepaling van mogelijke effecten van dichlobenil op de voedselopname van *Daphnia magna* werd gebruik gemaakt van een sinds 1969 op het laboratorium te Leersum in kulture gehouden populatie. De dieren worden daar op de volgende wijze gekweekt: Twintig volwassen vrouwtjes worden in een aquarium van 5 liter gehouden met een *Chlorella vulgaris*-concentratie van  $4 \times 10^6 \mu^3/\text{ml}$  bij een temperatuur van  $18^\circ\text{C}$  en een licht-donker ritme van 14 uur licht en 10 uur duisternis. Iedere maandag, woensdag en vrijdag wordt het water met de voedselconcentratie van de *Daphnia*'s ververst. De werkwijze is hierbij als volgt: vijverwater uit de vijver van het kasteel Broekhuizen wordt gefilterd bij een poriëngrootte van  $0.45 \mu$  Sartorius. Vervolgens wordt m.b.v. de Coulter-Counter (model  $z_{BI}$ ) de concentratie aan algen, uit een continue algenkulture verkregen, bepaald, waarna m.b.v. een rekenprogramma voor een Hewlett Packard HP 25-rekenmachine bepaald wordt hoeveel ml's algenmedium aan 5 liter filterwater toegevoegd moet worden om een concentratie van  $4 \times 10^6 \mu^3/\text{ml}$  te verkrijgen. Dit algenmedium wordt gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof afgegoten en het (algen)bezinksel bewaard. Uit het aquarium van de 20 volwassen vrouwtjes wordt 2.5 liter water afgetapt en overgebracht in een schoon 5 liter aquarium. Vervolgens wordt aan beide aquaria 2.5 liter gefilterd vijverwater toegevoegd. Aan beide aquaria wordt daarna het algenbezinksel toegevoegd. Uit de bak met de 20 volwassen vrouwtjes worden de jongen gehaald m.b.v. een zuigbuis en daarna geteld, 50 jongen werden op vrijdag en later ook op woensdag in het nieuwe aquarium gedaan, de rest (en op maandag alle jongen) werd weggegooid. Gezorgd werd dat er steeds 20 volwassen vrouwtjes aanwezig waren. Naast deze 2 aquaria met volwassen vrouwtjes en jongen waren er nog 2 bakken met oudere jongen (naar datum gerangschikt) die iedere vrijdag en later ook woensdag een plaatsje opschoven. De oudste bak werd op die dagen weer opgeruimd. Ook deze bakken kregen 3 x per week een nieuwe *Chlorella*-hoeveelheid.

Bij de experimenten die op woensdag en vrijdag uitgevoerd werden, werd altijd gebruik gemaakt van de dieren die op de woensdag en de vrijdag respektievelijk van de voorafgaande week als jongen in het nieuwe aquarium waren overgebracht en dus bij het inzetten van een proef; respektievelijk op dinsdag en donderdag ongeveer 7 dagen oud waren. (Eerst werden de experimenten alleen op woensdag uitgevoerd met dieren op de voorafgaande vrijdag 'geboren', dus 5 dagen oud, later toen bleek dat ook 2 experimenten per week mogelijk waren, werden voor de woensdagproeven dieren van de voorafgaande woensdag en voor de vrijdagproeven dieren van de voorafgaande vrijdag gebruikt, dus 7 dagen oud.) Deze leeftijden werden gekozen omdat bij enkele voorbereidende proeven was gebleken dat nogal vaak een aantal jongen in de proefvaatjes geboren werden, hetgeen de berekeningen en de metingen aan de proeven beïnvloed. Bij de 5 en 7 dagen oude dieren is dit nooit het geval geweest.

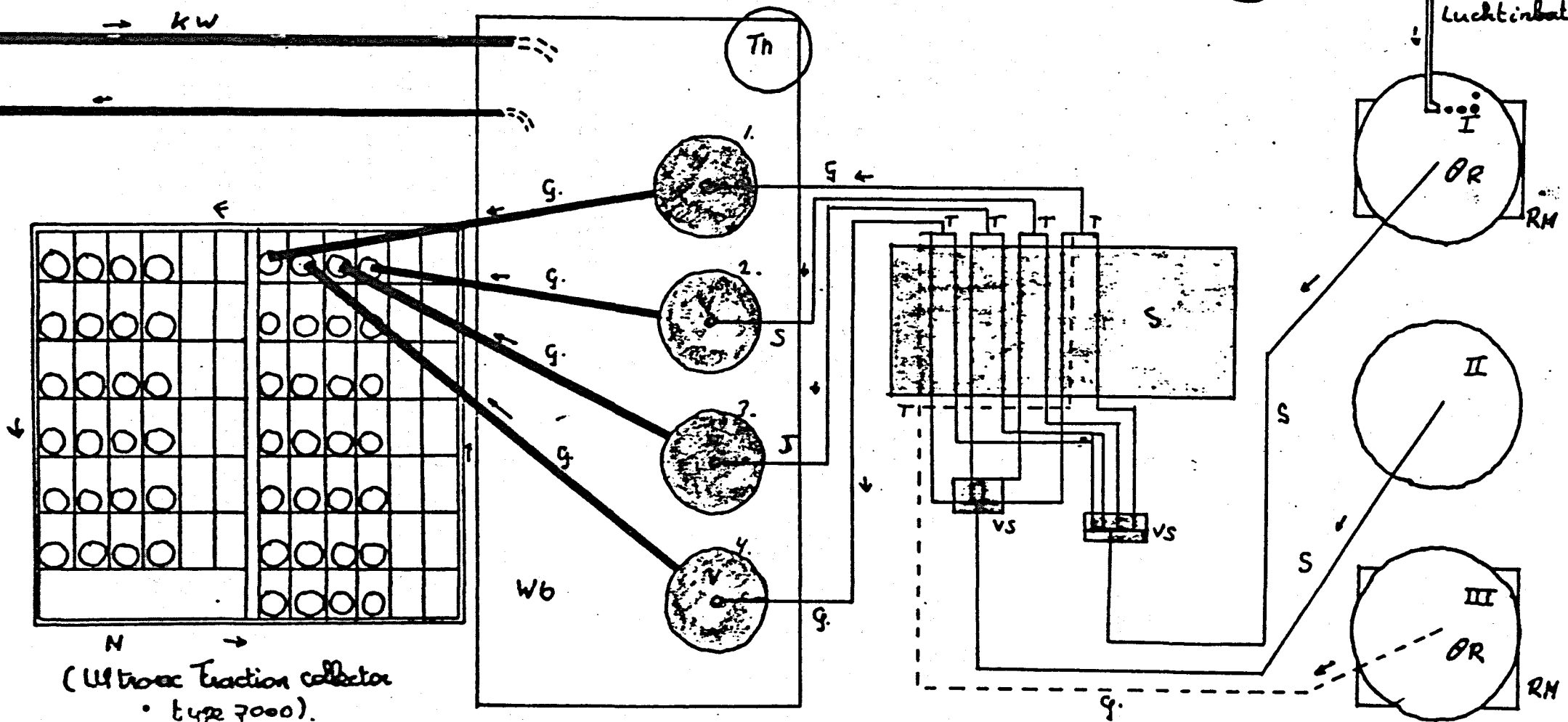
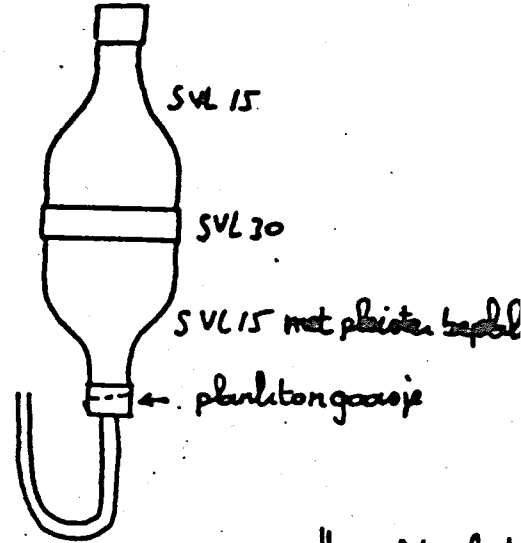
Doorstroomopstelling: zie ook fig. 3.

De doorstroomopstelling was als volgt opgebouwd:

Vanuit een erlemeyer van 5 liter gevuld met (bij de eerste proeven) gefilterd vijverwater of (bij de latere experimenten) een Taub-oplossing met een concentratie van  $6 \times 10^6 \mu^3/\text{ml}$  aan algen loopt een siliconenslang naar een slangenpomp. Evenzo loopt een slang van een 5 liter erlemeyer die alleen gefilterd vijverwater of de Taub-oplossing bevat naar de slangenpomp. Een derde slang liep van een 5 liter erlemeyer, ook gevuld met gefilterd vijverwater of de Taub-oplossing, met daarin een bepaalde concentratie dichlobenil (2 x de gewenste concentratie in de proefvaatjes), naar de slangenpomp, maar deze werd nog niet aangesloten. Deze slang werd later door een glazen buis vervangen. Via een aantal T-stukjes en stukjes met meerdere verdelingen werden de slangen uit de erlemeyers aangesloten aan de pompslangen in de slangenpomp. De pompslangen hadden een capaciteit van 0.465 ml/min. doorstroming en waren van PVC-materiaal. De pompslangen waren via T-stukjes weer zodanig gecombineerd dat naar elk van de 4 proefvaatjes gefilterd vijverwater (of de Tauboplossing) met algen

fig 3: Schematische opstelling doortroomopstelling.

- Verklaring letters:
- |                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| G - glazen buis     | V <sub>1,4</sub> - ventiel      |
| Kw - koudwater      | V <sub>s</sub> - verdichtstukje |
| MV - motorverwarmen | Wb - waterbad                   |
| R - roerder         | I - afpompsing                  |
| Rm - roermotor      | II - verdunningsopbreng         |
| S - slangenpomp     | III - dichtbenoediging          |
| T - T-stukje        |                                 |
| S - afleidendring   |                                 |
| Th - thermostaat    |                                 |



(Ultrasonic fraction collector  
type 7000).

en 'schoon' vijverwater (of Tauboplossing) gevoerd werd, half om half, zodat de concentratie aan algen in de proefvaatjes dus  $3 \times 10^6 \mu^3/\text{ml}$  was. Bij de experimenten kon het verdunningsmedium vervangen worden door het verdunningsmedium met dichlobenil, eenvoudigweg door enige pompslangen aan of af te sluiten van de T-stukjes. De afvoer van de pompslangen naar de proefvaatjes geschiedde bij de proefvaatjes waar later de dichlobeniloplossing door zou stromen doormiddel van glazen buizen, bij de overige vaatjes via siliconenslangen.

De 4 proefvaatjes waren opgebouwd uit Sovirel onderdelen (zie fig. 3) en hingen in een waterbad met een temperatuur van om en nabij de  $18^\circ\text{C}$ . Een thermostaat hield de temperatuur op peil en in het waterbad bevond zich een koperen koelwaterrooster. De vaatjes hadden een inhoud van ongeveer 35 ml en op de uitvoeropening bevond zich een planktongaasje ( $200 \mu$ ) dat met siliconenkit bevestigd was. Vanuit de vaatjes voerde een glazen buis naar een monsterverzamelaar waarvan de verplaatsingssnelheid regelbaar was. Daar mondde iedere buis boven een reageerbuis uit waar de door de opstelling gestroomde oplossing in opgevangen werd om de aantallen algen te meten. Het geheel bevond zich in een kast met 14 uur licht en 10 uur donker.

#### Principe van de doorstroomopstelling:

Het principe van deze doorstroomopstelling is dus als volgt; een bekende concentratie algenoplossing wordt door de slangenpomp uit het voorraadvat gepompt en 1 x verdund (door het verdunningsmedium) door de vaatjes gestuwd. In deze vaatjes bevinden zich Daphnia's die een hoeveelheid algen consumeren. Het aantal algen dat in de reageerbuizen opgevangen wordt, wordt gemeten en het verschil tussen de begin- en de eindconcentratie is datgene dat verondersteld mag worden door de Daphnia's gegeten te zijn. Dit wordt vergeleken met de concentraties aan algen in de vloeistof die door een vaatje zonder Daphnia's gestroomd is en die in principe dus de helft van de concentratie in het voorraadvat moet zijn. Via enkele formules (Kersting, 1978) kan dan de filtering-respektievelijk feeding-rate berekend worden. Deze uitkomsten

kunnen vergeleken worden met de gevallen waarin dichlobenil aan het vaatje wordt toegevoegd.

#### Coulter Counter/Chanalyzer:

Met behulp van deze apparaten is het mogelijk deeltjes in een oplossing te tellen. Hierbij werd op de volgende wijze gewerkt: van de te onderzoeken oplossing wordt 1 ml in een vaatje gepipetteerd en 25 ml 0.9% NaCl-2% formaline oplossing doormiddel van een spuit met een membraanfilter van 0.2  $\mu$  Sartorius toegevoegd. Dit vaatje wordt onder de telbuis gezet. Deze buis zuigt 0.1 ml op door een gaatje van 70  $\mu$  doorsnede. Aan weerszijden van het gaatje bevinden zich elektroden waartussen zich een lage weerstand bevindt in geval er alleen NaCl-oplossing opgezogen wordt. Passeert echter een deeltje (alg) de elektroden dan wordt de weerstand groter. Deze veranderde weerstand wordt omgezet in een pulsje die evenredig is met de grootte van het passerende deeltje. Het aantal pulsjes is een maat voor het aantal deeltjes die de elektroden passeren. Boven- en ondergrens van de te bepalen pulsen (de grootte van het deeltje) zijn instelbaar. Het aantal pulsjes is getalsmatig af te lezen. Verder is het mogelijk met behulp van een versterker de 'range' van de te bepalen celgrootten sterk te vergroten.

In het geval van de bepaling van de filtering-rate (concentratie algen beneden i.l.l.) werd volstaan met het tellen van het aantal deeltjes tussen 30  $\mu^3$  en 400  $\mu^3$  celgrootte, daar Kersting en Holterman (1973) geen selectiviteit vonden in de opname van deeltjes boven 30  $\mu^3$  door *Daphnia magna* en omdat er dan geen deeltjes geteld worden die de darm van de dieren al eens gepasseerd waren (deeltjes kleiner dan 15  $\mu^3$ ).

Bij de bepaling van de feeding-rate (algenconcentratie boven i.l.l.) werd daarentegen gebruik gemaakt van de Coulter Chanalyzer. Dit apparaat werkt volgens hetzelfde principe als de C. Counter, maar heeft bovendien de beschikking over een geheugen, waardoor het mogelijk is na éénmaal opzuigen door de zuigbuis snel via het instellen van boven- en ondergrenzen de aantallen deeltjes van een bepaalde klassegrootte te bepalen, wat noodzakelijk is voor de bepaling van de feeding-rate (zie ook Appendix).

Experimenten algemeen:

Bij de proeven werd over het algemeen de volgende werkwijze gevolgd: de voorraad-erlemeyers werden gevuld met respectievelijk basismedium met een bekende algenconcentratie (voor bepaling zie Appendix), een basismedium zonder algen en een basismedium met een bekende dichlobenilconcentratie. In 3 van de 4 vaatjes werden 8 of 10 Daphnia's met behulp van een zuigbuis gebracht. De algenoplossing en de verdunningsoplossing werden aangesloten en de slangenpomp in werking gesteld. De doorgestroomde oplossing werd in een grote erlemeyer opgevangen. De proef werd altijd s'middags ingezet. De dag daarop werden dan voor de verschillende vaatjes de concentraties algen in de reageerbuizen m.b.v. de Coulter Counter respectievelijk C. Channelyzer gemeten, afhankelijk van de filtering- of feeding-rate bepaling. Op een bepaald tijdstip werd van 2 vaatjes (1 + 4) de verbinding met de verdunningsoplossing verbroken en de dichlobeniloplossing aangesloten, vervolgens werden de metingen voortgezet. Onder de proef werd af en toe een dichlobenilbepaling uitgevoerd om te kijken of de gewenste concentratie ook inderdaad in de vaatjes voorkomt, ook werd de pH gemeten. Na een bepaalde periode werd de proef afgebroken, de Daphnia's werden gedood en de verschillende onderdelen van de opstelling zo goed mogelijk schoon gemaakt. Daarna kon de berekening uitgevoerd worden; zie pagina 21.



Berekening:

Voor de berekeningen van de filtering-rates werd gebruik gemaakt van de formule door Kersting (1978) ontwikkeld:

$$F = V \times \frac{(C_B - C_D)}{C_D} \Bigg/ \text{aantal Daphnia's in het vaatje}$$

waarin F = filtering-rate in ml/hr.D

V = volume dat per uur door het betreffende vaatje stroomt in ml/hr.

$C_B$  = aantal deeltjes groter dan  $30 \mu^3$  en kleiner dan  $400 \mu^3$  in het blankovaatje. (Zonder Daphnia's).

$C_D$  = idem in een vaatje met Daphnia's.

aangezien de stroomsnelheid van de gebruikte pompslangen 0.465 ml/mi was, wordt de formule:

$$F = 2 \times 28 \text{ ml/hr.} \times \frac{C_B - C_D}{C_D} \Bigg/ D = \frac{56}{D} \times \frac{C_B - C_D}{C_D}$$

Voor experimenten met voedselconcentraties boven de i.l.l. werd de feeding-rate bepaald volgens de formule:

feeding-rate = Filtering-rate x voedselconcentratie.

Hierbij dient rekening gehouden te worden met recirkulatie van deeltjes kleiner dan  $30 \mu^3$ . Rekentechnisch werd de ondergrens  $45 \mu^3$ .

$$f = V \times (C_B^{45} - C^{45}) \times \frac{C_T}{C^{45}} \Bigg/ D$$

waarin V = volume dat per uur door het betreffende vaatje stroomt in ml/hr.

f = feeding-rate in  $\mu^3$ /hr.D

$C_B^{45}$  = volume aan deeltjes groter dan  $45 \mu^3$  in het blankovaatje

$C^{45}$  = idem in een vaatje met Daphnia's.

$C_T$  = totaal volume aan deeltjes in een vaatje met Daphnia's.

( $C_x$  = 260 x aantal deeltjes (totaal) over de betreffende celgrootte-klasse). Voor een rekenvoorbeeld zie Appendix.

### Bepaling dichlobenilgehalte:

Bij experimenten waarbij de invloed van verschillende dichlobenilconcentraties op de filtering/feeding-rates bepaald werd, werden enige monsters getrokken om na te gaan of de gewenste dichlobenilconcentratie ook inderdaad in de betreffende vaatjes voorkwam, daar bekend is dat dichlobenil de neiging vertoont zich aan diverse materialen te adsorberen.

De werkwijze was hierbij als volgt:

Van de opgevangen vloeistof werd 2 ml in een 10 ml schudcilinder gepipeteerd. Hierbij werd 2 ml waterige  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en 2 ml petroleumether doormiddel van een dispensette toegevoegd, waarna minimaal 2 minuten krachtig geschud werd. De bovenstaande vloeistof (petroleumether met dichlobenil) werd met behulp van een Pasteurpipet afgezogen en in een 5 ml flesje overgebracht. Afhankelijk van de te verwachten concentratie werd dit 10, 50 of 100 maal met petroleumether verdund. Deze flesjes met de verdunde dichlobenil-petroleumether oplossingen werden opgestuurd naar het R.I.N.-Arnhem alwaar een aantal  $\mu\text{l}$  in een gaschromatograaf werd geïnjecteerd, met een werkteemperatuur van  $130^\circ\text{C}$ , een gasnelheid van 30 ml/min. en een kolomvulling van 3% OV-17 of 2% OV-17 + 15% QS-1.

De uitslag van de bepalingen bestond uit een aantal pieken, waarvan de oppervlaktes (hoogte x breedte op halve hoogte) vergeleken werden met een ijkgrafiek die het verband aangaf tussen bekende concentraties (standaard) en de oppervlaktes van de standaardconcentraties. Gebruik werd gemaakt van een schuifmaat (0.05 mm nauwkeurig).

Voor de recovery (een maat voor de nauwkeurigheid van de bepalingen) werden de waarden bepaald van de ingewogen (dus bekende) hoeveelheid dichlobenil in de 5 liter erlemeyer, per experiment. Deze hoeveelheden werden afgewogen op een analytische balans: Mettler H 54 AR.

### Uitgevoerde experimenten:

Na het inwerken met de Coulter Counter en de doorstroomopstelling, werden de volgende experimenten uitgevoerd:

1. de bepaling van het eetgedrag van *Daphnia magna* over 24 uur, teneinde na te gaan of er een cyclus optreedt in het eetgedrag. Dit is van belang om af/toename van filtering/feeding-rates niet ten onrechte aan invloeden van dichlobenil toe te schrijven (Haney, 1975; s'nachts hogere filtering-rates).
2. het volgen van het gedrag van dichlobenil in de doorstroomopstelling, om de meest geschikte materialen te gebruiken. Tevens werd gekeken hoe snel de gewenste dichlobenil-concentratie in het vaatje bereikt werd, als golf of geleidelijk.
3. experimenten met verschillende dichlobenil-concentraties, om daarvan mogelijke effecten op de filtering-rate te onderscheiden. (bij algenconcentraties beneden de i.l.l.).
4. Idem experimenten om effecten van dichlobenil op de feeding-rate te bepalen. (bij algenconcentraties boven de i.l.l.).

Voor een overzicht van de experimenten zie tabel 2.

De type 1. proeven werden 2 maal uitgevoerd over ruim 24 uur. Type 2. bestond uit 2 onderdelen die ieder 1 maal uitgevoerd werden. Deze proeven waren in feite voorbereidende experimenten, welks resultaten in de opzet van de andere typen betrokken werd.

### Beschrijving van de uitgevoerde experimenten:

Type 1: hierbij werd bij beide experimenten van 3 vaatjes gebruik gemaakt, waardoor het mogelijk was om na een acclimatisatieperiode van 4 uur de proef toch ruim over een etmaal te laten verlopen. De monsters werden met tussenperioden van één of een half uur gemeten. Een vervelend bij-effect bij deze experimenten en later ook bij de andere experimenten was het optreden van algenaanslag in de T-stukjes en de siliconenslangen en een bruine aanslag in de pomp-slangen.

Type 2: deze experimenten werden om de volgende redenen uitgevoerd; ten eerste om te kijken waar dichlobenil in de doorstroomopstelling verdwijnt, het was gebleken uit enkele proefexperimenten dat

ruim 90% van de verwachte dichlobenilconcentraties in de reageerbuizen niet gevonden werd en dus ergens geabsorbeerd moest zijn. Ten tweede om na te gaan of de algen soms invloed uitoefenen op het dichlobenilgehalte, daar het verschijnsel beschreven is dat algen in staat zijn gechloreerde koolwaterstoffen (DDT, Clophen A) te absorberen (Södergren, 1973) en waardoor een hoeveelheid DCB misschien niet gemeten wordt met de bestaande methode. Deze problemen werden onderzocht in proef 2A. En op de derde plaats werd gekeken hoe snel dichlobenil in de vaatjes komt; proef 2B. Bij proef 2A werden 4 vaatjes gebruikt: vaatje 1 kreeg een siliconen toevoer zonder algen, vaatje 2 een siliconen toevoer met algen, vaatje 3 een glazen toevoer zonder algen en vaatje 4 een glazen toevoer met algen. De dichlobenilconcentratie was 1 ppm. Het experiment duurde 3 dagen. Zowel voor de inlaat van de vaatjes als uit de reageerbuizen werd de DCB-concentratie gemeten. Bij experiment 2B werd 4 ppm dichlobenil naar de vaatjes gevoerd waarin zich algen bevonden en met tussenpozen van 5 min. en later 15 min. de dichlobenilconcentratie gemeten na aansluiting van het DCB.

Type 3 en 4: bij deze experimenten werd van 4 vaatjes met 8 à 10 Daphnia's gebruik gemaakt. De proeven werden de middag voor de experimenteerddag ingezet zodat de dieren een nacht konden acclimatiseren. Drie vaatjes kregen Daphnia's: de vaatjes 1 en 4 waarop later dichlobenil werd aangesloten (aangegeven met een peil in de grafieken) en vaatje 2 met Daphnia's die geen effect van dichlobenil zouden ondervinden. Vaatje 3 kreeg geen Daphnia's en vormde de blanco. Ook bij deze experimenten traden vaak algenaanslag en bruine aanslag op, reden waarom ik op een gegeven moment niet meer vijverwater als medium gebruikte maar een Taub-oplossing (voor recept zie Appendix), een voedingsoplossing waar Daphnia's goed in kunnen leven en bovendien was er dan geen risico meer van schadelijke elementen in het vijverwater (bij sommige proeven met vijverwater aten de Daphnia's helemaal niet, bij Taub is dit nooit gebeurd). Tegen de algenaanslag was de enige remedie het tikken tegen het glas, waarna de zaak schoonspoelde maar de waarnemingen op dat moment onbruikbaar waren.

De maximale concentratie dichlobenil die getest werd was 4 ppm en de reden daarvoor was dat het oplossen van 8 ppm dichlobenil (voor het voorraadvat) veel tijd vergt (bijna een week) en dat dan nog vaak klonten in het medium zichtbaar waren. De experimenten duurden nooit langer dan 7 à 8 uur daar tegen die tijd de voorraaderlemeyers leeg waren en de aan- en afvoerslangen/buizen met algen begroeid raakten.

Tabel 2: Overzicht van de uitgevoerde experimenten.

Type	proef	tijdsd.	Daphn./	Temp.	medium	alg.conc.	DCBconc.	bloot.	duur	
	(graf.)	(uur)		(°C)		( $\mu^3/l$ )	(ppm)	(uur)		
1	1	27	8	18	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	-	-		
	2	30	6	18	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	-	-		
2	3	3 x 24	-	19	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	1	-		
	4	2	-	18	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	4	-		
3	5	8	8	18	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	0.5	5.75		
	6	7.75	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	1	5.5		
	7	8	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	1	5.5		
	8	7.5	8	18	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	2	4.5		
	9	8.5	10	19	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	2	6		
	10	8 + 5	10	19	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	2	6 + 5		
	11	7.75	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	2	5.5		
	12	8	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	2	5.75		
	13	7.5	8	18	vijverw.	$3 \cdot 10^6$	3	5.5		
	14	7.5	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	3	5		
	15	8	8	19	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	3	5.75		
	16	8.5	8	18	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	4	6		
	17	8	8	18	Taubm.	$3 \cdot 10^6$	4	5.75		
	4	18	7.5	8	19	Taubm.	$4 \cdot 10^6$	-	-	
		19	8.5	8	19	Taubm.	$4 \cdot 10^6$	1	5.5	
		20	8.5	8	18	Taubm.	$4 \cdot 10^6$	2	5.5	
		21	8.5	8	19	Taubm.	$4 \cdot 10^6$	3	6	

## 5. Resultaten:

De resultaten zijn in grafiekvorm weergegeven. De aangegeven punten in de grafieken die de resultaten aangeven van de bepalingen aan de filtering- respektievelijk feeding-rates zijn bewerkt via het zogenaamde voortschrijdend gemiddelde, d.w.z. dat de waarde  $x_i$  die de Coulter Counter/Channelyzer voor een monster aan deeltjes aangaf gladgetrokken werd met de voorafgaande waarde  $x_{i-1}$  en de daaropvolgende waarde  $x_{i+1}$  via de formule:

$$x_{ig} = \frac{x_{i-1} + x_i + x_{i+1}}{3}$$

$x_i$  werd verkregen door het gemiddelde van 3 opeenvolgende tellingen van de Coulter Counter te nemen, dit omdat er een grote variatie in de tellingen zit van één monster.

Voor een voorbeeld van het 'smoothen' zie grafiek 5 en Bijlagen. Voor een rekenvoorbeeld zie Appendix.

### Experimenten type 1: grafiek 1 en 2.

Uit de verkregen resultaten blijkt dat er onder de heersende omstandigheden geen cyclus in het eetgedrag van *Daphnia magna* op te treden. Nog bij de overgang licht-donker (21.00) nog bij de overgang donker-licht (7.00) bleken er belangrijke verschuivingen in de filtering-rate op te treden. De filtering-rate bleef over het algemeen vrij konstant en tussen de 2 à 3.5 ml/hr. *Daphnia* schommelen. Deze resultaten geven de aanleiding te veronderstellen dat waargenomen effecten bij de type 3 en 4 experimenten op naam van dichlobenil geschreven mogen worden.

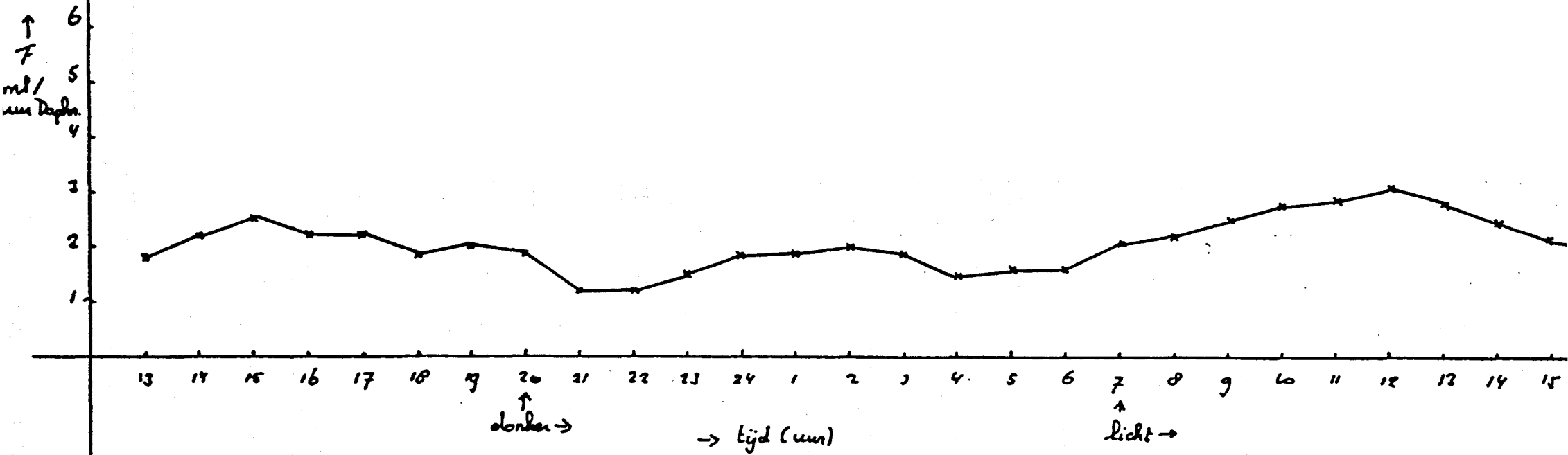
### Experimenten type 2: grafieken 3 en 4 en tabel 3.

Het bleek dat bij experiment 2A (grafiek 3 en tabel 3) de siliconen-slangen veel meer dichlobenil adsorberen dan de glazen buizen. In de vaatjes gaat weinig dichlobenil verloren ondanks de aanwezigheid van het siliconengaasje. De aanwezigheid van algen heeft geen grote invloed op de dichlobenilconcentratie. Bij alle combinaties bleek dat er in de loop der tijd verzadiging van het materiaal optreedt, zodat na 3 dagen weinig dichlobenil geadsorbeerd wordt.

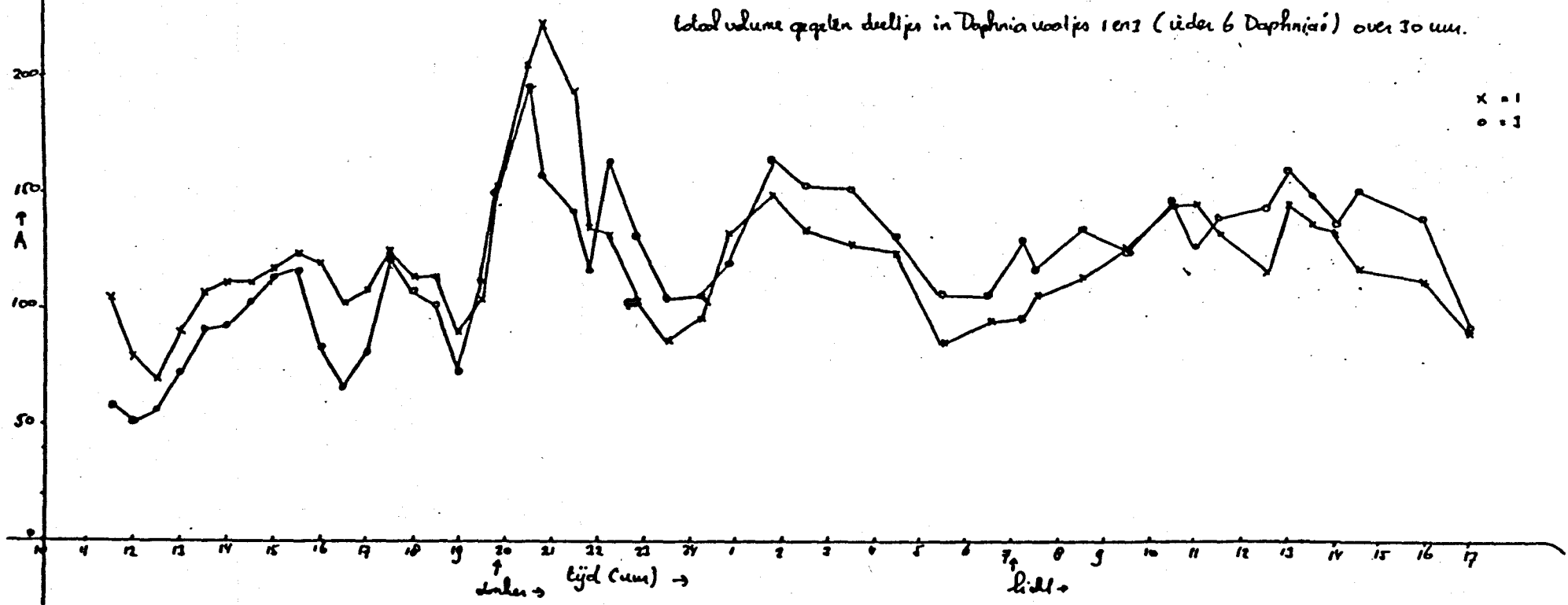
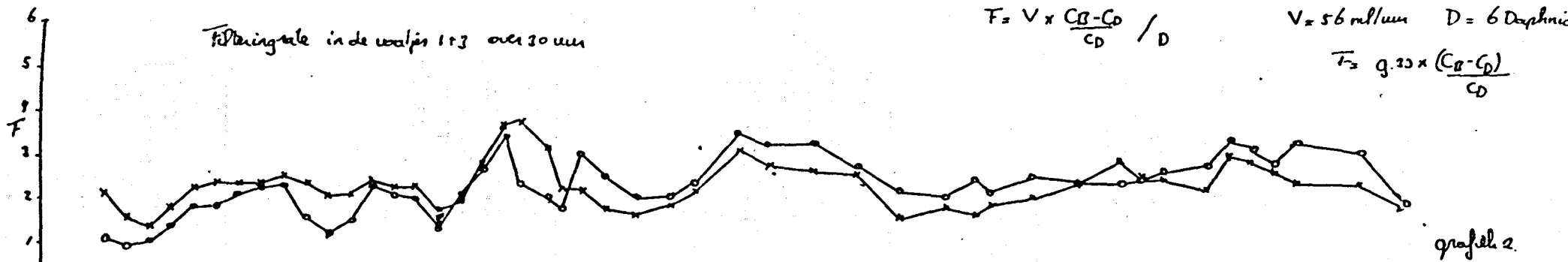
grafiek:

Filtreringrate over 29  $\mu\text{m}$  van *Daphnia magna*. [algen] =  $3 \cdot 10^6 \mu\text{l/ml}$

( $\sigma$  *Daphnia*)







Tabel 3: Concentratieverloop dichlobenil in de doorstroomopstelling.  
Concentratie DCB in voorraadflles: 2 ppm, in de vaatjes  
verwacht: 1 ppm.

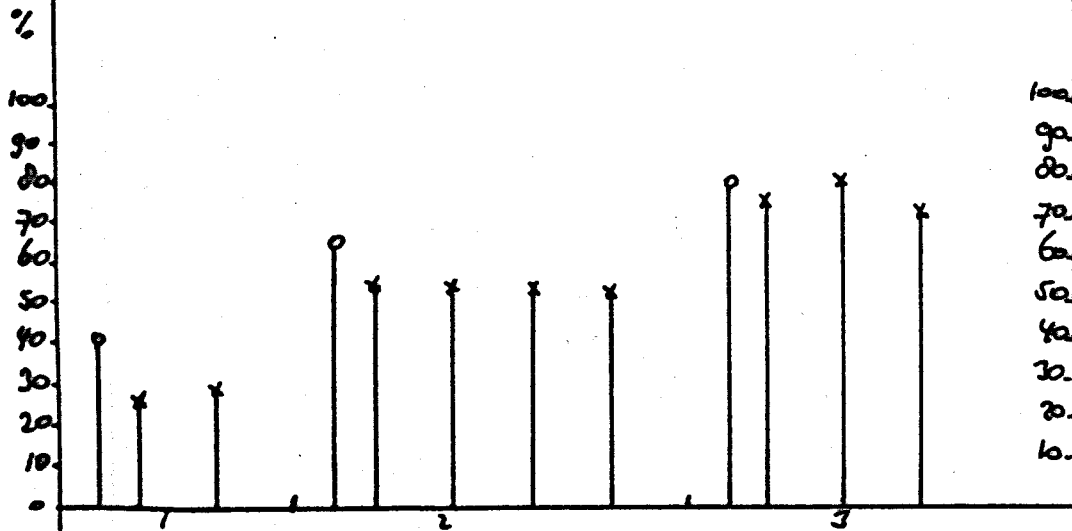
vaatje	dag	ppm	ppm	recovery	ppm	ppm	verlies	ppm	voor	verlies
	bep.	flles	flles	%	vaatje	vaatje	%	het	vaatje	%
		verw.	gem.		verw.	gem.		vaatje		
1	1.1	2	1.6	80	0.8	0.2	75	0.32		60
slangen	1.2					0.22	73			
toevoer	2.1					0.43	46	0.5		37
zonder	2.2					0.43	46			
algen	2.3					0.44	45			
	2.4					0.42	47			
	3.1					0.59	26	0.63		21
	3.2					0.65	19			
	3.3					0.54	32			
2	1.1					0.16	79	0.22		72
slangen	1.2					0.17	79			
toevoer	2.1					0.28	65	0.37		54
met	2.2					0.36	55			
algen	2.3					0.37	54			
	2.4					0.35	56			
	3.1					0.44	45	0.43		46
	3.2					0.40	50			
	3.3					0.35	55			
3	1.1					0.55	31	0.61		24
glazen	1.2					0.56	30			
toevoer	2.1					0.82	0	0.7		12
zonder	2.2					0.81	0			
algen	2.3					0.77	4			
	2.4					0.85	0			
	3.1					0.70	12	0.8		0
	3.2					0.80	0			
	3.3					0.75	6			
4	1.1					0.58	42	0.73		9
glazen	1.2					0.63	37			
toevoer	2.1					0.68	14	0.80		0
met	2.2					0.80	0			
algen	2.3					0.73	9			
	2.4	2	1.6	80	0.8	0.73	0			

Vervolg tabel 3:

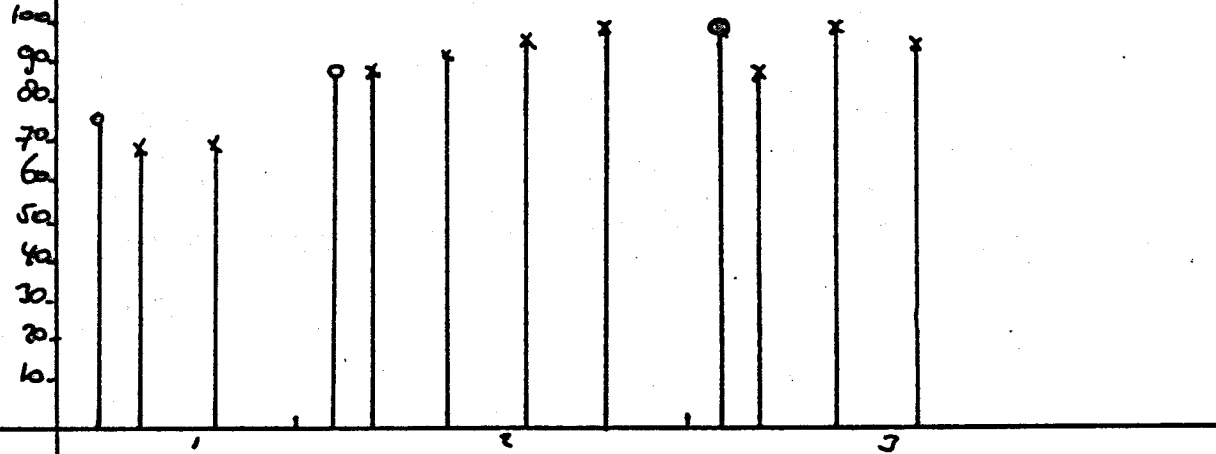
vaatje	dag bep.	ppm fles verw.	ppm fles gem.	recovery %	ppm vaatje verw.	ppm vaatje gem.	verlies %	ppm voor het vaatje	verlie &
4	3.1	2	1.6	80	0.8	0.83	0	0.80	0
	3.2					0.79	1		
	3.3					0.73	9		

vatje 1: slangen toevan zonder algen

grafiek 3



vatje 3 glasentoeven zonder algen

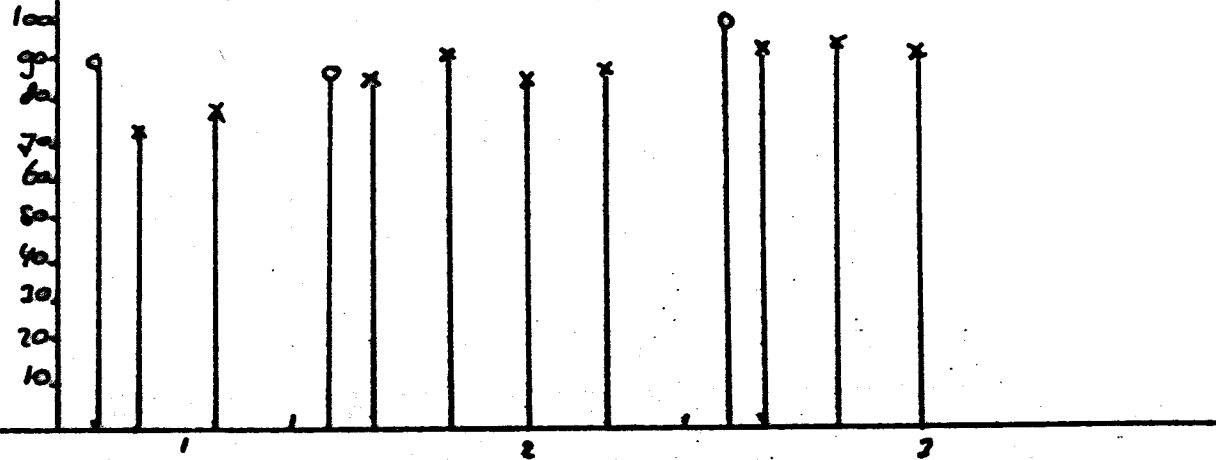
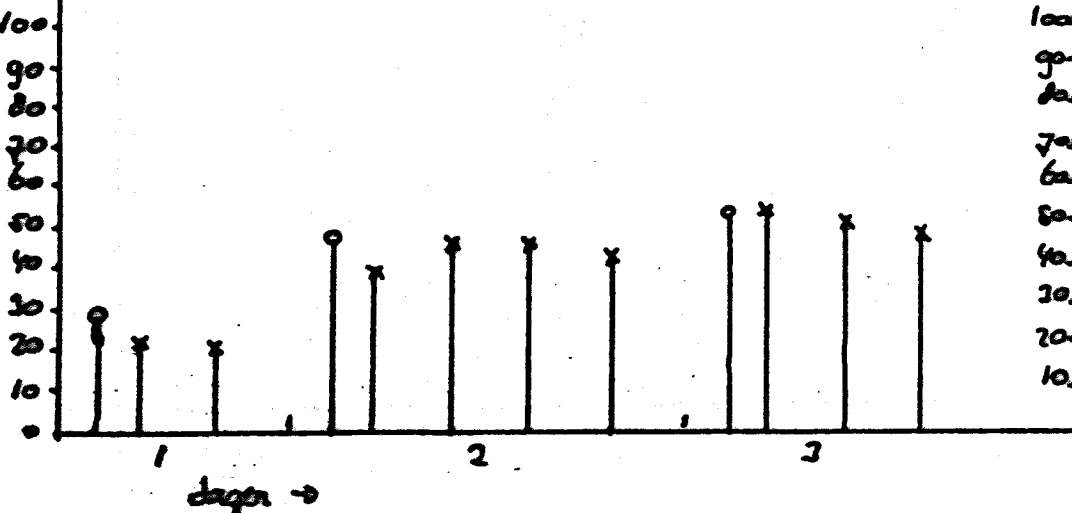


vatje 2: slangen toevan met algen

vatje 4 glasentoeven met algen.

van de flessenwachting.

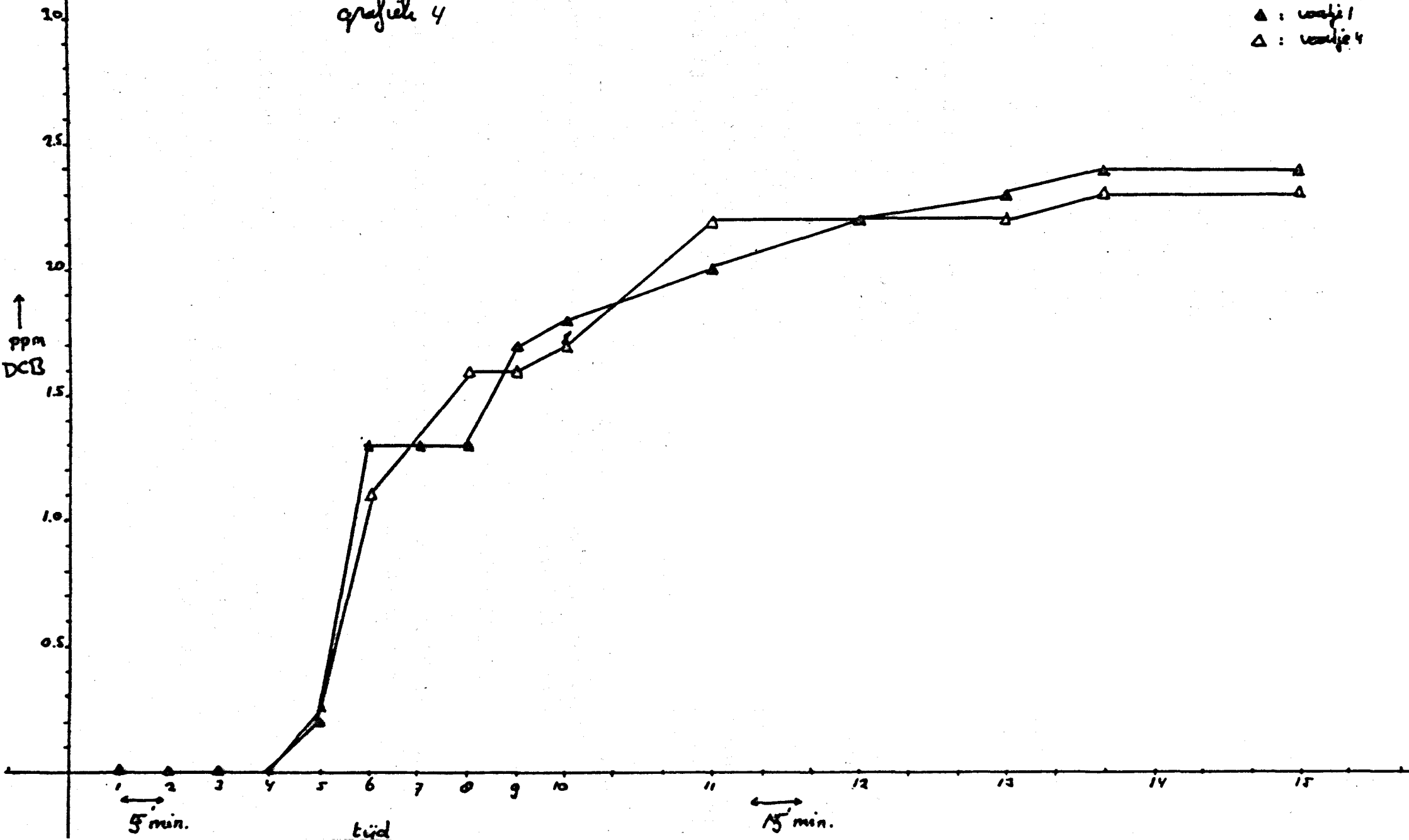
o = voor dat vatje  
x = gemeten percentage van de verwachte conc. [ $= 1 \text{ ppm}$ ]



Verloop DCB-gehalte na toevoeging van 4 ppm in de vaatjes 1 en 4 in de loop der tijd.

grafiek 4

▲ : vaatje 1  
△ : vaatje 4



Deze resultaten gaven aanleiding tot het gebruik van glas voor de dichlobeniltoevoer en de veronderstelling dat algen het dichlobenilgehalte kunnen beïnvloeden werd verworpen.

Uit experiment 2B bleek dat de concentratie dichlobenil in de vaatjes slechts geleidelijk toeneemt en pas na ruim een uur op het gewenste niveau komt, m.a.w. de effecten van dichlobenil zullen waarschijnlijk in de tijd afhankelijk zijn van het concentratieverloop.

### Experimenten type 3: grafieken 5 t/m 18.

Uit deze proeven blijkt dat dichlobenil over het algemeen een negatief effect uitoefent op de filtering-rate van *Daphnia magna*, maar dat dit effect afhankelijk lijkt te zijn van de concentratie en over kortere of langere tijd binnen de proefperiode kan duren. Ook bij experimenten met overeenkomende dichlobenilconcentraties kunnen de effecten uiteenlopen. In het hiernavolgende overzicht zullen de effecten naar oplopende concentraties besproken worden. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de gewenste concentraties dichlobenil in de vaatjes 1 en 4 ondanks het zoveel mogelijk gebruik maken van glasmateriaal lang niet altijd bereikt werd. In tabel 4 is een overzicht gegeven van de gewenste dichlobenilconcentraties in de vaatjes 1 en 4 van de doorstroomopstelling en de gemeten concentraties in die vaatjes. Hieruit blijkt dat de recovery die aan de hand van de bekende (ingewogen) concentraties bepaald werd goed was; 85-100%, met slechts één enkele uitschieter omlaag. Uit deze tabel blijkt verder dat de gemeten concentraties in de vaatjes meestal tussen de 60 en 80% van het gewenste niveau liggen overeenkomstig de resultaten van proef 2A die ook te zien gaven dat bij het gebruik van glazen materiaal ongeveer 40% van het dichlobenil 'verdwijnt'. Met dit in gedachten kan men de effecten van de verschillende concentraties beschouwen.

#### 0.5 ppm: 1 x uitgevoerd met een Taubmedium (grafiek 5)

Over de effecten van deze concentratie kan ik kort zijn; er lijkt op uitzondering van een snelle halvering van de filtering-rate in vaatje 4 geen effect op te treden. Bovendien blijft de fil-

Tabel 4: Dichlobenilbepaling bij de experimenten type 3 en 4.

type	grafiek	ppm fles gedoceerd	ppm fles gemeten	recovery %	ppm vaatje verwacht	ppm vaatje gemeten		verlies %		
						1	4	1	4	
3	5	1	1	100	0.5	0.4	0.43	20	14	
	6	2	2	100	1	0.56	0.59	44	41	
	7	2	1.9	95	1	0.65	0.54	35	46	
	8	4	4	100	2	1.7	1.5	15	25	
	9	4	4.1	100	2	1.4	1.6	30	20	
	10	4	4.1	100	2	1.7	1.6	15	20	
	11	4	3.7	93	2	1.4	1.37	30	35	
	12	4	3.5	88	2	1.5	1.5	25	25	
	13	6	2.1	35	3	0.56	0.77	80	74	
	14	6	5.2	87	3	1.98	1.75	34	42	
	15	6	5.9	98	3	2	1.9	34	35	
	16	8	6.8	85	4	3.8	2.6	5	35	
	17	8	8	100	4	2.4	2.6	40	35	
	4	19	2	2	100	1	0.6	0.6	40	40
		20	4	4	100	2	1.3	1.4	35	30
		21	6	6	100	3	2.3	2.4	23	20

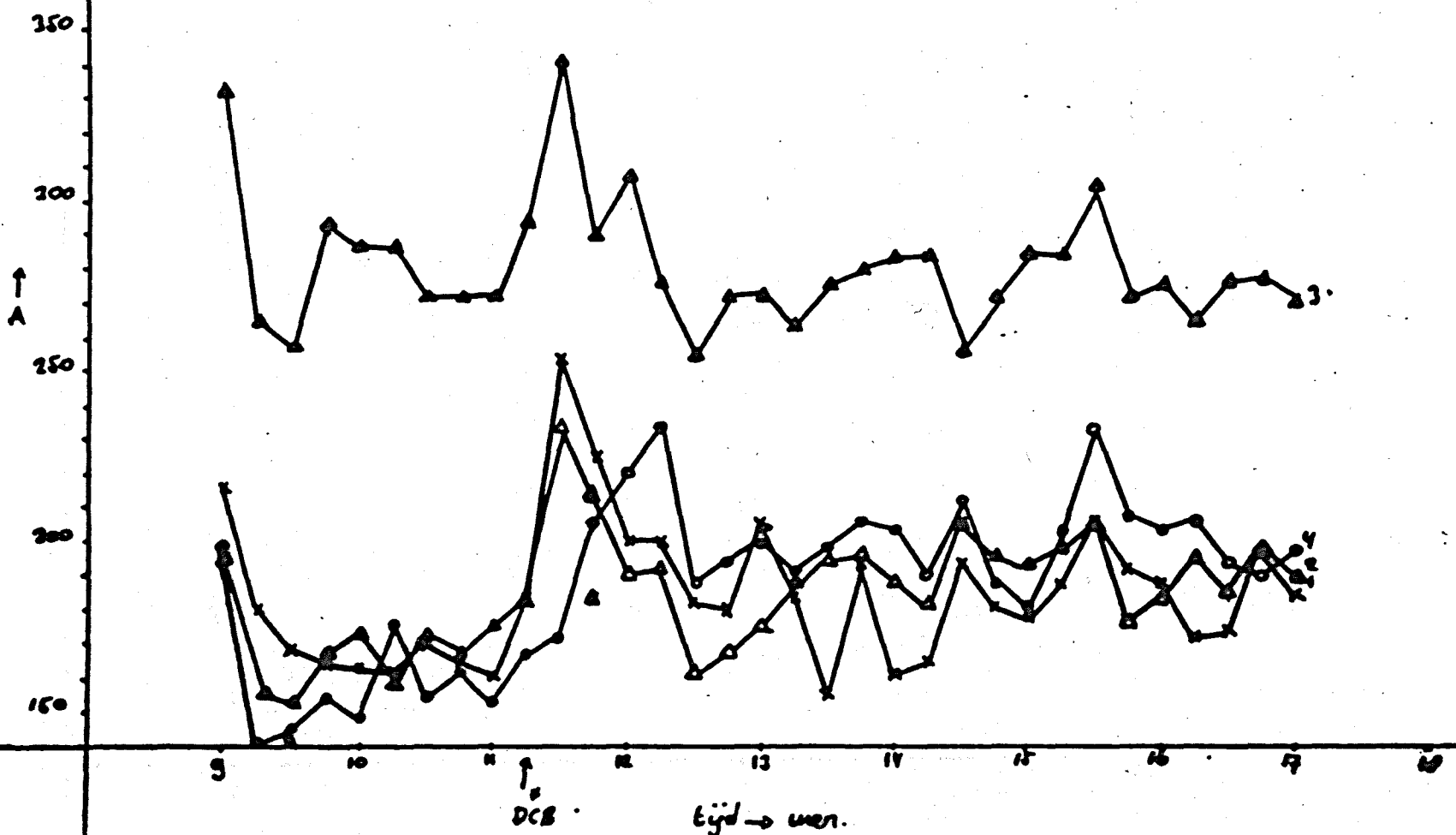
Gemiddelde recovery = 92.3%

Coulter Counter, aantallen deeltjes (A) geleid in 0,1 ml waterstof uit de vooljes 1 t/m 4 bij grafiek 5

[DCB] toegevoegd vanaf 11.15 = 0,5 ppm

x: voolje 1      Δ: voolje 2  
o: " 4      ▲: " 3

1, 2 en 4: ∅ Daphnia's, 3 geen Daphnia's  
1 en 4 met DCB vanaf 11.15





grafiek 5 (Bijlage).

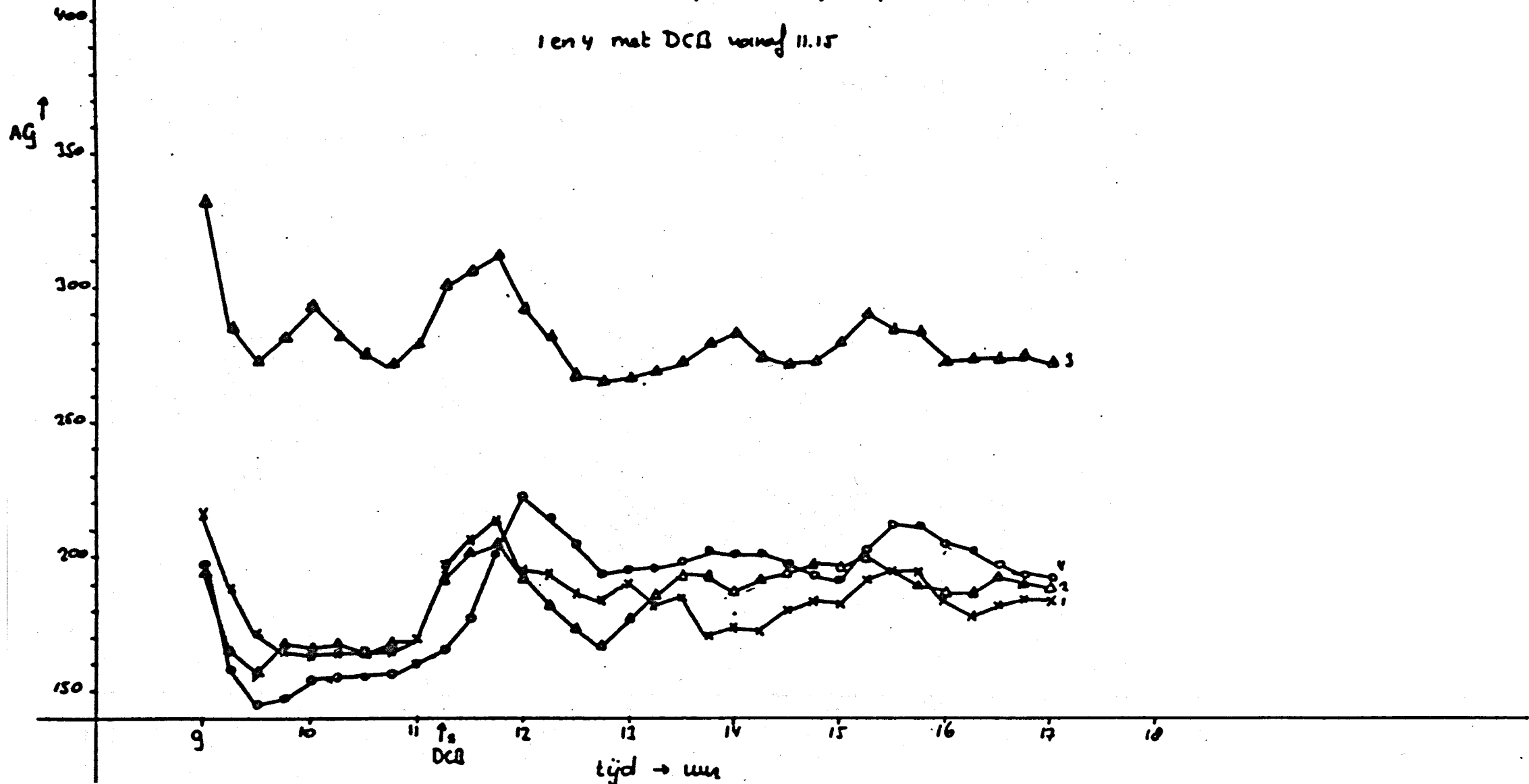
Counter Counts : aantallen deeltjes "gesmoethed" (AG) in 0,1 ml vloeistof uit de waalpie 1 t/m 4, grafiek 5

[DCB] "toegevoegd vanaf 11.15 = 0,5 ppm.

x = waalpie 1    Δ = waalpie 2  
 o = " 4    ▲ = " 3

1, 2 en 4 met Daphnia's (D), 3 geen Daphnia's

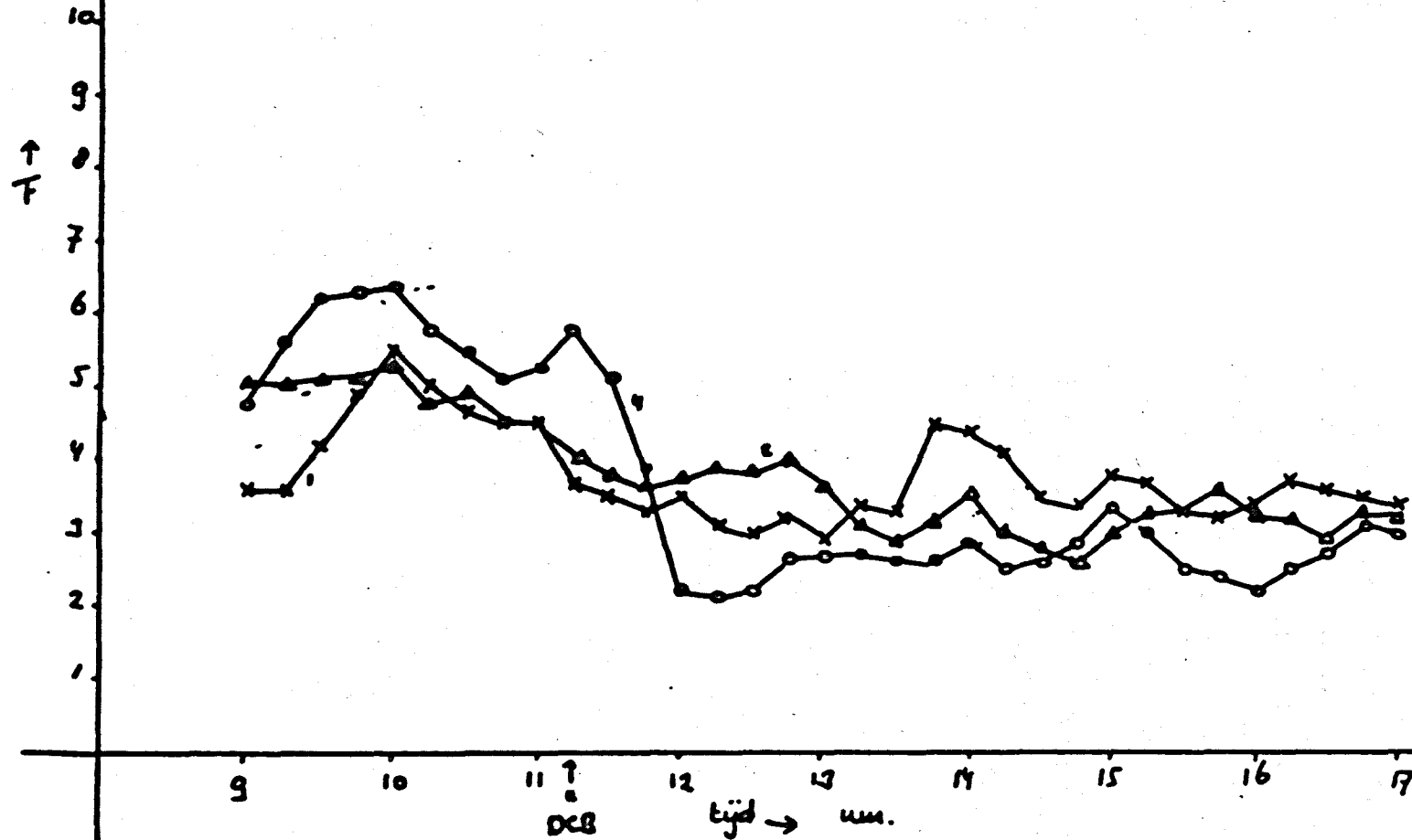
1 en 4 met DCB vanaf 11.15



grafiek 5 Filteringsrate van *Daphnia magna* per ualje in ml/uur *Daphnia*

[DCB] toegevoegd vanaf 11.15 = 0.5 ppm → ualje 1 (x) en 4 (o). (ualje 2 (Δ) = blanco).  
 [DCB] bepaald = ualje 1: 0.4 ppm } (recovery: 100%)  
 " 4: 0.43 "

$$F = V \times \frac{C_B - C_D}{C_D} / D$$



tering-rate van vaatje 4 in de buurt van vaatje 2; de onbehandelde dieren. De gemeten concentratie dichlobenil in de vaatjes was 0.40 in vaatje 1 en 0.43 in vaatje 4 met een recovery van 100%. De Daphnia's waren 7 dagen oud.

1 ppm: 2 x uitgevoerd, beide met een Tauboplossing (grafieken 6 en 7). Deze concentratie is een duidelijk voorbeeld van het hierboven beweerde, dat gelijke concentraties heel verschillende effecten kunnen veroorzaken. In het geval van grafiek 6 blijkt na een half uur een effect op te treden, de filtering-rate die tussen de 3.5 à 5 ml/hr.D schommelt neemt geleidelijk af tot 1 à 2 ml/hr.D na 1.5 uur, waarna weer een herstel lijkt op te treden. Na 3 uur is er geen verschil meer met de filtering-rate van de niet-blootgestelde dieren. De gemeten concentratie dichlobenil in de vaatjes was 0.56 in vaatje 1 en 0.59 in vaatje 4 (ppm) met een recovery van 100%. De Daphnia's waren 5 dagen oud.

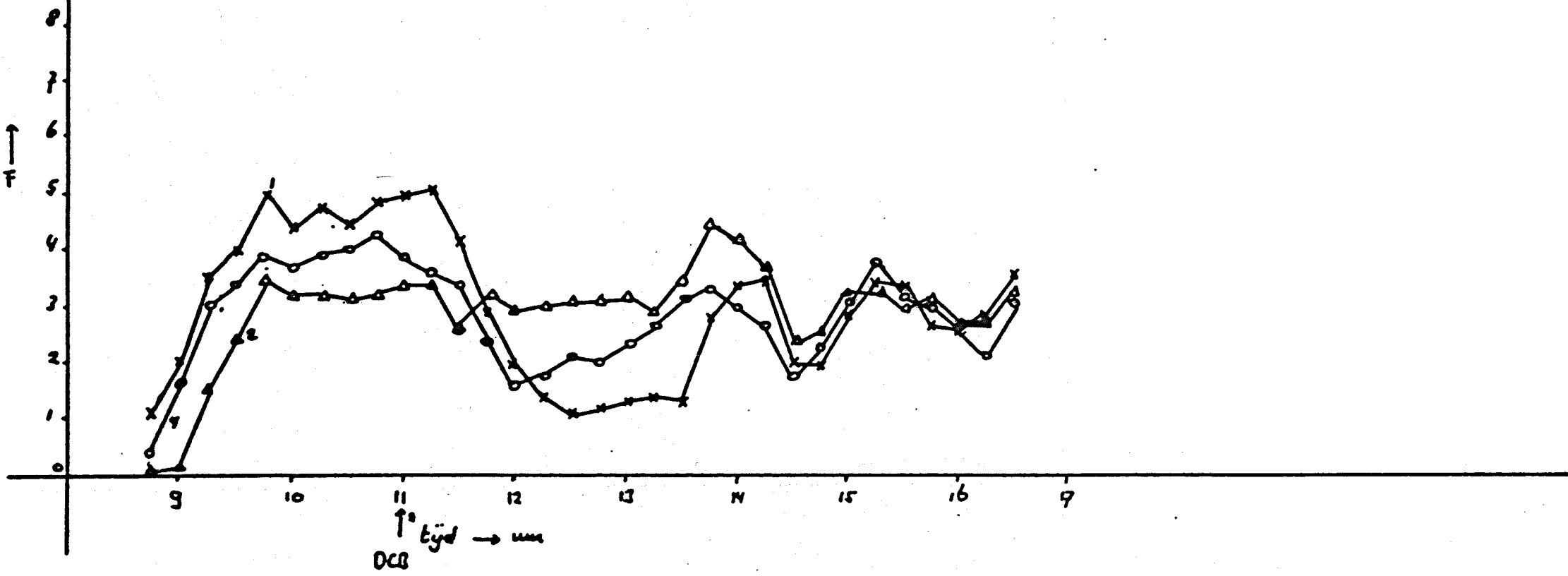
Daarentegen was de reactie in grafiek 7 veel heftiger en langduriger; na 1 uur is de filtering-rate beneden de 1 ml/hr.D en na 3.5 uur zelfs een poosje negatief (uitstoten van deeltjes door de Daphnia's). De gemeten concentratie dichlobenil was 0.65 ppm voor vaatje 1 en 0.54 ppm voor vaatje 4, de recovery: 95%. De Daphnia's waren 7 dagen oud.

Aangezien de DCB-concentraties tussen de twee experimenten niet veel verschillen zou het verschil in leeftijd misschien het verschil in effect kunnen verklaren. Zekerheid daarover heb ik echter niet.

grafiek 6 Filtring rate van *Daphnia magna* per uur in ml / uur *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.00 = 1 ppm in vaasje 1 (x) en 4 (o). vaasje 2 (Δ) = blanco

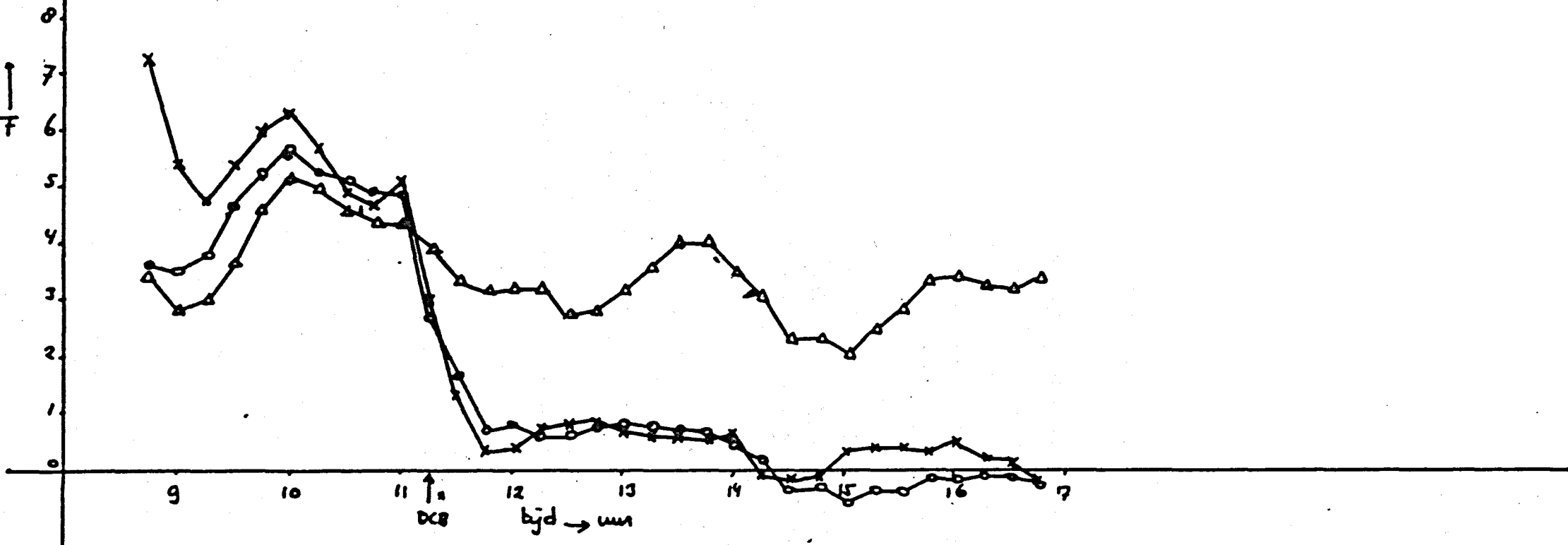
[DCB] depaalt = vaasje 1: 0.56 ppm Recovery = 100%  
 " 4: 0.59 "



grafiek 7 Filteringsrate van *Daphnia magna* per uur in ml/uur *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.15 = 1 ppm in vialje 1 (x) en 4 (o). vialje 2 (Δ) = blank

[DCB] bepaald = vialje 1: 0.65 ppm Recovery = 95%  
 .. 4: 0.54 ..



2 ppm: 5 x uitgevoerd; 3 x met vijverwater (grafieken 8,9 en 10) en 2 x met een Tauboplossing (grafieken 11 en 12).

Ook bij deze concentratie worden verschillende effecten waargenomen, waarvan de oorzaak niet duidelijk is.

Grafiek 8 vertoont een duidelijk effect, reeds 1 uur na toediening van dichlobenil is de filtering-rate in beide vaatjes negatief en blijft vervolgens rond de 0-waarde schommelen. De gemeten concentratie dichlobenil was 1.7 ppm voor vaatje 1 en 1.5 ppm voor vaatje 4, de recovery 100%, de Daphnia's 5 dagen oud.

Een minder duidelijk beeld vertoont grafiek 9, vooral omdat de filtering-rates van de DCB-vaatjes konstant lager waren dan het blanco-vaatje. De gemeten dichlobenilconcentratie was 1.4 ppm (vaatje 1) en 1.6 ppm (vaatje 4), de recovery 100% en de Daphnia's waren 5 dagen oud.

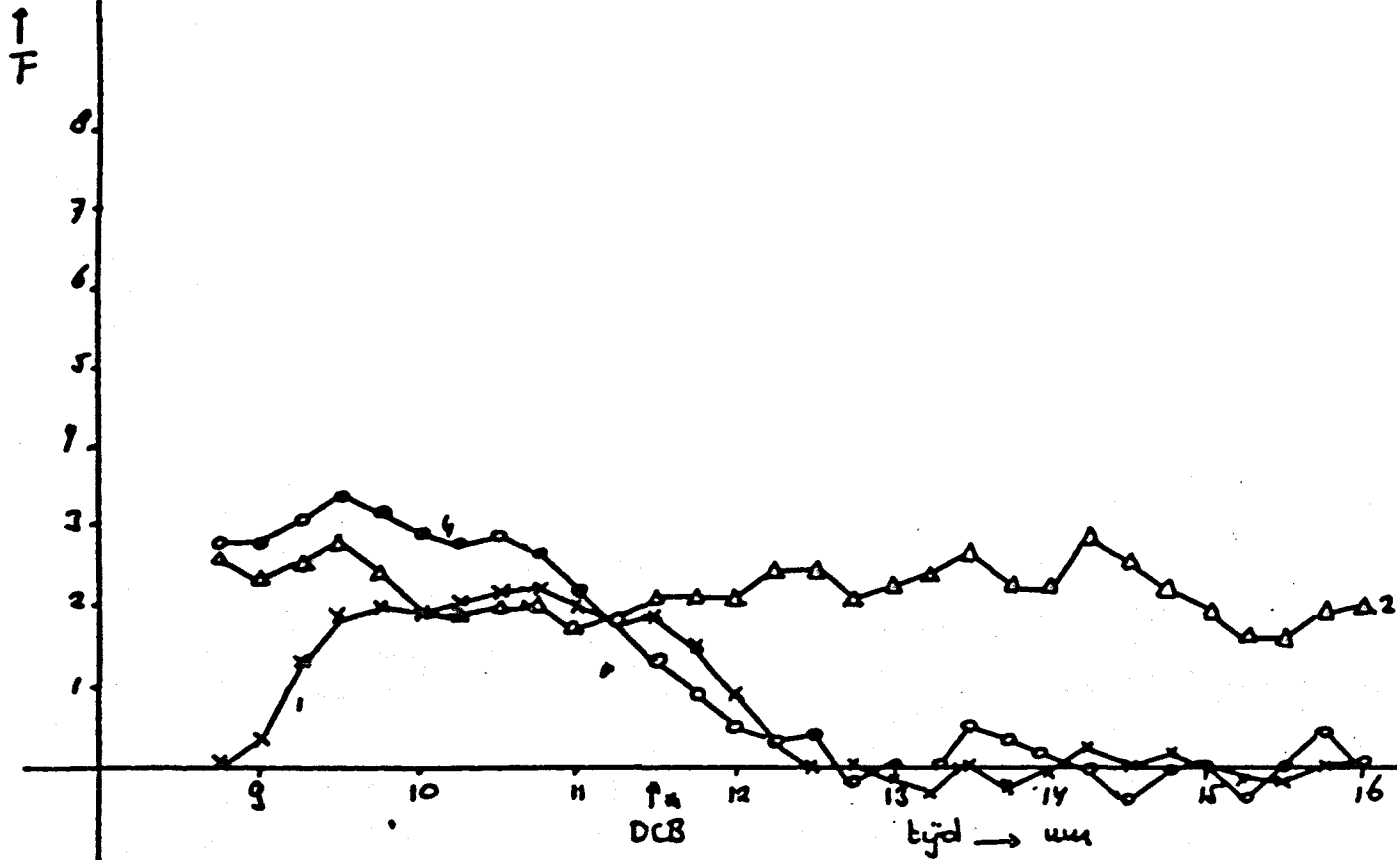
Totaal anders zijn de effecten bij de grafieken 10, 11 en 12. Bij elk van deze proeven treedt snel een heftig effect op met een snelle afname van de filtering-rate, maar tevens treden beelden van herstel op; konstant in beide vaatjes (grafiek 10) of tijdelijk in één van beide vaatjes (grafieken 11 en 12) met een neiging tot herstel aan het eind van de proef. De gemeten concentratie dichlobenil was voor grafiek 10: 1.7 ppm voor vaatje 1 en 1.6 ppm voor vaatje 4, recovery 100% en de Daphnia's 7 dagen oud. Voor grafiek 11: 1.4 ppm (vaatje 1) en 1.3 ppm (vaatje 4), recovery 93% en 7 dagen oude Daphnia's.

Voor grafiek 12: concentratie dichlobenil 1.5 ppm (vaatje 1) en 1.5 ppm (vaatje 4), een recovery van 88% en 7 dagen oude Daphnia's. Noch leeftijd van de Daphnia's, noch grote concentratieverschillen, noch het verschil in medium lijken de waargenomen variabiliteit te kunnen verklaren.

grafiek 8 Filtratie rate van 8 Daphnia magna per vaatje in ml / uur Daphnia.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.30 = 2 ppm in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 (Δ) = blanco

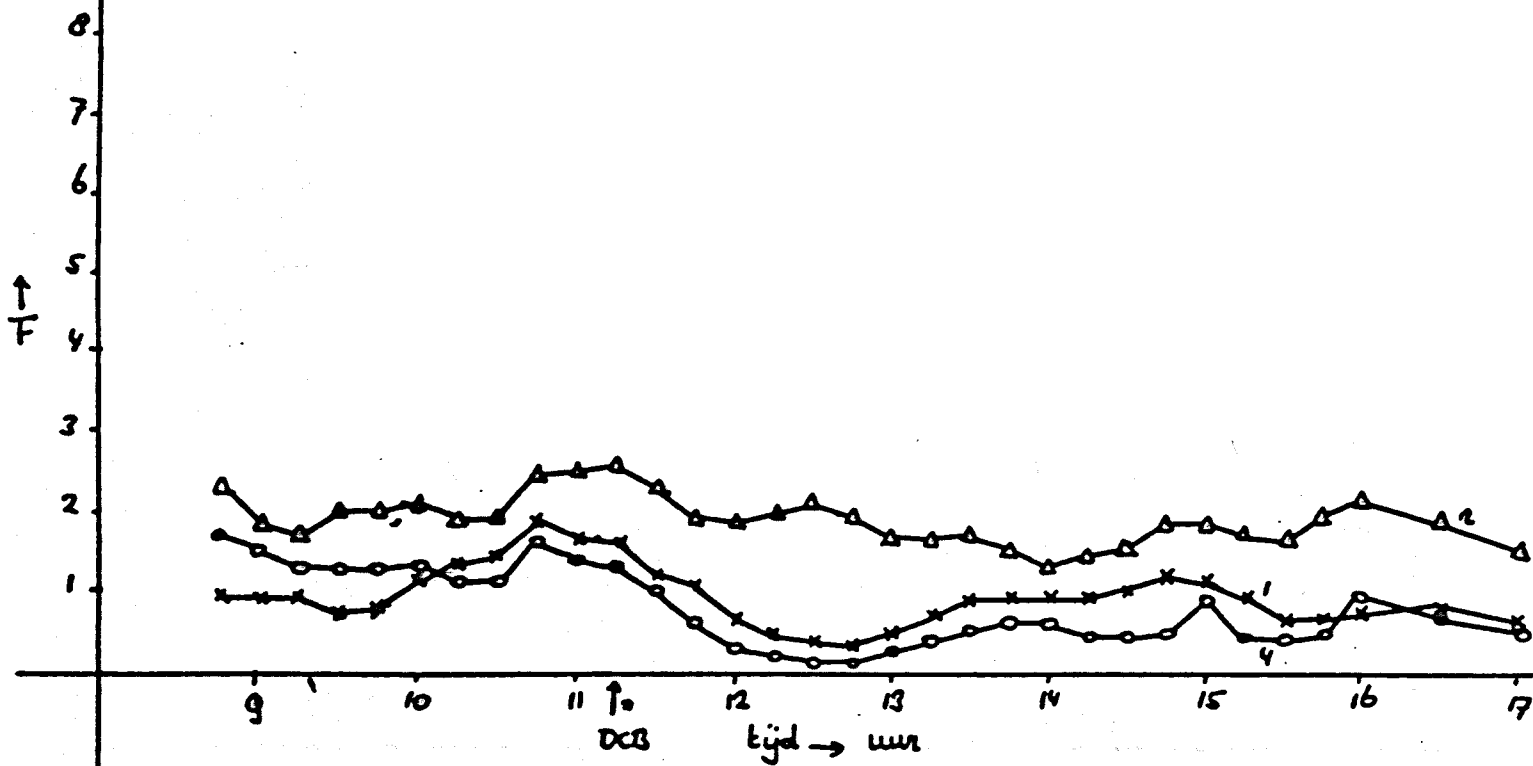
[DCB] bepaald = vaatje 1: 1.7 ppm    Recovery 100%  
                          " 4: 1.5 "



grafiek 9 Filtringrate van 10 Daphnia magna per vaatje in ml / uur Daphnia.

[DCB] toegevoegd\* vanaf 11.15 = 2 ppm in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 (Δ) = blanco

[DCB] bepaald = vaatje 1: 1.4 ppm Recovery: 100%  
 " 4: 1.6 "





grafiek 10 Filtringrate van 10 Daphnia magna per waasje in ml/uur Daphnia.

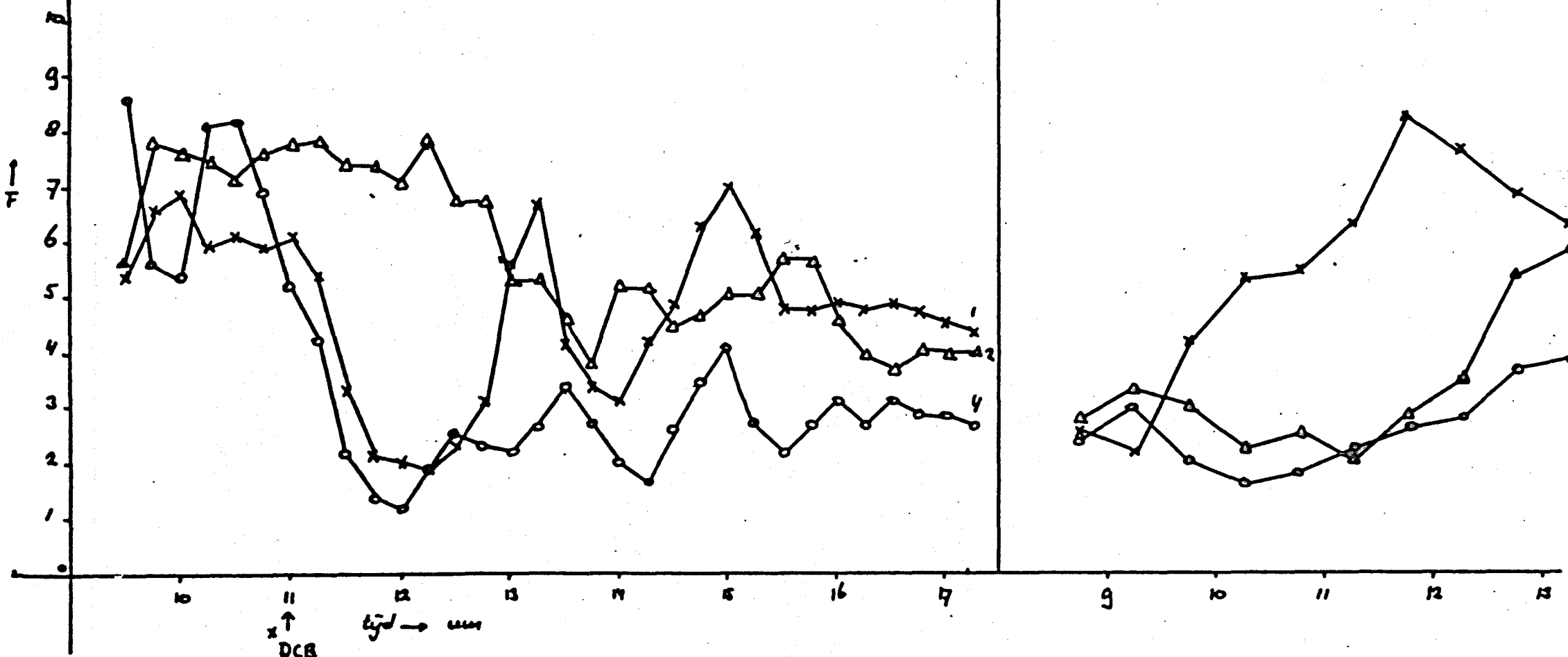
[DCB] toegevoegd vanaf 11.00 = 2 ppm in waasje 1 (x) en 4 (o). waasje 2 (Δ) is blanco.

[DCB] bepaald = waasje 1, 1.7 ppm  
 " 4, 1.6 "

Recovery = 100%

dag 1

dag 2



grafiek 11 Filtringrate van *Daphnia magna* per uur in ml/uur *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.00 = 2 ppm in waaije 1 (x) en 4 (o). waaije 2 ( $\Delta$ ) = blanco

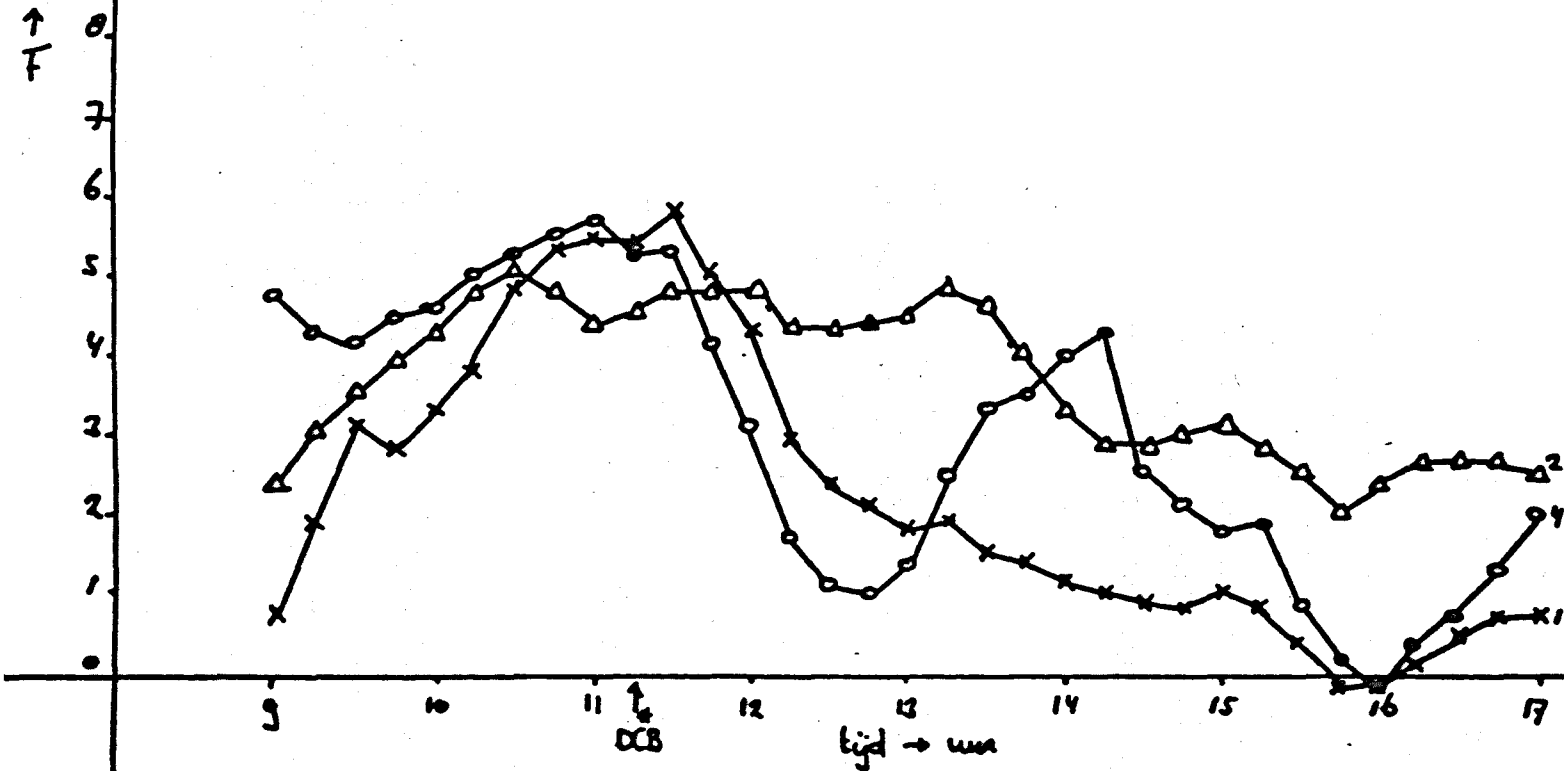
[DCB] bepaald = waaije 1 = 1.4 ppm Recovery = 93%  
 .. 4 = 1.37 ..



grafiek 12 Filtringrate van 8 *Daphnia magna* per vatje in ml/min *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.15 = 2 ppm in vatje 1 (x) en 4 (o). vatje 2 = blanco. (Δ)

[DCB] bepaald = vatje 1: 1.5 ppm    Recovery = 80%  
 " 4: 1.5 "



3 ppm: 3 x uitgevoerd, 1 x met vijverwater (grafiek 13) en 2 x met een Tauboplossing (grafieken 14 en 15).

Bij deze concentratie zijn de effecten al wat duidelijker dan bij de voorafggande, al blijft er soms een grote variabiliteit binnen één proef.

Zo vertoont grafiek 13 een snelle afname van de filtering-rate, maar in het geval van vaatje 1 ook weer een licht herstel, dat echter verdacht parallel loopt met het blanco-vaatje 2. De gemeten concentratie dichlobenil was 0.56 ppm voor vaatje 1 en 0.77 ppm voor vaatje 4 met een recovery van 35% (die waarschijnlijk op een foute DCB-bepaling berust) en 5 dagen oude Daphnia's.

Bij de grafieken 14 en 15 zien we een overeenkomstig beeld, er treedt geen herstel op en de uiteindelijke filtering-rate blijft laag. De gemeten concentratie dichlobenil was voor grafiek 14: 1.98 ppm (vaatje 1) en 1.75 ppm (vaatje 4), een recovery van 87% en 5 dagen oude Daphnia's. Voor grafiek 15: 2 ppm (vaatje 1) en 1.9 ppm (vaatje 4), een recovery van 98% en 7 dagen oude Daphnia's.

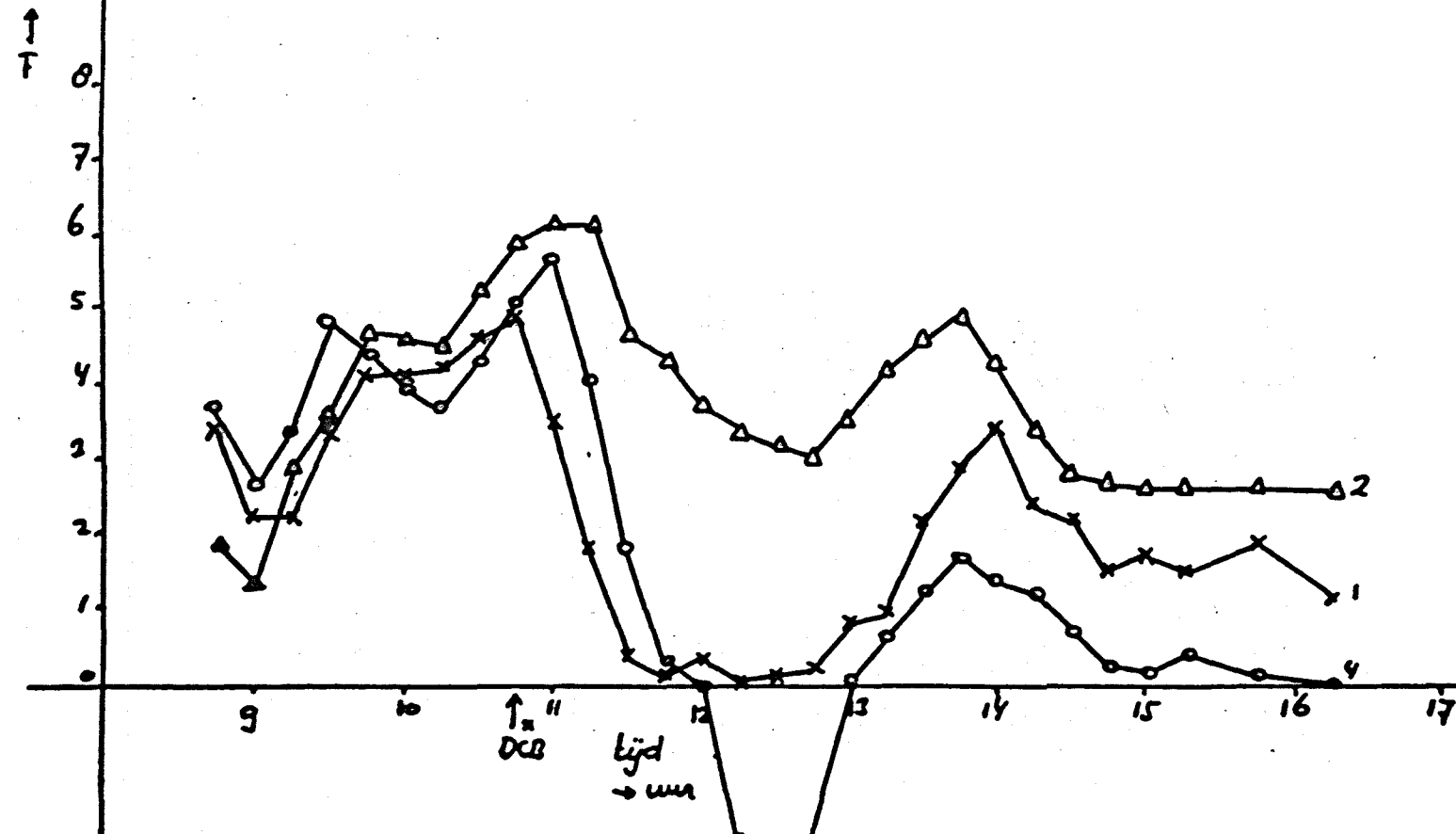
4 ppm: 2 x uitgevoerd (grafieken 16 en 17) beiden in een Taubmedium. Beide experimenten vertonen een snelle afname van de filtering-rate en geen herstelfases binnen de proefperiode. De gemeten concentratie dichlobenil was voor grafiek 16: 3.8 (vaatje 1) en 2.6 ppm (vaatje 4), een recovery van 85% en 5 dagen oude Daphnia's. Voor grafiek 17: 2.4 ppm (vaatje 1) en 2.6 ppm (vaatje 4), een recovery van 100% en 7 dagen oude Daphnia's.

Een algemeen beeld in de grafieken is dat de filtering-rate stijgt gedurende de eerste waarnemingen. Dit wordt verklaard door het feit dat de doorstroomopstelling na een nacht acclimatisatie vuil was (veel algenneerslag), die ik door 'tikken' liet wegspoeien. Waarschijnlijk bleef dit nog een poosje effect uitoefenen, zodat teveel algen geteld werden en er dus een te lage filtering-rate gemeten werd. Ook werd er per proef een monster genomen om de pH te meten, deze bleek echter niet onder invloed van het dichlobenil te verschuiven. (pH-Tauboplossing was 8.1).

grafiek 13 Filtering rate van *Daphnia magna* per uur in ml/uur *Daphnia*.

[DCB]<sup>0</sup> toegevoegd vanaf 10.45 = 3 ppm in vatje 1 (x) en 4 (o). · vatje 2 (Δ) = blank

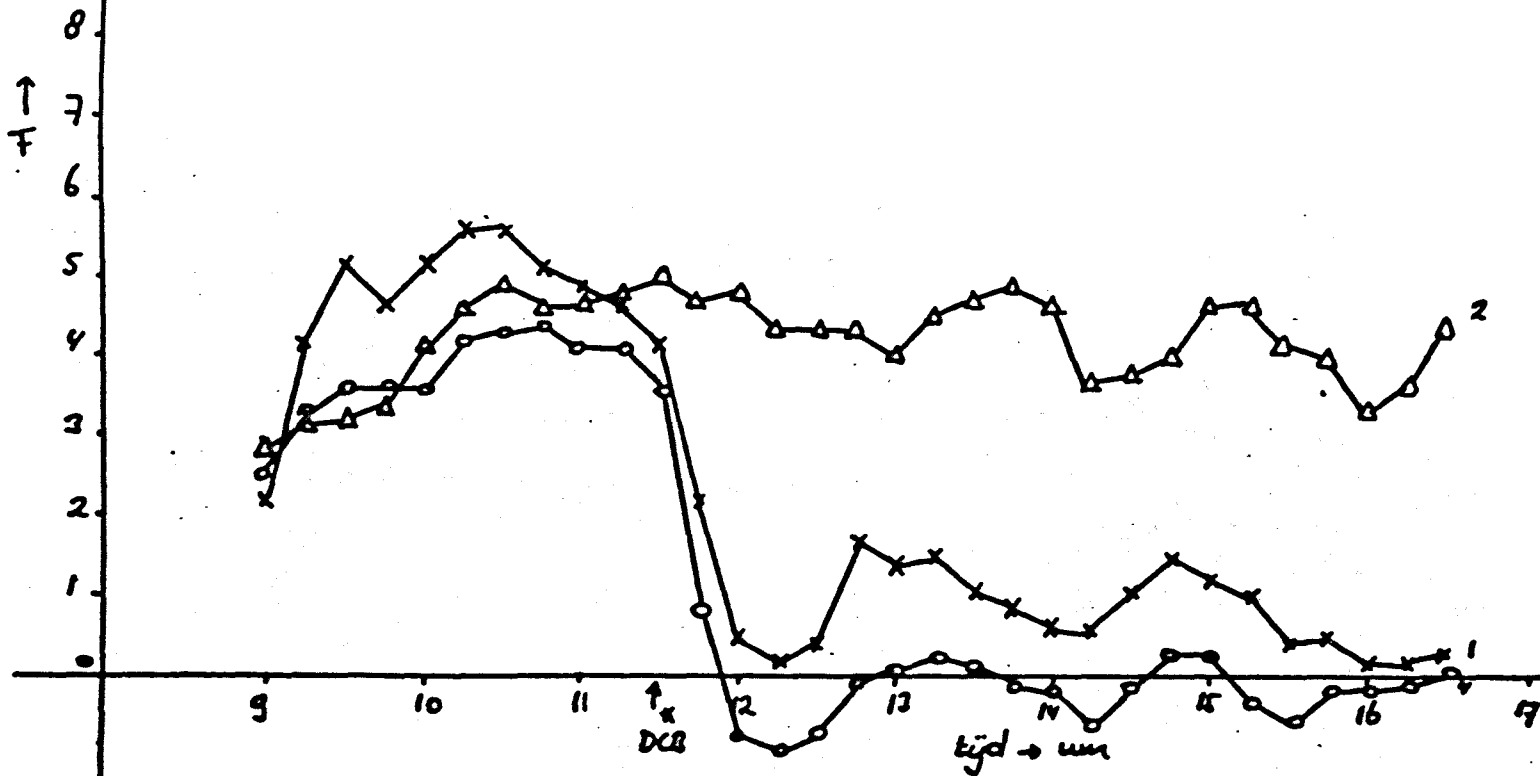
[DCB] bepaald = vatje 1: 0.56 ppm    Recovery = 35%!  
 "    4: 0.77 "



grafiek 14 Filteersnelheid van  $\emptyset$  Daphnia magna per uur in ml/water Daphnia.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.30 = 3 ppm in water 1 (x) en 4 (o), water 2 is blanco ( $\Delta$ )

[DCB] bepaald = water 1: 1.90 ppm Recovery: 07%  
 " 4: 1.75 "

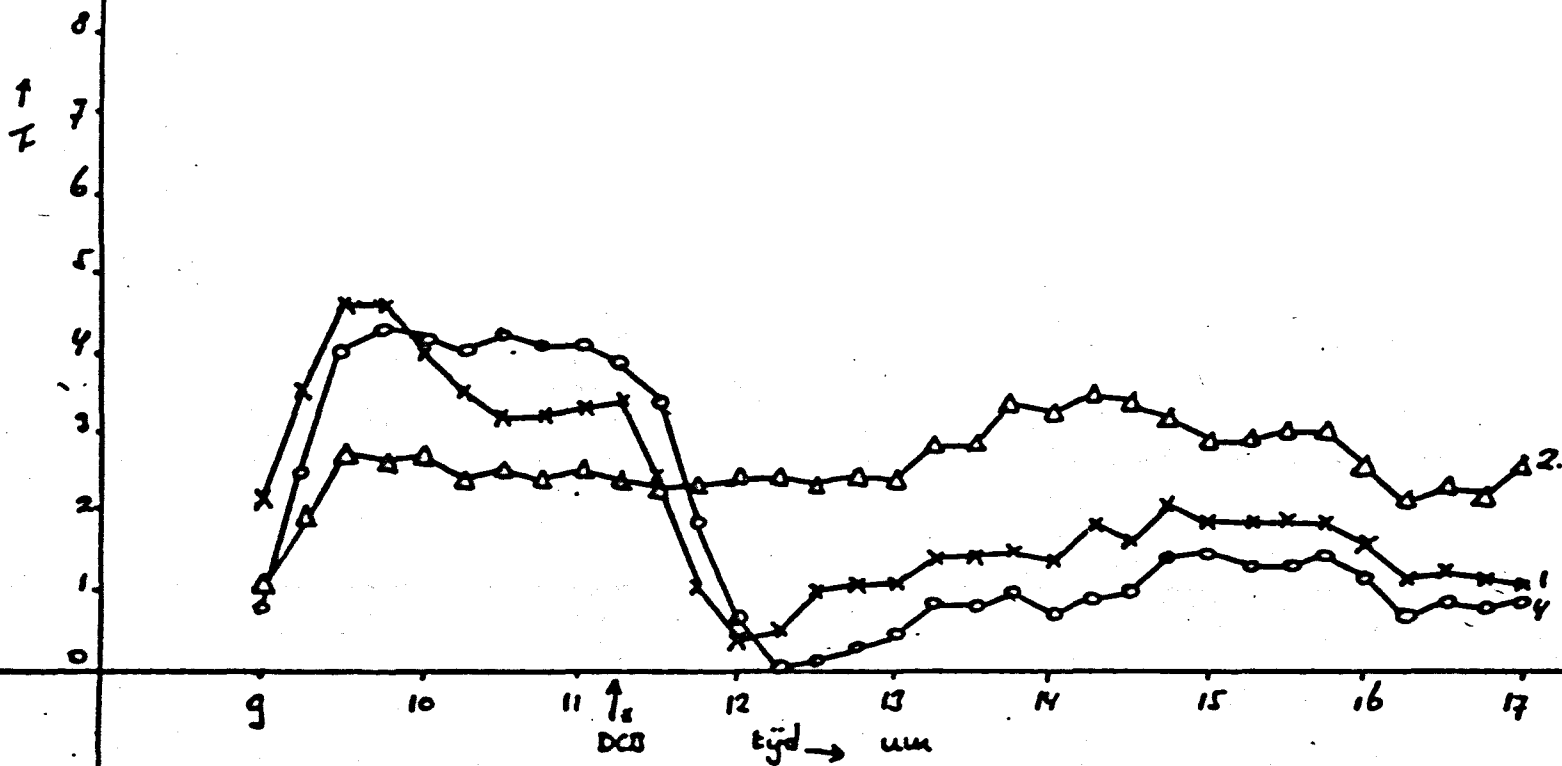


grafiek 15

Filtreringrate van *Daphnia magna* per waatje in ml/min *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd\* vanaf 11.15 = 3 ppm in waatje 1 (x) en 4 (o). waatje 2 is blanco (Δ).

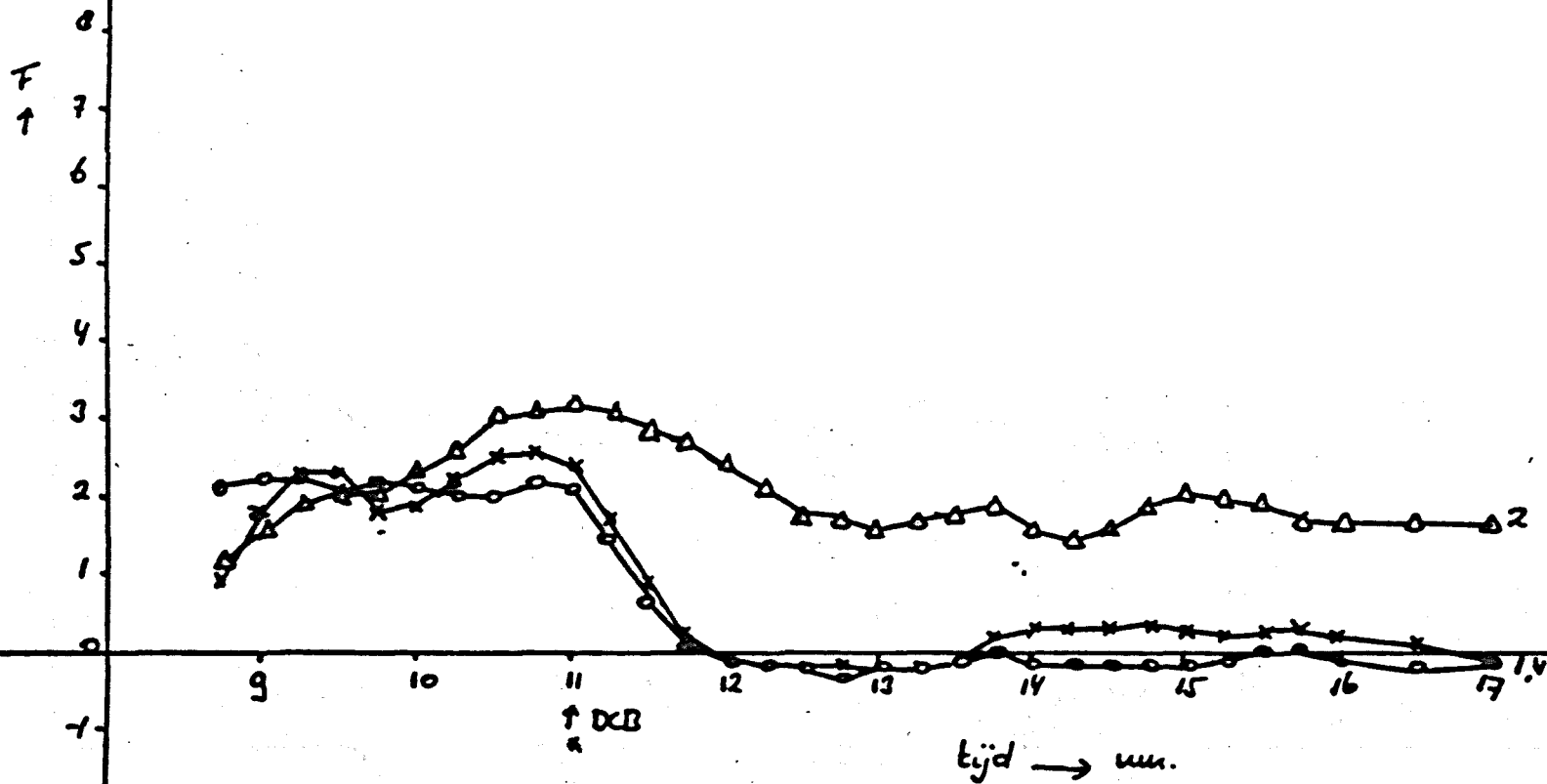
[DCB] bepaald is: waatje 1: 2.0 ppm Recovery: 66%  
" 4.1.9 " " "



grafiek 16 Filteringsrate van  $\phi$  *Daphnia magna* per vaatje in ml/min *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.00 = 4 ppm. in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 ( $\Delta$ ) is blanco

[DCB] bepaald = vaatje 1: 3.0 ppm    Recovery = 05%  
 .. 4: 2.6 ..





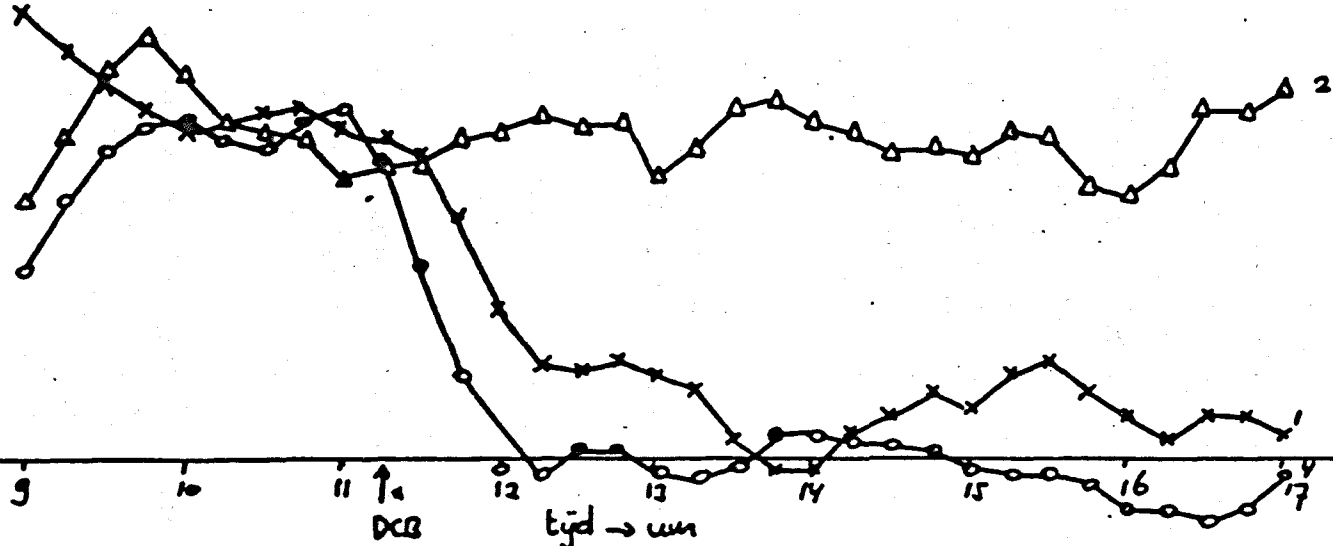
grafiek 17 Filtringerate van *Daphnia magna* per uur in ml/wm *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.15 = 4 ppm in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 (Δ) = blanco

[DCB] gemeten = vaatje 1 : 2.4 ppm Recovery = 100%  
 .. 4 : 2.6 "

F ↑

8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1  
0



Experimenten type 4: de feeding-rate bepalingen (grafieken 19 t/m 21).

Deze proeven zijn vanwege het naderend einde van mijn stageperiode slechts één maal uitgevoerd, zodat minder waarde aan eventuele uitspraken gehecht mag worden dan bij de filtering-rate bepalingen. Ook hiervan zijn de dichlobenilbepalingen in tabel 4 samengevat.

1 ppm: (grafiek 19) in Taubmedium.

Het beeld vertoont een duidelijk effect op de feeding-rate, maar een herstel lijkt erin te zitten, echter niet meer binnen de proefperiode. Opvallend is wel het verschil in reactie tussen vaatje 1 en vaatje 4; traag afnemende feeding-rate in vaatje 1 - snel afnemende feeding-rate in vaatje 4 en een duidelijk herstel in vaatje 1. De indruk is dat de invloed van dichlobenil in deze concentratie een overeenkomst vertoont met de invloed die dichlobenil in deze concentratie op de filtering-rate heeft. Gemeten concentratie dichlobenil: 0.6 ppm voor vaatje 1 en 0.6 ppm voor vaatje 4, een recovery van 100% en 7 dagen oude Daphnia's.

2 ppm: (grafiek 20), Taubmedium.

Ook hier is het effect duidelijk, overeenkomstig in het geval van 1 ppm, echter een herstel lijkt er hier minder duidelijk in te zitten. Gemeten dichlobenilconcentratie: 1.3 ppm (vaatje 1) en 1.4 ppm (vaatje 4), recovery: 100% en 7 dagen oude Daphnia's.

3 ppm: (grafiek 21), Taubmedium.

Een vreemde variabiliteit tussen vaatje 1 en vaatje 4, vaatje 1 vertoont een veel tragere en pas op de lange duur afnemende feeding-rate, vaatje 4 een snelle en rigoreuze afname tot zelfs in het negatieve. Dit is des te opvallender als men de dichlobenilconcentraties vergelijkt: 2.3 ppm (vaatje 1) en 2.4 ppm (vaatje 4). In dit verschil zal deze variabiliteit niet liggen. De recovery was 100% en de Daphnia's 7 dagen oud.

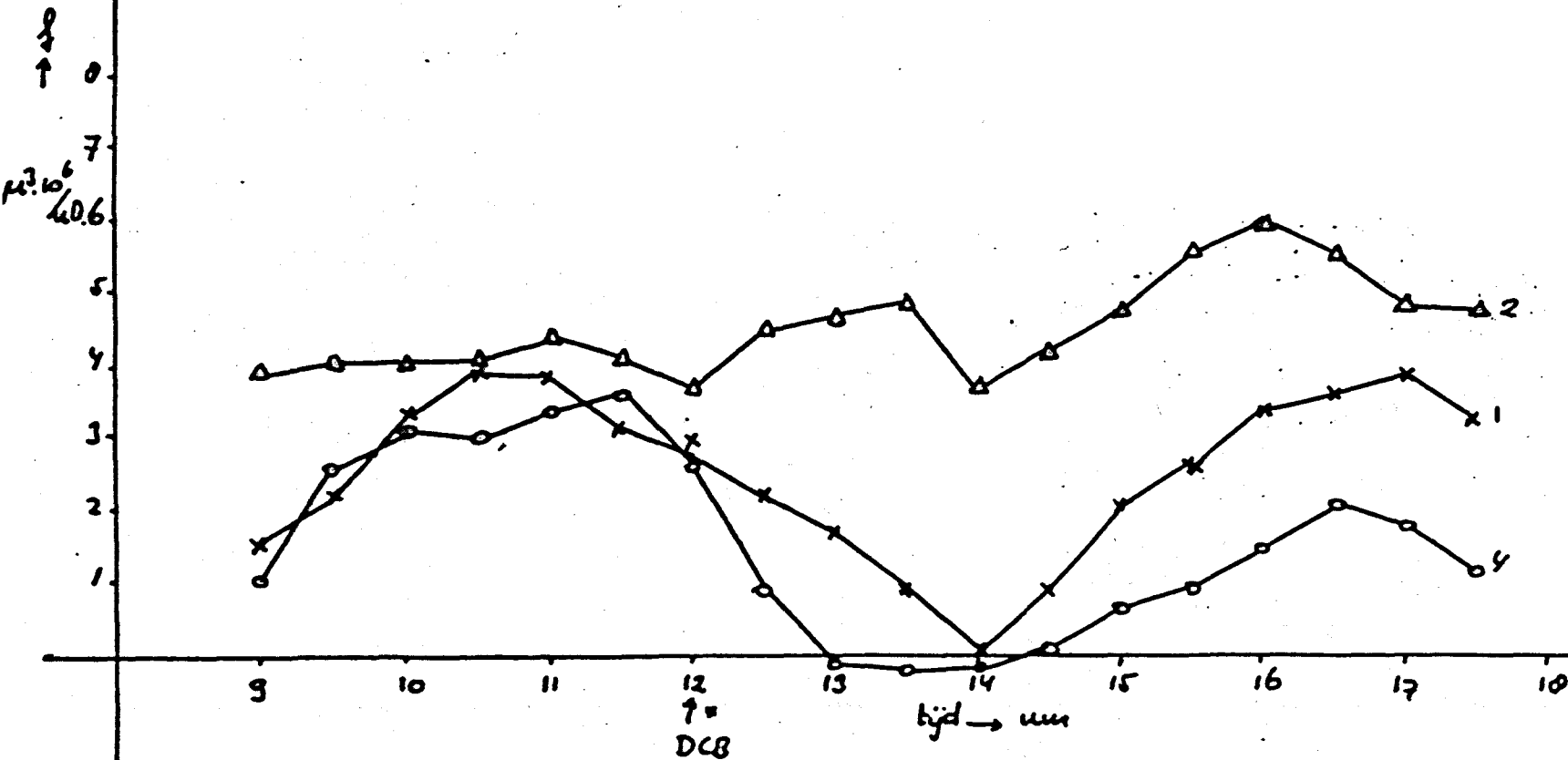
Ook bij deze grafieken neemt de feeding-rate vergelijkbaar met de filtering-rate eerst nog toe, waarschijnlijk om dezelfde reden als bij de filtering-rate.

Ook bij deze proeven werd af en toe de pH gemeten; deze verliep van 8.1 (Tauboplossing) naar  $7.6 \pm 0.1$ , zodat de effecten niet op pH-verschuivingen na toediening van DCB gebaseers hoeven te worden.

grafiek 19 feeding rate van *Daphnia magna* per waaije in  $\mu^3 \cdot 10^6 / \text{hr. Daphn.}$

[DCB] toegevoegd vanaf 12.00 = 1 ppm in waaije 1 (x) en 4 (o). waaije 2 ( $\Delta$ ) is blanco.

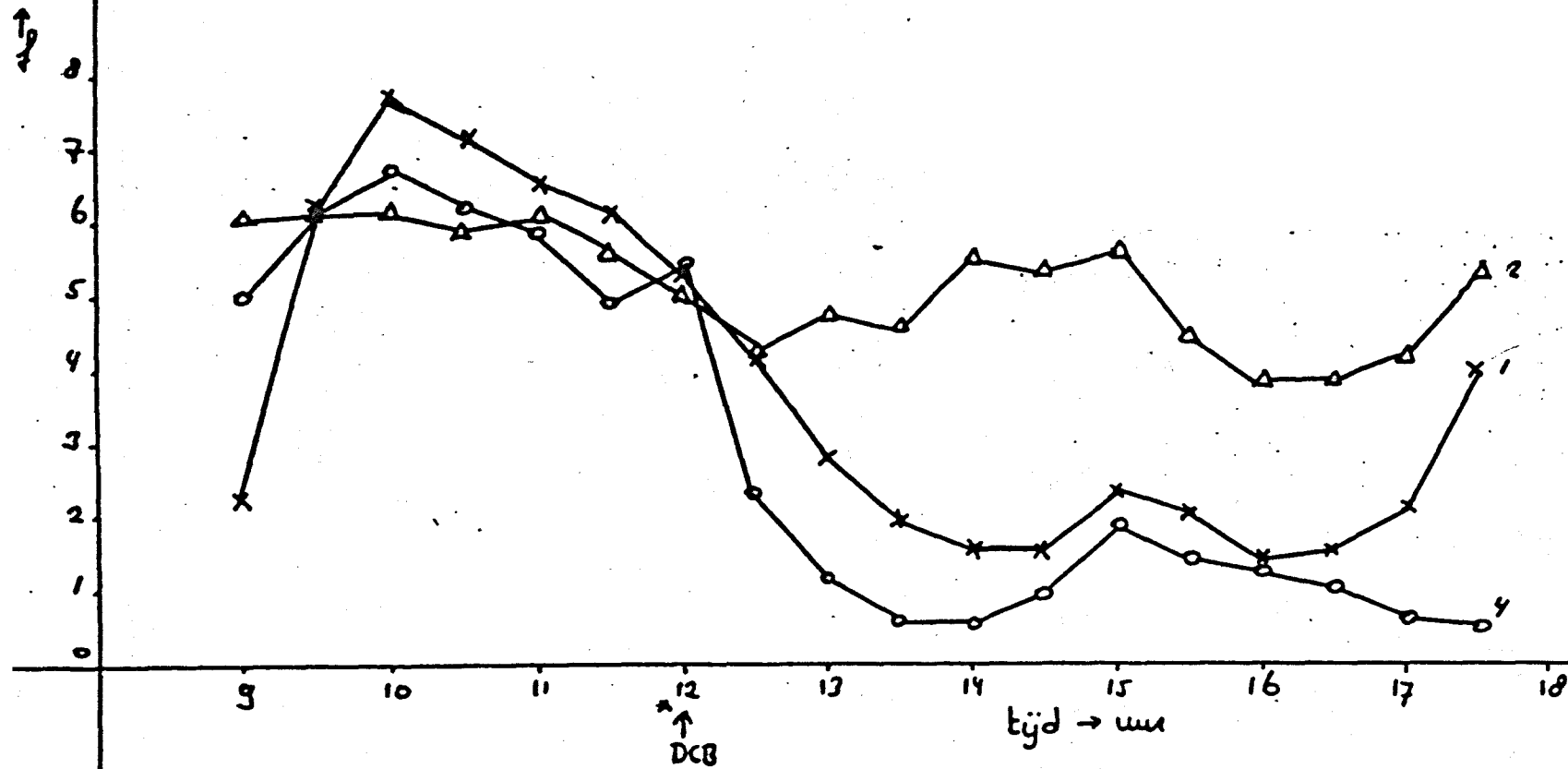
[DCB] Depoort = waaije 1: 0.6 ppm. Recovery: 100%  
 .. 4: 0.6 ..



grafiek 20 feeding-rate van ♂ *Daphnia magna* per vaatje in  $\mu^3 \cdot 10^6 / \text{li. Daphnia}$ .

[DCB] toegevoegd vanaf 12.00 = 2 ppm in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 ( $\Delta$ ) = blanco

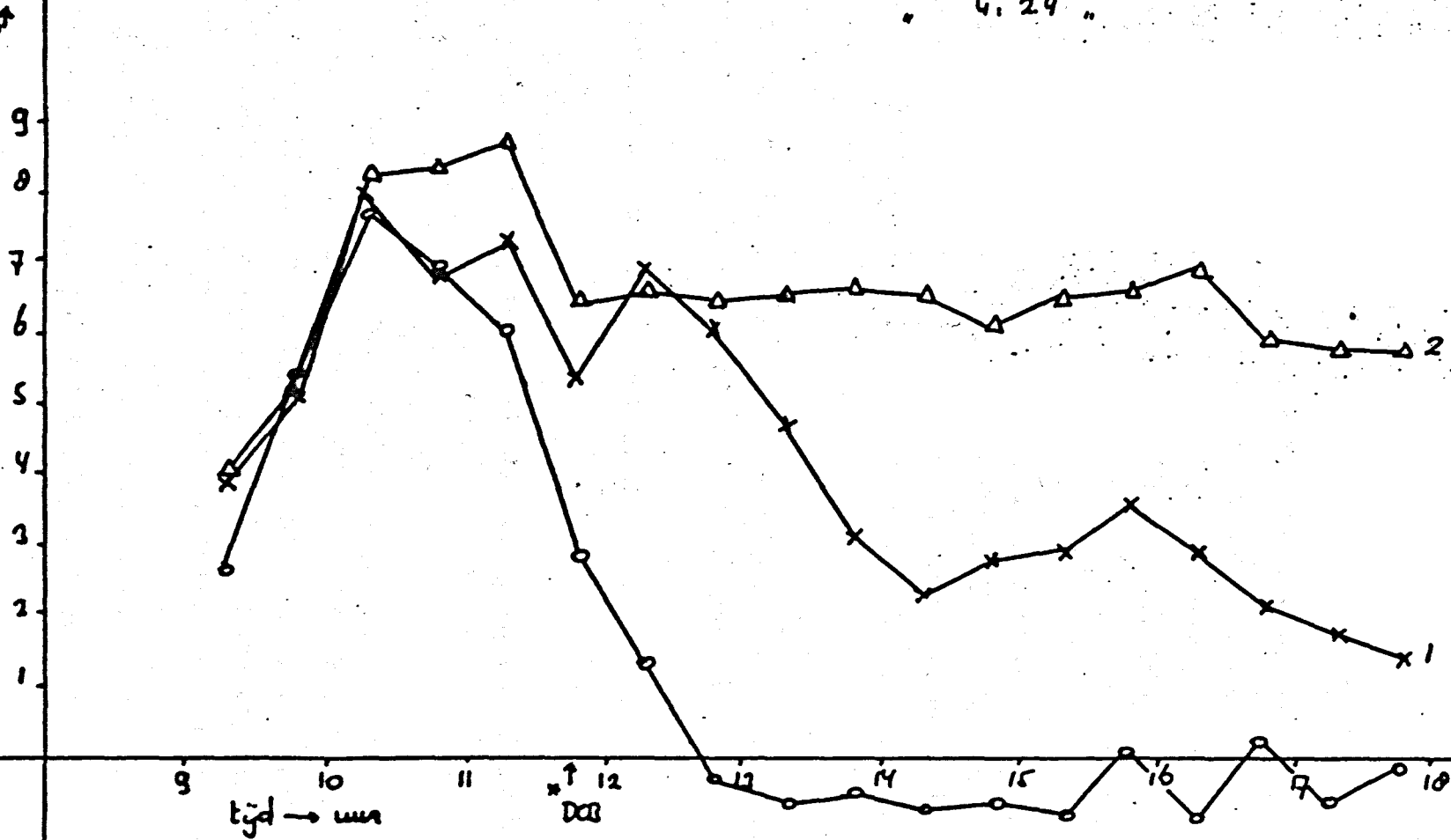
[DCB] gemeten = vaatje 1: 1.3 ppm Recovery = 100%  
 " " 4: 1.4 " " " "



grafiek 21: feedingsrate van *Daphnia magna* per vaatje in  $\mu^l \cdot 10^6$  / uur *Daphnia*.

[DCB] toegevoegd vanaf 11.45 = 4 ppm in vaatje 1 (x) en 4 (o). vaatje 2 ( $\Delta$ ) = blanco

[DCB] herhaal = vaatje 1: 2.3 ppm. Recovery = 100%  
 " 4: 2.4 "



## 6. Discussie:

In het hierna volgende zullen bediscussieerd worden:

- A. De resultaten van de filtering/feeding-rate bepalingen van de experimenten met de doorstroomopstelling.
- B. De doorstroomopstelling sec, de technische aspecten.

ad A.

Uit de resultaten blijken 2 aspecten: 1. voor een toediening van een hoeveelheid dichlobenil bevinden de filtering- respektievelijk feeding-rates zich over het algemeen op het niveau dat uit de literatuur naar voren komt: filtering-rate in de proeven tussen de 3 en 5 ml/hr.D, literatuur: 2.4 ml/hr.D (MacMahon, 1965) -  $4.7 \pm 0.6$  ml/hr.D (Kersting, 1976), feeding-rate in de proeven:  $4 - 8 \text{ u}^3 \cdot 10^6$ /hr.D, in de literatuur:  $12.9 \pm 0.6 \text{ u}^3 \cdot 10^6$ /hr.D (Kersting, 1976). Dus de omstandigheden voor de Daphnia's lijken redelijk na een nacht acclimatisatie. 2. dichlobenil heeft een negatief effect in meer of mindere mate, afhankelijk van de concentratie, op de voedselopname van Daphnia magna. Dat dit effect alleen op naam van het dichlobenil geschreven mag worden blijkt uit de feiten, dat op de eerste plaats er onder de heersende proefomstandigheden geen cycli in toe- of afname van de filtering-rate verwacht hoeven te worden, zoals bleek uit de resultaten van de type 1 - experimenten en op de tweede plaats dat tijdens de dichlobenil experimenten het vaatje met Daphnia's, die niet blootgesteld werden aan dichlobenil, filtering/feeding-rates vertoonde die vrijwel op konstant niveau bleven.

Hoewel het niet overduidelijk is, lijkt er een verband te bestaan tussen effect en concentratieniveau van dichlobenil. Aangezien er bij een concentratie van 0.4 ppm (in de vaatjes) geen effect optrad en wel bij een concentratie van 0.59 - 0.65 ppm (in de vaatjes), maar dan met een wisselend herstelbeeld, lijkt het erop, dat rond de 0.5 ppm een effectlevel ligt. Daarentegen lijken iets hogere concentraties noodzakelijk om een herstel te onderdrukken. Dit niveau lijkt rond de 1.5 - 2 ppm te liggen, boven deze concentraties trad binnen de proefperiode geen herstel meer op. Met andere woorden dichlobenil kan in lagere concentraties dan bijvoorbeeld een bekende  $LC_{50}$  van 3.7 mg/l (Cope, 1966) of

10 mg/l (Sanders, 1970) reeds een effect veroorzaken op *Daphnia magna* en ook een belangrijk effect, daar verminderde voedselopname kan inwerken op de 'levendigheid' van de dieren die daardoor kwetsbaarder worden voor bijvoorbeeld predatie. Mogelijk is ook een invloed op de voortplantingscapaciteit, Kersting (1978) vond een uitstervende *Daphnia magna* populatie bij 1 ppm dichlobenil. Bekend is ook dat *Daphnia*'s maar een beperkte periode buiten voedsel kunnen.

Hoe de stof op *Daphnia magna* inwerkt is onbekend. Volgens de Wit en van Genderen (1966) werken meteabolieten van dichlobenil; 2,6 dichloor-3hydroxybenzonitril en de 4hydroxy vorm ontkoppelend op de oxidatieve fosforylering bij rat en konijn. Als dit bij *Daphnia*'s ook het geval zou zijn, zouden twee effecten te verwachten kunnen zijn; een toename in de filtering-rate in verband met een optredend zuurstofgebrek, vooropgesteld dat de slagfrequentie van de thoracale extremiteiten gerelateerd is aan de zuurstofopname of een afname van de filtering-rate tengevolge van een optredend energie gebrek, dan is echter een toename in de feeding-rate vlak na toediening van dichlobenil te verwachten en dit kwam uit de grafieken niet naar voren.

De hartslagfrequentie zou bij zoogdieren afnemen onder invloed van dichlobenil (Mulder en de Wit, 1966). Het is dan interessant te weten, dat het hart van *Daphnia magna* van hetzelfde type is als dat van de zoogdieren namelijk een myogeen gestimuleerd hart, d.w.z. dat de slagstimulatie in de spieren van het hart opgewekt wordt. Dit type hart is kwetsbaar voor verschillende drugs (Green, 1957). Ook is het mogelijk dat dichlobenil geregistreerd wordt door sensoren in de darm in combinatie met mogelijk externe receptoren die de slagfrequentie van de thoracale extremiteiten controleren. Van belang is ook de standarisatie van dit type experiment. De resistentie tegen dichlobenil zou kunnen variëren met bijvoorbeeld de leeftijd van de *Daphnia*'s. De tijd binnen een instar (tussen twee vervellingen) kan van belang zijn, daar een nieuwe chitinelag gevormd wordt en dit kan de permeabiliteit van de stof beïnvloeden. Teneinde deze variatie te vermijden werden dieren van dezelfde leeftijd en sexe gebruikt.

Interessant zou zijn het uiterlijk gedrag van de *Daphnia*'s tijdens de blootstelling te kunnen volgen hetgeen nu onmogelijk was.

Wasserburger (1952) beschrijft enkele gedragsafwijkingen betreffende zwemhouding/richting bij Daphnia's die aan verschillende stoffen werden blootgesteld. De enige indruk die ik kon krijgen van deze fenomenen was na het beëindigen van een proef door de Daphnia's in een bekerglas te gieten en enige tijd te observeren. Vreemd gedrag was inderdaad waar te nemen; het achterover hangen en het op de bodem liggen etc.

ad B.

Aangezien het primaire doel van mijn onderzoek het optimaliseren van de doorstroomopstelling was wil ik daar nog enige woorden aan wijden.

Het voordeel van deze opstelling is dat kontinu metingen gedaan kunnen worden aan de voedselopname van een organisme. Dit maakt het onderzoek aan tijdsaspecten mogelijk; responstijd, herstel etc.

De omstandigheden kunnen eenvoudig gevarieerd worden zonder de proef af te breken. Verder zijn voedselconcentratie- en te testen stofniveau goed te handhaven. Desondanks verdwijnt er toch dichlobenil, zodat het gewenste niveau in de vaatjes helaas niet goed bereikt werd. Mogelijk wordt dichlobenil aan de (PVC) pompslangen geadsorbeerd. Een ander vervelend verschijnsel was de aanslag van algen in de buizen hetgeen de metingen natuurlijk beïnvloedt. Hiertegen zou je op kunnen treden door het gebruik van 'snellere' pompslangen of buizen met een kleinere diameter. Het eerste heeft als nadeel dat er kortere tijden tussen de metingen noodzakelijk zijn, hetgeen het werk, dat nu al in een hoog tempo verricht moest worden, aanzienlijk verzwaren doet. Goed reinigen van het materiaal blijft vereist.

Wat betreft het verlies aan DCB zou je de proef al 2 dagen met DCB kunnen laten inwerken, daar blijkt dat dan de opstelling verzadigd raakt.

Voor het bestuderen van herstelmechanismen zou het leuk zijn indien de experimenten langer dan 24 uur zouden kunnen lopen, maar dan moeten algenklonten/aanslag ed vermeden worden.

De tellingen aan één monster m.b.v. de Coulter Counter zijn variabel, het beste is het gemiddelde van 3 à 4 tellingen te nemen en vooral te letten op niet te veel schudden met het cuvet van 25 ml en niet te lang te wachten met de metingen daar het voorstelbaar is dat de



algen zich nog steeds delen.

Het dichlobenil is bij hogere concentraties niet goed oplosbaar, er blijven veel deeltjes in de oplossing zichtbaar. Enkele tellingen aan een oplossing met algen en 4 ppm dichlobenil en een oplossing met enkel algen gaven echter geen significante verschillen te zien. In principe is het mogelijk met deze opstelling diverse toxiciteits-experimenten uit te voeren, waarbij gedacht kan worden aan variabelen als temperatuur, lichtintensiteit, leeftijd en concentratie van de te testen stof.

## 7. Conclusie/Vermoedens:

Aan de hand van de resultaten is het mogelijk de volgende conclusies te trekken en vermoedens uit te spreken:

### Conclusies:

1. Dichlobenil oefent een negatief effect uit op de voedselopname van *Daphnia magna*. Behalve bij een concentratie van 0.5 ppm gaven alle geteste concentraties; 1, 2, 3 en 4 ppm een afname in zowel de filtering-rate als de feeding-rate binnen 30-60 minuten.
2. De geteste concentraties (tot 4 ppm) gaven geen mortaliteit bij de geteste organismen binnen de proefperiode van 6 uur maximaal.
3. De doorstroomopstellingsresultaten tonen aan dat de bepaling van de voedselopname een gevoeliger parameter op korte termijn is dan een eventuele (statische) LC<sub>50</sub>-bepaling, daar reeds bij gemeten concentraties lager dan 1 ppm afname in de voedselopname optreedt.
4. Een doorstroomopstelling is, mits ontdaan van enkele kinderziekten, een goed werktuig om eventuele effecten van vreemde stoffen op aquatische organismen te ontdekken.

### Vermoedens:

1. De resultaten doen vermoeden dat herstelmechanismen op kunnen treden bij lagere concentraties, echter overtuigende voorbeelden van herstel binnen een maximale proefperiode van 6 uur blootstelling deden zich niet voor. Deze uitspraak is gebaseerd op de variabiliteit aan effecten en herstel bij geteste concentraties van 1 en 2 ppm.
2. De gemeten concentraties geven de indruk dat tussen de 0.5 en 1 ppm een effectlevel ligt en tussen de 1.5 en 2 ppm de grensconcentratie waarboven geen herstel meer optreedt bij *Daphnia magna*.
3. Aangezien in de literatuur veel meldingen gedaan worden over de variabiliteit in filter- en feeding-rates veroorzaakt door fysische factoren als temperatuur, hoge lichtintensiteiten, seizoensinvloeden, dag/nacht cycli en biologische factoren als honger, sexe, reproductiestadium, lichaamsgewicht etc., dienen voorafgaande aan relevante toxiciteitstesten gestandaardiseerde condities afgesproken te worden.

8. Literatuurlijst:

1. Anderson, B.G., Jenkins, J.C. (1942). A time study of events in the life span of *Daphnia magna*. *Biological Bulletin* 83, 260-271.
2. Beynon, K.I., Wright, A.M. (1972). The fates of the herbicides chlorthiamid and dichlobenil in relation to residues in crops, soils and animals. *Residue reviews* 43 (23).
3. Burns, C.W.(1966). The feeding behavior of *Daphnia* under natural conditions. Ph.D.thesis, Univ. of Toronto, Toronto, Ontario, 88pp.
4. Burns, C.W.(1968). Direct observations of mechanisms regulating feeding behavior of *Daphnia* in lakewater. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 53(1), 83-100.
5. Burns, C.W.(1969). Relation between filteringrate, temperature and bodysize in four species of *Daphnia*. *Limnol. and Oceanography* 14, 693.
6. Buikema, A.L.jr (1973). Filteringrate of the Cladoceran *Daphnia pulex* as a function of body size, light and acclimatisation. *Hydrobiologia* 41, 515-527.
7. Cooper, D.C., Copeland, B.J.(1973). Responses of continuous series estuarine microecosystems to point-source input variations. *Ecological Monographs* 43.
8. Cope, O.B. e.a.(1969). Effekts of dichlobenil on two fish ponds environments. *Weed Sci.* 17, 158-165.
9. Cope, O.B. (1966). Contamination of the freshwater ecosystem by pesticides. *J. Appl. Ecol.* 3(suppl.), 33-44.
10. Frank, P.A., Comes, R.D. (1967). Herbicidal residues in pond water and hydrosol. *Weeds* 15, 210-213.
11. Frear, D.E.H., Boyd, J.E.(1967). Use of *Daphnia magna* for the microbioassay of pesticides 1. Development of standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage-mortality curves for pesticides. *Journ. economic. entom.* 60(5), 1228-1236.
12. van Genderen, H., van Esch, G.J.(1968). Toxicology of the herbicide dichlobenil and its main metabolites. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 6, 261-26
13. Green, J.(1957). *Daphnia* the waterflea. *New Biology* 23, 48-64.
14. Hairston, N.G.e.a.(1968). The relationship between species diversity and stability: an experimental approach with Protozoa and bacteria. *Ecology* 49, 1091-1101.
15. Haney, J.F., Hall, D.J.(1975). Diel vertical migration and filter-feeding activities of *Daphnia*. *Arch. Hydrobiol.* 75,413-441.

16. van der Honing, H.(1979). De voedselopname van *Daphnia magna* onder invloed van het herbicide dichlobenil (2,6 dichloorbenzotrinitril). Doktoraal/Stageverslag, RIN-Leersum, 72pp.
17. Hueck, H.J.S., Adema, D.M.(1968). Toxicological investigations in an artificial ecosystem. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 17, 188-199.
18. Kersting, K., Holterman, W.(1973). The feeding behavior of *Daphnia magna* studied with the Coulter Counter. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 18, 1434-1440.
19. Kersting, K., van der Leeuw, W.(1976). The use of the Coulter Counter for measuring the feedingrates of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 49(3), 233-237.
20. Kersting, K.(1978). Experiments with dichlobenil in a micro-ecosystem. *Proc. EWRS 5th Symp. on aquatic weeds 1978*; 269-277.
21. Kersting, K.(1978). Groth efficiency of *Daphnia magna*. The effect of food concentration. *Hydrobiological Bulletin* 12(1), 203-206.
22. Koopman, H., Daams, J.(1960). 2,6 dichlorobenzotrinitril, a new herbicide. *Nature* 186, 89-90.
23. Kring, R.L., O'Brien, W.J.(1968). Accomodation of *Daphnia pulex* to altered pH conditions as measured by feedingrate. *Limnol. and Oceanogr.* 21, 313-315.
24. Leeuwangh, P.(1978). Toxicitytests with Daphnids: its application in the management of waterquality. *Hydrobiologia* 59(2), 145-148.
25. McMahon, J.W., Rigler, F.H.(1963). Mechanisms regulating the feedingrate of *Daphnia magna* Strauss. *Can. J. Zool.* 41, 321-332.
26. McMahon, J.W., Rigler, F.H.(1965). Feedingrate of *Daphnia magna* Strauss in different foods labelled with radioactive phosphorus. *Limnol. and Oceanogr.* 10, 105-113.
27. McMahon, J.W.(1965). Some physical faktors influencing the feeding behavior of *Daphnia magna* Str.. *Can. J. Zool.* 43, 603-611
28. Marshall, S.M., Orr, A.P.(1955). On the biology of *Calanus finmarchicus* 8. Fooduptake, assimilation and excretion in adult and stage 5 *Calanus*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 34, 495-529.
29. Marshall, S.M., Orr, A.P.(1962). Food and feeding in Copepods. *Rapp. Process-Verboux Reunions Cons. Perma. Int. Explor. Mer.* 153 92-98.

30. Mulder, A.H., Wit, J.G.(1966). The inhibitory action of 2,6 dichloro-3 hydroxybenzotrill. *Biochem. Biophys. Acta* 218, 391-393.
31. Nauwerk, A.(1959). Zur bestimmung der Filtrierrate limnischer Planktontiere. *Arch. Hydrobiol. suppl.* 25, 83-101.
32. Newbold, C.(1975). Herbicides in aquatic systems. *Biol. Conserv.* 7, 98-118.
33. Nixon, S.W.(1969). A synthetic microcosm. *Limnol. and Ocean.* 14, 142-145.
34. Odum, H.T., Hoskin, C.M.(1957). Metabolism of a laboratory streammicrocosm. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas* 4, 115-133.
35. Ringelberg, I., Kersting, K.(1978). Properties of an aquatic micro-ecosystem 1. General introduction to the prototypes. *Arch. Hydrobiol.* 83(1), 47-68.
36. Ryther, J.H.(1954). Inhibitory effekts of phytoplankton upon the feeding of *Daphnia magna* with reference to growth, reproduction and survival. *Ecology* 35, 522-533.
37. Sanders, H.O.(1970). Toxicities of some herbicides to six species of freshwater crustaceans. *J. Waterpoll. Contr. Fed.* 42(8) part 1 1544-1550.
38. Schindler, D.W.(1968). Feeding, assimilation and respirationrate of *Daphnia magna* under various environmental conditions and their relation to production estimates. *J. Anim. Ecology* 37, 369-385.
39. Starkweather, P.L.(1975). Diel patterns of grazing in *Daphnia pulex* Leydig. *Verh. Intern. Verein. Limnol.* 19, 2851-2857.
40. Södergren, A.(1973). Transport, distribution and degradation of chlorinated hydrocarbonresidues in aquatic model-ecosystems. *Oikos* 24, 30 -41.
41. Taub, F.B.(1971). Biological models of freshwater communities. *Res. Fish. Coll. Fish. Univ. Wash.* 1971(355), 59-62.
42. Tooby, T.E.(1972). Pollutionstudies: toxicity of dichlobenil to Roach *Rutilus rutilus*. Annual Report Salmon and Freshwater Fisheries Laboratories (MAFF), 24-25.
43. VanValin, C.C.(1966). Persistence of 2,6 dichlorobenzotrill in aquatic environments. *Adv. in Chem. Ser.* 60, 271-279.
44. Verloop, A.(1972). Fate of dichlobenil in plants and soils. *Residue Reviewws* 43, 55-99.

45. Walsh, G.E. e.a.(1971). Uptake and effekts of dichlobenil in a small pond. Bull. environ. Contamination. Toxicol. 6, 279-288.
46. Wasserburger, H.J.(1952). Daphnia magna als Testtier zum Nachweis von Kontaktinsektizid-Spuren. Pharmazie 7, 731-734.
47. Uhlmann, D.e.a.(1971). Prognose des Stoffhaushaltes von Staugewässern mit Hilfe kontinuierlicher oder semikontinuierlicher Modelle Grundlage. Int. Revue. ges. Hydrobiol. 56, 513-539.
48. Whittaker, R.H.(1961). Experiments with radio phosphorus tracer in aquarium microcosms. Ecol. Monogr. 31, 157-188.
49. Wiersma-Roem, W.J.(1978). Sub-acute toxicity of the herbicide dichlobenil in Rainbow trout. Proc. EWRS 5th Symp. on aquatic weed
50. Wit, J.G., van Genderen, H.(1966). The monophenolic metabolites of the herbicide 2,6 dichlorobezonitril in animals as ununcouplers of oxidative phosphorylation. Biochem. J. 101, 707-709.

9. Appendix:

Als aanvulling op het hoofdstuk Materiaal en Methode (4.) volgt hier het recept van het Taubmedium, de basisvloeistof voor de drie voorraaderlemeyers van 5 liter met respectievelijk algen, dichlobenil en het verdunningsmedium van de doorstroomopstelling en verder enkele rekenvoorbeelden voor de bepaling van de filtering- en feeding-rates met behulp van een Hewlett Packard HP 25 rekenmachine.

Taubmedium: voedingsoplossing. Ingrediënten per 100 ml.

opl:	mM	Mol.gew.	g/l	g/100ml
A: $\text{NaNO}_3$	0.5	105.99	53.0	5.3
B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	246.48	24.6	2.46
C: $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.04	136.09	54.4	5.44
NaOH	0.014	40.0	0.56	0.056
D: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	147.02	147.02	14.7
F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0224	278.02	6.23	0.623
EDTA	0.0224	292.25	6.55	0.655
NaOH	0.067	40.0	2.68	0.268
E: NaCl	1.5	58.44	87.7	8.77
G: EDTA	0.006	292.25	17.5	1.75
NaOH	0.018	40.0	7.2	0.72
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.015	61.83	9.3	0.93
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0005	287.54	1.4	0.14
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005	197.91	9.9	0.99
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0005	241.95	1.2	0.12
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0001	249.68	0.25	0.025
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00005	291.04	0.146	0.0146
H: $\text{Al}_2\text{SO}_4 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	0.0048	666.42	3.2	0.32
I: $\text{Na}_2(\text{SiO}_4)_3$	0.080	58% gew.	44.42	4.442
K: $\text{Na}_2\text{HCO}_3$	0.42	84.01	35.0	3.5

Maak 10 liter medium door toevoeging van elke stockoplossing in de volgorde A,B,C,D,E,F,H,I,G,(K) in aqua-dest.

Breng het medium op pH = 8.1 en filtreer oplossing door een Norrit-kolom.

Bepaling concentratie algen voor de voorraadflles met behulp van de Coulter Channelyzer: (voorbeeld)

Neem 1 ml algenmedium uit de algenkweek bij 25 ml 0.9% NaCl, 2% formaline, plaats het cuvet onder de elektrode van de Coulter Counter, stel toets op 'integrate' van de Channelyzer en bepaal het aantal deeltjes van de volgende klassen:

(volume klasse C. Channelyzer)

lowerchannel	-	upperchannel	verst.	aantal deeltjes	klasse gem.	x	aantal
2		3	1	214	3		642
4		7	,,	304	6		1824
8		11	,,	200	10		2000
12		19	,,	283	16		4528
20		29	,,	1226	25		30650
30		39	,,	1961	35		68635
40		49	,,	1422	45		63990
50		59	,,	984	55		54120
60		79	,,	1287	70		90090
7		9	16	561	9		80784
10		19	,,	483	15		115920
20		39	,,	21	30		10080
40		79	,,	1	60		960
Totaal:							524223

$524223 \times 260$  (verdun.) =  $1.36 \times 10^8 \mu^3/\text{ml}$  ---->  $6 \cdot 10^6$  ----> 20 x  
 Dus algenmedium 20 x verdunnen met een Tauboplossing om een  
 concentratie in het voorraadvat van  $6 \cdot 10^6 \mu^3/\text{ml}$  te verkrijgen.



Voorbeeld van een berekening van de filtering-rate (proef 7, graf. 11).  
m.b.v. de Coulter Counter.

Gemeten deeltjes in 0.1 ml van 26 x met 0.9% NaCl, 2% formaline  
verdund monster (1 ml monster en 25 ml 0.9% NaCl, 2% formaline.).  
Totaal aantal deeltjes tussen 30-400 $\mu^3$ .

tijd: vaatje met 8 Daphnia's gemeten (3 x)	vaatje met 8 Daphnia's gemid. en voortschr. gem: $C_D$	F:
9.00 255 254 234	248 -	2.2
9.15 201 195 172	189 210	4.2
9.30 211 178 189	193 187	5.1
9.45 170 183 182	178 186	4.7
10.00 188 185 187	187 180	5.2
10.15 168 171 189	176 181	5.6
10.30 180 192 171	181 181	5.6
10.45 174 186 199	186 187	5.1
11.00 192 194 198	195 189	4.8
etc.	etc.	etc.
tijd: vaatje zonder Daphnia's gemeten (3 x)	vaatje zonder Daphnia's gemid. en voortschr. gem: $C_B$	
9.00 320 293 355	323 -	
9.15 316 360 360	345 335	
9.30 316 340 352	336 322	
9.45 294 261 304	286 312	
10.00 349 310 287	315 313	
10.15 326 341 347	338 326	
10.30 318 330 327	325 326	
10.45 321 318 305	315 322	
11.00 318 344 320	327 319	
etc.	etc.	

$$F = V \times \frac{C_B - C_D}{C_D} = \frac{56}{8} \times \frac{(335 - 210)}{210} = 4.2 \text{ (om 9.15) etc.}$$

HP 25 programma voortschrijdend gemiddelde: stand: on-prg.

01 Enter  
02 Sto 1      vervolg zie omme zijde

03 R/S	13 Sto 4
04 Sto 2	14 RCL 2
05 R/S	15 Sto 1
06 Sto 3	16 RCL 3
07 RCL 2	17 Sto 2
08 +	18 RCL 4
09 RCL 1	19 GTO 05
10 +	
11 3	
12 $\div$	

switch to run --> f prgm.

↓  
eerste getal R/S

tweede getal R/S

derde getal R/S --> voortschrijdend  
gemiddelde.

enz.

Voorbeeld van een feeding-rate berekening (graf. 19), m.b.v. de Coulter Channelyzer.

Gemeten deeltjes in 0.1 ml monster uit 1 ml monster en 25 ml 0.9% NaCl, 2% formaline.

BCH stand = 1, Versterking A = 4.

8 Daphnia's per vaatje

klasse	klassegrootte	tijd: 9.00		tijd: 9.30		tijd: 10.00		Volume $c^{45}$
		1	B	1	B	1	B (vaatjes)	
0-0	4-8	181	133	132	86	107	132	
1-1	8-12	98	68	67	64	60	61	
2-3	12-20	154	162	160	164	136	161	
4-5	20-28	88	101	81	95	61	90	
6-8	28-40	79	117	79	92	61	97	
9-11	40-52	71	64	40	59	38	56	
12-14	52-64	31	31	34	27	16	36	
15-18	64-80	37	38	30	30	38	33	
19-23	80-100	38	60	31	69	38	40	
24-28	100-120	39	52	42	49	22	37	
29-33	120-140	42	35	33	27	24	32	
34-43	140-180	33	27	27	30	21	17	
44-53	180-220	4	6	5	2	2	2	
54-63	220-260	0	0	0	1	0	0	
64-73	260-300	1	0	1	0	1	0	
74-93	300-380	0	0	1	0	0	1	
volume $C_T$		9147	9803	8066	9045	6342	7942	
voortschrijd. vol. $C_T$		-	-	7852	8930	7084	8637	

$c^{45}$ : 1) = 1661, 2) = 1624, 3) = 1492, 4) = 1558, 5) = 1221, 6) = 1535.

$$\text{formule: feeding-rate} = V \times (C_B^{45} - C^{45}) \times \frac{C_T}{C^{45}}$$

dit leidt tot de formule:

$$\text{feeding-rate} = \frac{56}{8} \times 260 \times \frac{(C_{TBl} + C^{45} - C_{Bl}^{45} - C_T) \times C_T}{C_T - C^{45}}$$

$C_T$  = totaal volume op tijd t in vaatje 1

$C_{TBl}$  = idem in blancovaatje,

$C_{Bl}^{45}$  = volume  $< 45 \mu^3$  in blancovaatje.

$C^{45}$  = idem op tijd t in vaatje 1

Dit leidt tot de volgende feeding-rates:

$$9.00 \quad f = 1.5 \times 10^6 \mu^3/\text{hr.D}$$

$$9.30 \quad f = 2.2 \times 10^6 \mu^3/\text{hr.D}$$

$$10.00 \quad f = 3.3 \times 10^6 \mu^3/\text{hr.D}$$

HP 25 programma voor berekening van de feeding-rate:

01 Sto 1	
02 R/S	↖ switch to run
03 Sto 2	- f pgrm
04 R/S	- 1820 Sto 5
05 Sto 3	- C <sub>TBl</sub> R/S
06 R/S	- C <sub>Bl</sub> <sup>45</sup> R/S
07 Sto 4	- C <sup>45</sup> R/S
08 RCl 1	- C <sub>T</sub> R/S → antwoord vaatje 1
09 RCl 2	↓
10 -	( - C <sup>45</sup> R/S
11 RCl 3	- C <sub>T</sub> R/S → antwoord vaatje 2
12 +	↓
13 RCl 4	( - C <sup>45</sup> R/S
14 -	- C <sub>T</sub> R/S → antwoord vaatje 3
15 RCl 4	
16 x	
17 RCl 4	
18 Enter	
19 RCl 3	
20 -	
21 ÷	
22 RCl 5	
23 x	
24 GTO 04	↗

Literatuur Taubmedium:

Taub, F.B. en Dollar, A.M.(1968). The nutritional inadequacy of Chlorella and Chlamydomonas as food for Daphnia pulex. Limnol. Oceanogr. 13, 607-617.