

JSN528036

**BIOMONITORING MET DE LARVEN VAN
CHIRONOMIDEN EN KOKERJUFFERS**

F. Heinis
T. Crommentuijn

M&W Aquasense,
Postbus 41125
1009 EC AMSTERDAM

In opdracht van DBW/RIZA.

Publicaties en rapporten van het project "Ecologisch Herstel Rijn" no. ~~17~~ - 1990.

18

Participating Institutes:

On behalf of the Ministry of Transport and Public Works:
Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment
(DBW/RIZA),
P.O. Box 17, 8200 AA LELYSTAD.

On behalf of the Ministry of Housing, Physical Planning and the Environment:
National Institute for Public Health and Environmental Protection (RIVM),
P.O. Box 1, 3720 BA BILTHOVEN.

On behalf of the Ministry of Agriculture, Nature Management and Fisheries:
Netherlands Institute for Fishery Investigations (RIVO),
P.O. Box 68, 1970 AB IJMUIDEN.

SUMMARY

The objective of this research was to gain insight in the usefulness of automatic registration of activity patterns of two soil-dwelling species in a newly developed monitoring system. The organisms concerned were larvae of the midge Chironomus riparius and of the caddisfly Hydropsyche contubernalis. The patterns of activity are recorded and quantified by a measuring system that uses the impedance conversion-technique. This system is developed by the University of Amsterdam.

In order to get an impression of the sensitivity of the test-system and the test-organisms, the effects of pentachlorophenol, parathion and cadmium were studied. The three compounds all induced comparable effects on the behavior of C. riparius. Exposure to these toxic substances resulted in two sequential, concentration-dependent stress responses. At low concentrations effects are visible as a significant increase in time spent on ventilation behavior. At higher but still sublethal concentrations observable effects can be recognized as increasing inactivity of the larvae.

The effects described were observed on larvae which were exposed to the test chemical for one or several days. In one experiment with parathion however, significant changes in the behavior of C. riparius were induced after a short exposure time, that is within 5 hours.

The lowest nominal concentrations of the test chemicals at which significantly abnormal behavior occurred (LOEC) were compared to LC50-values of standard toxicity tests for C. riparius and Daphnia magna. The LOEC-values for C. riparius were 0.032 mg/l for PCP and Cd, and 0.00032 µg/l for parathion. These concentrations were 30-100 times lower than the LC50-value for this species. The LOEC values for PCP and parathion were also 10 to 2500 lower than the LC50-value for D. magna.

The knowledge of the behavior and sensitivity for xenobiotics of the second species, larvae of H. contubernalis was small at the start of the project. The first experiments, described in this report, show that activity patterns of this species can be recorded and quantified in a comparable manner. The variation is considerably larger between individuals of H. contubernalis than those of C. riparius. The 24 hours LC50-value for parathion of H. contubernalis has the same order of magnitude as the value for C. riparius (0.6 µg/l). Effects on the behavior are expected to occur at lower concentrations, just as for C. riparius.

Development of the test-system requires additional research. Important aspects are standardization of breeding and testing conditions, especially for H. contubernalis, and time-dependent and chemical-specific recording of responses. The emphasis however should be on continuous and simultaneous measurement of several individuals and the automatization of data processing. There should also be additional research on the sensitivity of Hydropsyche larvae for specific contaminants and the suitability of this species for environmental toxicology research.

VOORWOORD

Het in dit rapport beschreven 3-maands onderzoek is door M&W Aquasense in opdracht van de Dienst Binnenwateren RIZA uitgevoerd en had tot doel als voorstudie te dienen voor een eventueel vervolgonderzoek naar de bruikbaarheid van het impedantie conversie-systeem met als testorganisme een waterbodem bewonende insektenlarve, voor een nieuw te ontwikkelen bio-alarmeringssysteem.

De eindverantwoordelijkheid voor de inhoud van dit rapport berust bij Drs. F. Heinis en Drs. T. Crommentuijn. De dikwijls fundamentele bijdragen van zowel Drs. C. v.d. Guchte (Dienst Binnenwateren RIZA) als Drs. J.T. Meulemans (M&W aquasense) bij de totstandkoming daarvan zijn echter in dank aanvaard. Dank is ook verschuldigd aan de Vakgroep Fundamentele en Toegepaste Oecologie (Univ. van Amsterdam), en in het bijzonder mw. W. Peeters, voor het doormeten van monsters met cadmium en de Dienst Binnenwateren/RIZA voor het doormeten van monsters met parathion en PCP en het verstrekken van gegevens over LC₅₀ waarden van *Ch. riparius* en *D. magna*. Verder worden Ir. A. Paarlberg (Provincie Limburg), Drs. O. Driessen (Waterschap Zuiveringschap Limburg) en mw. M. Klaas en L. van Hal (Dienst Binnenwateren RIZA) hartelijk bedankt voor hun hulp bij het vinden van de kokerjufferlarven.

INHOUD	Blz
SAMENVATTING	
1. INLEIDING	1
1.1. Teststelsysteem	1
1.2. Testorganismen	2
2. MATERIAAL EN METHODEN	4
2.1. Testorganismen	4
2.2. Activiteitsmetingen	4
2.3. Teststoffen	7
2.4. Blootstelling <i>Ch. riparius</i>	8
2.5. Blootstelling <i>H. contubernalis</i>	9
2.6. Verwerking gegevens	9
3. RESULTATEN	10
3.1. Blootstellingsconcentraties	10
3.2. Activiteitsmetingen <i>Ch. riparius</i>	10
3.2.1. Respons na 96 uur blootstelling aan PCP	10
3.2.2. Respons na 96 uur blootstelling aan Cd	11
3.2.3. Respons na 24 uur blootstelling aan parathion	12
3.2.4. Respons na een korte blootstelling aan parathion	14
3.3. Toxiciteit van parathion voor <i>H. contubernalis</i>	15
3.4. Activiteitsmetingen <i>H. contubernalis</i>	15
4. DISCUSSIE	17
5. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	21
6. LITERATUUR	23
BIJLAGEN	25

SAMENVATTING

Het in dit rapport beschreven onderzoek had tot doel inzicht te krijgen in de bruikbaarheid van automatische registraties van activiteitspatronen van twee waterbodembewonende organismen, te weten de muggelarve *Chironomus riparius* en de larve van de kokerjuffer *Hydropsyche contubernalis*, in een nieuw te ontwikkelen bio-alarmeringssysteem. De activiteitspatronen zijn geregistreerd en gekwantificeerd met behulp van een bij de Universiteit van Amsterdam ontwikkeld meetsysteem waarin gebruik gemaakt wordt van de impedantie conversie-techniek.

Om een indruk te krijgen van de gevoeligheid van het testsysteem en de testorganismen, zijn na een bepaalde blootstellingsduur de effecten van drie modelstoffen, namelijk het pesticide pentachloorfenol (PCP), het insecticide parathion (een choline-esterase remmer) en het zware metaal cadmium op de activiteit van *Ch. riparius* bestudeerd. Ondanks de grote verschillen in werkingsmechanisme tussen de drie teststoffen zijn vergelijkbare effecten op het gedrag van *Ch. riparius* gevonden. Blootstelling aan deze toxische stoffen induceert twee opeenvolgende, concentratie afhankelijke stressresponsen: het eerste, bij de laagste concentraties optredende effect, is waarneembaar als een significant toename in de tijd besteed aan ventilatiegedrag. Het tweede, bij hogere, maar nog steeds subletale, concentraties waarneembare effect is te herkennen als een toenemende inactiviteit van de larven.

De beschreven gedragseffecten werden waargenomen bij larven die een of meerdere dagen aan de teststof waren blootgesteld. Uit een, met een van de drie teststoffen uitgevoerd experiment blijkt echter dat parathion ook na een kortere blootstellingsduur, d.w.z. binnen vijf uur, significante veranderingen in het gedrag van *Ch. riparius* induceert.

De laagste nominale concentraties van de teststoffen waarbij een significant van de blanco afwijkend gedrag werd gevonden (LOEC), werden bepaald en vergeleken met uit standaard toxiciteitstests afkomstige LC₅₀ waarden voor *Ch. riparius* en de watervlo *Daphnia magna*. De voor de drie teststoffen gevonden LOEC waarde voor *Ch. riparius* bedroeg 0.032 mg/l voor PCP en Cd en 0.00032 µg/l voor parathion. Deze concentraties lagen een factor 30-1800 onder de LC₅₀ waarde voor deze soort. Voor PCP en parathion lagen deze waarden ook nog resp. een factor 10 en 2500 onder de LC₅₀ waarde voor *D. magna*.

Van het tweede testorganisme, de larve van de kokerjuffer *H. contubernalis*, was bij aanvang van de studie nog weinig bekend over het gedrag en de gevoeligheid voor milieuvreemde stoffen. Uit de in dit rapport beschreven oriënterende experimenten blijkt dat van dit organisme activiteitspatronen op een, met muggelarven vergelijkbare, wijze geregistreerd en gekwantificeerd kunnen worden. De individuele variatie tussen de larven van de kokerjuffer is

echter aanzienlijk groter dan van muggelarven. De 24 uur LC_{50} waarde voor parathion van *H. contubernalis* larven ligt in dezelfde orde van grootte als die van *Ch. riparius* (0.6 µg/l parathion). Effecten op het gedrag zijn evenals bij *Ch. riparius* bij lagere concentraties te verwachten.

Voor de verdere ontwikkeling van het testsysteem is op een aantal punten aanvullend onderzoek gewenst. Aspecten met betrekking tot de standaardisatie van kweek- en meetsomstandigheden (vooral voor *H. contubernalis*) en tijdsafhankelijke stofspecifieke responsregistraties zijn hierbij van belang. De nadruk moet echter liggen op het continu simultaan meten van meerdere individuele organismen en het automatiseren van de gegevens verwerking. Tevens is aanvullend onderzoek gewenst naar de gevoeligheid van *Hydropsyche* larven voor specifieke stoffen en de geschiktheid van dit organisme voor milieutoxicologisch onderzoek.

1. INLEIDING

1.1. Testsysteem

Het in Europa toenemend optreden van milieurampen als de "Sandoz affaire" heeft er toe geleid dat er de laatste jaren grote behoefte ontstaan is aan meetsystemen waarmee de kwaliteit van oppervlaktewateren continu getest kan worden. Het belang hiervan mag duidelijk blijken uit het gegeven dat op de rivier de Rijn het afvalwater van ca. 20% van de totale chemische industrie van Europa geloosd wordt, een mengsel van naar schatting 100.000 verbindingen (GEO, november 1988). Aangezien het niet mogelijk is het hele scala van xenobiotische verbindingen in het oppervlaktewater door middel van chemische bepalingen continu te meten, is de kans dat op deze wijze een grote lozing gesignaleerd wordt uiterst klein. Aan dit probleem kan tegemoet gekomen worden door gebruik te maken van zg. "bio-alarmeringssystemen". Bij deze systemen wordt gebruik gemaakt van het verschijnsel dat organismen die blootgesteld worden aan toxische stoffen, alvorens aan de gevolgen van deze blootstelling te overlijden, eerst veranderingen vertonen in hun activiteit en gedrag. Deze gedragsveranderingen treden bovendien al op bij concentraties van de toxicant die beduidend lager liggen dan de concentraties die sterfte binnen 24, 48 of 96 uur induceren. De activiteitspatronen kunnen langs elektronische weg gemeten, of in elk geval omgezet worden in elektrische signalen. Optredende afwijkingen van het "normale" gedrag resulteren in een afwijkend signaal als gevolg waarvan een alarm kan afgaan.

Tussen verschillende soorten organismen kan een grote variatie in gevoeligheid voor specifieke stoffen bestaan. Evertebraten zijn bijvoorbeeld in het algemeen gevoeliger voor pesticiden dan vissen (Baier et al., 1985; Nimmo, 1985). Daarentegen kunnen vissen weer gevoeliger zijn voor sommige zware metalen (Rand, 1985). Om een zo breed mogelijk spectrum van toxische stoffen te kunnen signaleren, is het daarom wenselijk om bij de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewateren en effluënten met behulp van bio-alarmering van meerdere organismen gebruik te maken.

In het kader van het Rijn Actie Programma, zijn door Rijkswaterstaat in februari 1988 bij Lobith twee biologische bewakingssystemen geïnstalleerd. Deze systemen hebben een alarmeringsfunctie bij eventuele toekomstige milieucalamiteiten. Als parameters worden respectievelijk de rheotaxis van vissen (goudwinden) en de activiteit van watervlooien

(*Daphnia magna*) gebruikt. In de toekomst worden deze twee systemen mogelijk uitgebreid met één of meer systemen, waarbij van andere organismen gebruik gemaakt wordt. Aangezien een lozing verstrekkende gevolgen kan hebben voor de in de waterbodem levende organismen, is het zinvol bij een nieuw te plaatsen systeem gebruik te maken van een vertegenwoordiger van deze levensgemeenschap. Larven van waterbodem bewonende insecten, die mogelijk voor andere stoffen gevoelig zijn dan vissen of watervlooien, zijn goede kandidaten.

Continu registrerende systemen waarin gebruik wordt gemaakt van de in of op waterbodems levende larven van insecten, zijn echter nog niet ontwikkeld. Er zijn wel aanwijzingen dat de activiteit en/of het gedrag van insectenlarven een gevoelige parameter kan zijn bij de signalering van toxische stoffen (Heinis et al., in prep.; Scherer and McNichol, 1986; Henry et al., 1986; Batac-Catalan and White, 1983). De bij de Vakgroep Aquatische Oecologie (Universiteit van Amsterdam) ontwikkelde methode om met behulp van de impedantie conversie-techniek de activiteit van muggelarven te meten en te kwantificeren, is in principe zeer geschikt om als basis te dienen voor de ontwikkeling van een bio-alarmeringssysteem (zie § 2.2. voor beschrijving systeem).

1.2. Testorganismen

Larven van dansmuggen (Chironomidae) beschikken over een relatief eenvoudige set activiteitspatronen. Deze patronen zijn goed te beschrijven en resulteren in duidelijk van elkaar te onderscheiden signalen (Heinis & Swain, 1986 a). Bovendien zijn sommige soorten op eenvoudige wijze te kweken. In experimenten, waarin de invloed van het zware metaal cadmium op het gedrag van muggenlarven is bestudeerd, is gebleken dat die effecten er inderdaad zijn en dat ze goed te kwantificeren zijn: bij de "filter-feeder" *Glyptotendipes pallens* waren de eerste duidelijke effecten zichtbaar bij een concentratie van $0.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}$, een concentratie die een factor 100 lager ligt dan de voor deze soort gevonden 144 uur LC_{50} waarde (Heinis et al., in prep.). Ook bij *Chironomus riparius* is uit voorlopige experimenten gebleken dat de eerste gedragseffecten zich voordeden bij een concentratie die veel lager lag dan de letale dosis ($\text{LOEC: } \pm 0.1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}$, 96 uur $\text{LC}_{50: } \pm 10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}$). De door blootstelling aan toxische stoffen geïnduceerde gedragseffecten, mits goed kwantificeerbaar, kunnen dus in principe goed gebruikt worden bij het aantonen van die stoffen. Men mag aannemen dat bij deze organismen gedragseffecten ook zullen

optreden na blootstelling aan andere xenobiotische verbindingen, zoals herbiciden en insecticiden. Het is echter niet bekend welke gedragseffecten optreden en of deze te vergelijken zijn met de effecten die optreden na blootstelling aan cadmium. Terwijl muggelarven in vergelijking met *D. magna* een grote tolerantie voor het zware metaal cadmium hebben, is dit voor pesticiden niet het geval. Effecten van bepaalde pesticiden op de vitaliteit van de muggelarve *Ch. riparius* en *D. magna* treden op bij vergelijkbare concentraties (voorlopige gegevens Dienst Binnenwateren RIZA).

Een van de eisen die aan een bio-alarmeringssysteem gesteld wordt, is dat als testorganisme een bij voorkeur inheemse soort gekozen wordt. Hoewel *Ch. riparius* zeker in Nederland voorkomt, is het niet bekend of deze soort ook vertegenwoordigd is in de grote rivieren. De kokerjuffer soort *Hydropsyche contubernalis* daarentegen, wordt in de Rijn aangetroffen en zou dus wat dat betreft een goed testorganisme kunnen zijn. Van de net-spinnende kokerjufferlarven, waartoe de Hydropsychidae behoren, is bekend dat ze net als muggelarven eenvoudig te kwantificeren dorso-ventrale bewegingen met het abdomen maken (Philipson, 1977; Philipson & Moorhouse, 1974). Bovendien vertonen de larven van deze insektenfamilie, als ze eenmaal een net gesponnen hebben, een sedentaire levenswijze, zodat een geautomatiseerde registratie van het gedrag met behulp van de impedantie conversie-techniek mogelijk moet zijn. Echter, over de gevoeligheid van *Hydropsyche* soorten voor toxische stoffen is nog weinig bekend.

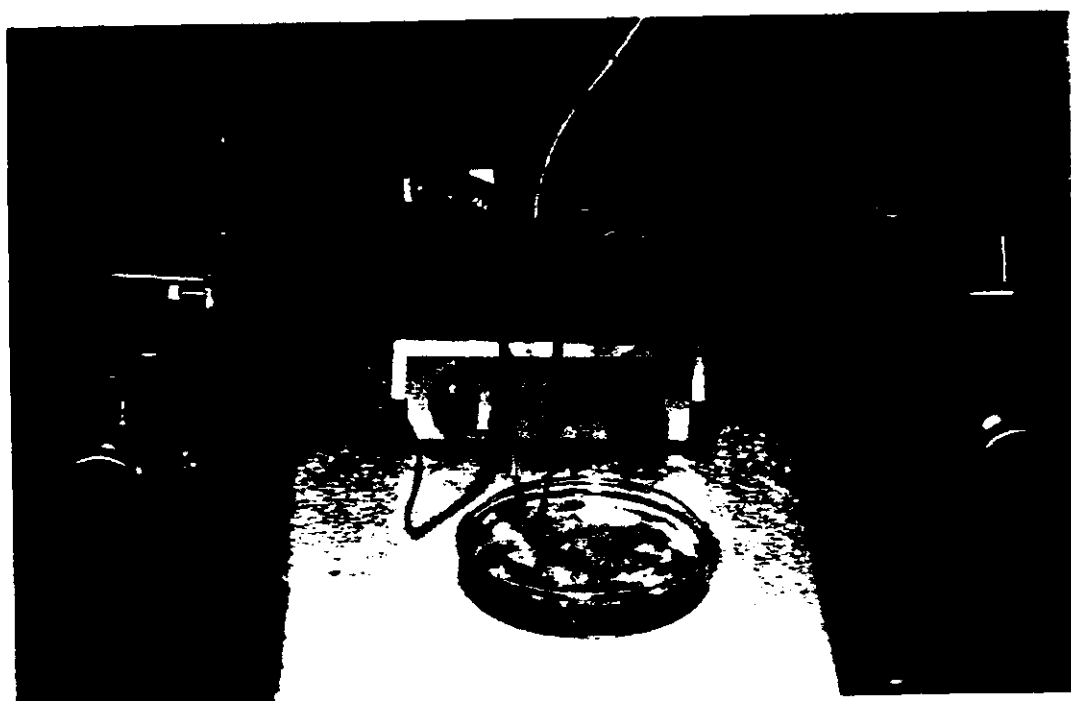
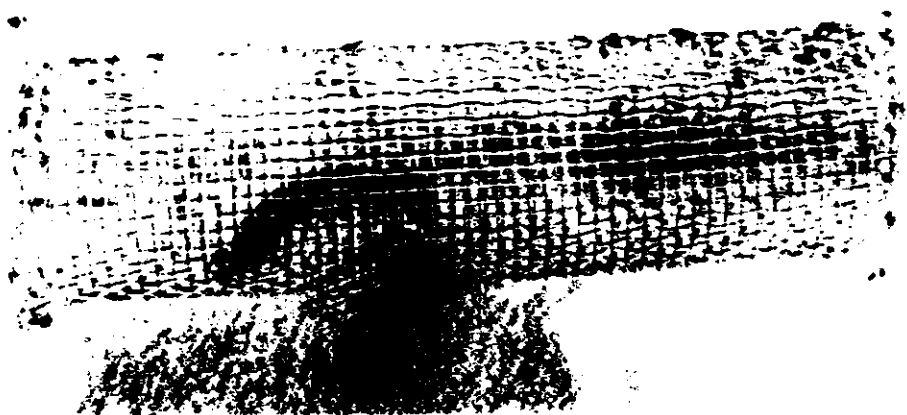


foto 1. Naaldelectroden met daartussen een muggelarve in een, uit cellulosevezels opgebouwde, koker.
(foto: S. van Mechelen)

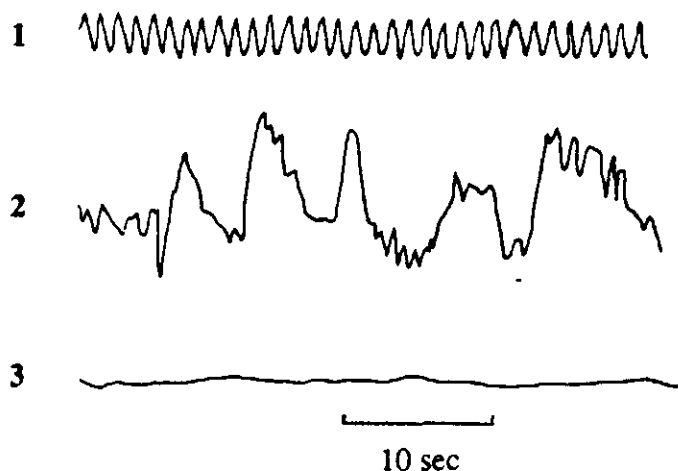
omgezet in spanningsveranderingen die zichtbaar gemaakt kunnen worden op een oscilloscoop. In het gebruikte systeem werden de signalen geregistreerd met behulp van een Graphex (Mark VII) high-speed recorder. De signalen konden ook naar een micro-computer worden gezonden waar ze permanent opgeslagen werden op 5 1/4 inch diskettes. Bij een monsterfrequentie van 16 Hz kan in totaal 10 uur continue activiteitsmetingen op een diskette worden opgenomen. Een gedetailleerde beschrijving van de gebruikte techniek wordt gegeven door Heinis & Swain (1986 a).

In dit onderzoek werden activiteitsmetingen uitgevoerd door naald elektroden met behulp van micromanipulatoren aan weerszijden van de larven te plaatsen (fig. 1, foto1). De *Ch. riparius* larven bevonden zich tijdens de metingen in een uit cellulosevezels opgebouwd kokertje. De larven van *H. contubernalis* bevonden zich tijdens de metingen met hun zelfgesponnen net in een, voor dit onderzoek ontwikkelde, huls van planktongaas (fig. 2). Elke larve werd de dag voor de activiteitsmetingen in een uit planktongaas vervaardigde (maaswijdte 1 mm), aan één zijde open huls gebracht, die vervolgens, na het inbrengen van de larve, werd dichtgeseald. Na teruggeplaatst te zijn in het doorstroomsysteem, sponnen de larven dan binnen één dag een nieuw net. Van deze larven, in totaal 7 uit de Rijn en 10 uit de Roer, zijn 1 uur durende activiteitsmetingen gemaakt.



figuur 2. Huls vervaardigd uit planktongaas met daarin een larve van *H. contubernalis*

In de geregistreerde signalen werden drie typen gedrag onderscheiden (zie fig. 3):
 (1) ventilatie, i.e. dorsoventrale bewegingen van het lichaam, waarmee een waterstroom door het kokertje, c.q. net opgewekt kan worden
 (2) ander gedrag, i.e. activiteit geassocieerd met voedselopname
 (3) inactiviteit.
 Van elk type gedrag werd het percentage van de totale tijd bepaald dat aan dat gedrag besteed werd.



figuur 3. Typen gedrag van *Ch. riparius*: (1) ventilatie, (2) ander gedrag, (3) inactiviteit.

2.3. Teststoffen

De keuze van de teststoffen werd gemaakt op grond van de volgende criteria:

1. beschikbaarheid van toxiciteitsgegevens
2. representativiteit van voorkomen in het stroomgebied van de Rijn, al dan niet na het optreden van calamiteiten.

Pentachloorfenol

Het pesticide pentachloorfenol (PCP) is een hout conserveringsmiddel, dat hout beschermt tegen schimmel, termieten en hout borende insecten. Omdat dit middel veelvuldig gebruikt wordt en behoorlijk persistent is, worden gehalten in water, en soms ook in het sediment, routinematig bepaald (Konasewich et al., 1978). Vanwege de toxiciteit, de persistentie en het gevaar voor bioaccumulatie, is in West-Duitsland het gebruik van PCP in waterwingebieden verboden (Baier et al, 1985).

Cadmium

De laatste decennia zijn ten gevolge van toegenomen industriële activiteiten grote hoeveelheden zware metalen in het aquatische milieu terechtgekomen. Zware metalen worden niet afgebroken en zijn dus conservatief vervuilende of persistente stoffen. Hoewel de totaalgehalten in het oppervlaktewater het laatste decennium een dalende trend vertonen, worden ten gevolge van calamiteiten nog regelmatig relatief hoge gehalten waargenomen. Omdat van cadmium veel toxiciteitsgegevens beschikbaar zijn, is dit zware metaal als modelstof gekozen. Cadmium komt voornamelijk als afvalprodukt van de metaal-industrie in het milieu terecht. Verder wordt het gebruikt in batterijen, kleurstoffen en plastics.

Parathion

Parathion is een insecticide en acaracide met choline-esterase remmende werking, dat veelvuldig toegepast wordt in land- en tuinbouw. Ook het eerste afbraakproduct van parathion, paraoxon heeft een zeer sterke choline-esterase remmende werking en is dus zeer toxisch. De persistentie van parathion is sterk afhankelijk van de bacteriële activiteit.

2.4. Blootstellingsprocedure *Ch. riparius* larven aan pentachloorfenol (PCP), Cd en parathion.

Blootstelling van de larven vond plaats in 500 ml polyethyleen bakjes die gevuld waren met 250 ml (over 50 µm gefiltreerd) water uit de Grote Maarsseveense Plas (pH 8, hardheid 150 mg/l CaCO₃), en ca. 2 gram uitgeknepen kunstmatig substraat, bestaande uit cellulose vezels. Na een acclimatisatieperiode van 3 dagen waarin de larven op de tweede dag gevoerd werden, werd PCP, Cd of parathion toegevoegd door uit stockoplossingen te pipetteren (zie bijlage Ia t/m c voor de bereiding van de Stockoplossingen).

De larven werden blootgesteld aan de in tabel 1 gegeven nominale concentraties (zie bijlage Ia t/m c voor de toegevoegde hoeveelheden). Ter verificatie van de blootstellingsconcentraties werden op t = 96 uur (PCP en Cd) en t = 24 uur (parathion) watermonsters genomen die door Aquasense (Cd) of door de Dienst Binnenwateren RIZA (PCP en parathion) werden doorgemeten op de betreffende stof. Per concentratie werden in duplo 10 larven per bakje ingezet. Voor PCP en Cd werd 96 uur na toevoeging en voor parathion 24 uur na toevoeging het aantal dode en levende individuen geteld. De activiteit werd geregistreerd en gekwantificeerd van individuen die 96 uur waren blootgesteld aan 0, 0.032 en 0.32 mg/l PCP, 0, 0.032, 0.1, 1, 2, en 3.2 mg/l Cd en individuen, die 24 uur waren blootgesteld aan 0, 0.00032, 0.001, 0.0032, 0.01, 0.032 en 0.1 µg/l parathion. Per concentratie werd van 5 individuen een activiteitsmeting gemaakt.

Om een indruk te krijgen van de responstijd van de *Ch. riparius* larven voor parathion, werden daarnaast activiteitsmetingen verricht na korte blootstellingstijden. Hiervoor werd bij verschillende concentraties, van steeds één *Ch. riparius* larve per concentratie, een activiteitsmeting gemaakt van 5 uur vanaf het moment dat een bepaalde hoeveelheid parathion was toegevoegd. Dit werd gedaan voor de concentraties 0, 0.001, 0.0032, 0.032 en 0.1 µg/l parathion. Van ieder uur werden de percentages tijd besteed aan de verschillende, in § 2.2. beschreven, typen gedrag berekend.

tabel 1. Nominale blootstellingsconcentraties.

Stof	concentraties							
PCP	0	0.032	0.1	0.32	1	3.2	10	mg/l
Cadmium	0	0.032	0.1	1	2	3.2		mg/l
Parathion	0	0.00032	0.001	0.0032	0.01	0.032		µg/l
		0.1	0.32	1	3.2			

2.5. Blootstellingsprocedure *H. contubernalis* larven aan parathion

In de beperkte tijdsperiode bleken niet voldoende larven van *H. contubernalis* bemonsterd te kunnen worden om alle voorgenomen bepalingen uit te voeren. Vanwege de te verwachten gevoeligheid van deze soort voor parathion, werd deze verbinding als teststof gekozen. Blootstelling van de larven vond plaats in 500 ml polyethyleen bakjes die gevuld waren met 250 ml (over 50 µm gefiltreerd) Rijn water en ca. 5 gram marmer-slag (VNK, aquarium groothandel). De larven werden blootgesteld aan nominale concentraties tussen 0.0001 en 1.0 µg/l parathion. Als controles dienden Rijn water zonder toevoegingen en Rijn water waaraan respectievelijk 25 en 80 µl aceton was toegevoegd (zie bijlage Ic voor de bereiding van de Stock-oplossingen en de toegevoegde hoeveelheden). Per concentratie werden, in duplo, 10 larven per bakje ingezet. Na 24 uur werd het aantal dode en levende individuen geteld.

2.6. Verwerking gegevens

Bij de berekening van de LC_{50} waarden werd gebruik gemaakt van de methode van Litchfield and Wilcoxon (1949). De gegevens uit de gedragsexperimenten werden met elkaar vergeleken met behulp van de Student's t-test. Een speciale t-test werd gebruikt om een enkele waarneming te kunnen vergelijken met een gemiddelde van een aantal waarnemingen (Sokal & Rohlf, 1969). Om een indruk te krijgen van de gevoeligheid van de parameter "gedrag", werd het quotiënt berekend van de LC_{50} waarde van de verschillende organismen en de op het gedrag gebaseerde LOEC van *Ch. riparius*.

3. RESULTATEN

3.1. Blootstellingsconcentraties

In bijlage III wordt een overzicht gegeven van de nominale- en de gemeten testconcentraties. De gemeten concentraties voor PCP lagen ongeveer 40% boven de nominale concentraties, terwijl voor Cd de gemeten concentraties soms beduidend lager waren dan de nominale concentraties (9-80%). Bij de tot standkoming van dit rapport waren de gegevens van parathion nog niet beschikbaar.

3.2. Activiteitsmetingen *Ch. riparius*

Op grond van de activiteitsmetingen van *Ch. riparius* werden drie typen gedrag onderscheiden. Beschrijving en voorbeelden van registraties van deze gedragstypen zijn gegeven in § 2.2.

3.2.1. Respons na 96 uur blootstelling aan PCP.

Larven van *Ch. riparius* die blootgesteld zijn aan PCP vertonen significant meer ventilatiegedrag ($p < 0.001$ voor 0.032 mg/l, $p = 0.003$ voor 0.32 mg/l) en significant minder ander gedrag ($p < 0.001$) dan larven die niet aan PCP zijn blootgesteld (tabel 2). Concentratie afhankelijke verschillen in gedrag werden niet gevonden: de percentages zijn bij 0.032 mg/l niet significant verschillend van die bij 0.32 mg/l (Zie bijlage IIa voor resultaten t-toets).

tabel 2. Percentage van de tijd door *Ch. riparius* besteed aan verschillende typen gedrag na een blootstelling van 96 uur aan PCP. Weergegeven zijn de gemiddelden met hun standaarddeviatie.

nominale concentratie (mg/l)	% ventilatie	% ander gedrag	% inactiviteit
0	16.3 ± 6.6	76.3 ± 6.6	7.4 ± 1.8
0.032	43.2 ± 8.0*	51.6 ± 6.2*	5.0 ± 3.3
0.32	39.6 ± 10.1*	58.9 ± 9.5*	1.5 ± 2.3*

* significant verschillend van % bij 0 mg/l ($p < 0.05$).

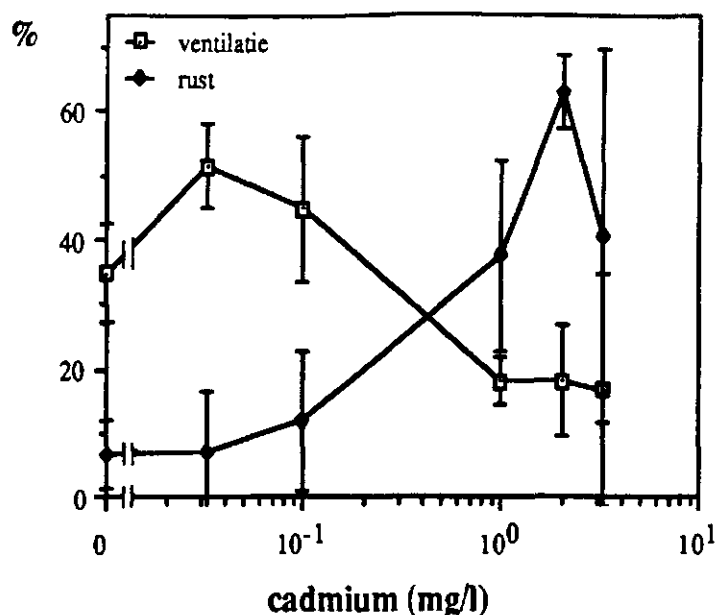
3.2.2. Respons na 96 uur blootstelling aan Cd.

Blootstelling aan Cd induceert bij *Ch. riparius* twee verschillende, concentratie afhankelijke gedragsveranderingen (tabel 3 en fig. 4). Het eerste effect is zichtbaar bij een nominale concentratie van 0.032 mg/l Cd. Larven, blootgesteld aan deze concentratie, besteden significant meer tijd aan ventilatiegedrag dan niet blootgestelde larven ($p = 0.003$). Deze toename gaat ten koste van het percentage tijd besteed aan ander actief gedrag ($p = 0.03$). Het tweede effect speelt een rol bij nominale concentraties van 1 mg/l en hoger: het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag neemt sterk af. Larven die aan deze concentraties blootgesteld zijn, brengen significant meer tijd door in inactiviteit (zie bijlage IIb voor resultaten t-toets).

Tabel 3. Percentage tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na een blootstelling van 96 uur aan Cd. Weergegeven zijn de gemiddelden met hun standaarddeviatie.

nominale Cd concentratie (mg/l)	% ventilatie	% ander gedrag	% inactiviteit
0.000	35.0 ± 7.6	58.3 ±11.8	6.7 ± 5.3
0.032	51.6 ± 6.6*	41.4 ±13.2*	7.0 ± 9.6
0.100	44.8 ±11.5	43.3 ± 6.1	11.7 ±11.0
1.000	18.2 ± 3.9*	44.2 ±11.2*	37.6 ±14.9*
2.000	18.2 ± 8.5*	18.7 ±13.5*	63.1 ± 5.9*
3.200	16.7 ±18.1*	42.3 ±21.8	40.7 ±29.0*

* significant verschillend van % bij 0 mg/l ($p < 0.05$).



figuur 4. Percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag en inactiviteit na 96 uur blootstelling aan verschillende nominale Cd concentraties.

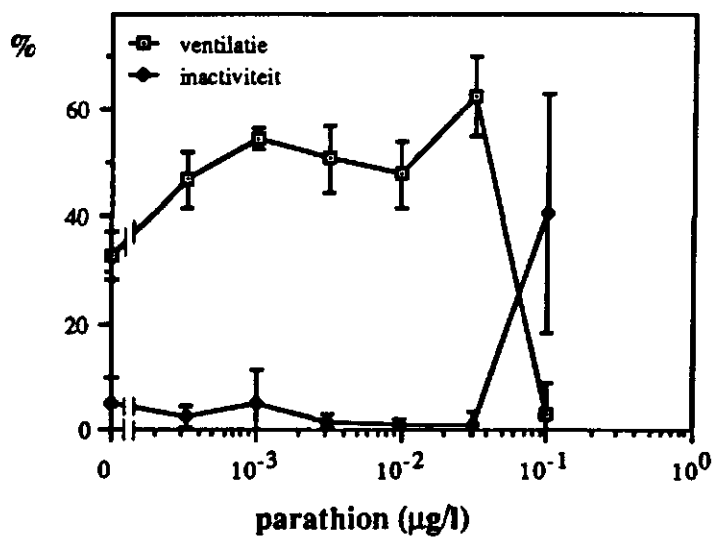
3.2.3. Respons na 24 uur blootstelling aan parathion.

Blootstelling van *Ch. riparius* aan parathion induceert 3 significante effecten in het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag (tabel 4 en fig. 5). Het eerste effect is waarneembaar bij een concentratie van 0.00032 µg/l parathion. Bij deze concentratie ventileren de larven significant meer dan de blanco larven ($p = 0.002$). De larven blijven tot een concentratie van 0.032 µg/l een vergelijkbaar verhoogd percentage ventilatie behouden. Bij 0.032 µg/l treedt het tweede effect op. Bij deze concentratie neemt het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag verder toe ten opzichte van de lagere concentraties ($p < 0.001$). De waargenomen toename in het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag gaat gepaard met een afname in de hoeveelheid tijd besteed aan ander actief gedrag. Het derde effect treedt op bij 0.1 µg/l. Bij deze concentratie neemt het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag significant af ten opzichte van het percentage bij 0.032 µg/l ($p < 0.001$). Deze afname gaat gepaard met een toename in het percentage tijd doorgebracht in inactiviteit ($p < 0.001$). (Voor resultaten t-toets zie bijlage IIc).

Tabel 4. Percentage tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na een blootstelling van 24 uur aan parathion. Weergegeven zijn de gemiddelden met hun standaarddeviatie.

nominale concentratie parathion (µg/l)	% ventilatie	% ander gedrag	% inactiviteit
0.00000	33.0 ± 4.5	62.1 ± 2.2	5.0 ± 4.8
0.00032	47.0 ± 5.2*	50.5 ± 4.0*	2.5 ± 1.8
0.00100	54.7 ± 1.8*	40.0 ± 7.0*	5.0 ± 6.6
0.00320	51.0 ± 6.1*	47.2 ± 5.7*	1.7 ± 1.2
0.01000	48.0 ± 6.4*	51.0 ± 7.2*	0.9 ± 1.0
0.03200	62.7 ± 7.5**	36.3 ± 7.5**	1.0 ± 2.3
0.10000	3.1 ± 5.9***	56.3 ± 19.7	40.6 ± 22.4***

- * significant verschillend van % bij 0 mg/l (p<0.005)
- ** significant verschillend van % bij 0.00032, 0.0032 en 0.01 mg/l (p<0.001)
- *** significant verschillend van % bij alle andere concentraties (p <0.001)



figuur 5. Percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag en inactiviteit na 24 uur blootstelling aan verschillende concentraties parathion.

3.2.4. Respons na een korte blootstelling aan parathion.

Blootstelling van *Ch. riparius* larven aan parathion resulteert binnen 5 uur in een significante verandering in het percentage tijd besteed aan ventilatie bij een concentratie van 0.032 µg/l. In het percentage tijd besteed aan ander gedrag zijn al bij 0.001 µg/l significante verschillen waar te nemen (tabel 5).

Tabel 5. Percentage tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na een blootstelling van 0 tot en met 5 uur aan parathion van een larve. Bij elke (nominale) concentratie zijn de resultaten van een activiteitsmeting van één *Ch. riparius* larve weergegeven. Achter de percentages is aangegeven of deze wel (+) of niet (-) significant verschillen van het gemiddeld percentage van 5 larven uit de blanco (zie tabel 4).

nominale concentratie parathion (µg/l)	uur na toediening	% ventilatie		% ander gedrag		% inactiviteit	
0.00000	1	26.42	-	60.67	-	12.09	-
	2	33.02	-	60.87	-	6.09	-
	3	21.02	-	70.29	+	8.68	-
	4	28.63	-	60.24	-	11.11	-
	5	33.75	-	65.50	-	0.74	-
0.00100	1	26.63	-	70.63	+	2.72	-
	2	31.56	-	52.55	+	15.88	-
	3	45.02	-	50.19	+	4.77	-
	4	35.94	-	63.22	-	0.83	-
	5	32.44	-	67.30	-	0.24	-
0.00320	1	25.61	-	71.02	+	3.36	-
	2	28.91	-	69.00	-	2.08	-
	3	33.22	-	65.13	-	1.63	-
	4	15.74	-	78.97	+	5.27	-
	5	16.85	-	81.36	+	2.05	-
0.03200	1	28.05	-	71.21	+	0.72	-
	2	41.54	-	56.81	-	1.63	-
	3	51.37	+	47.76	+	0.86	-
	4	39.14	-	60.85	-	0.00	-
	5	57.45	+	41.59	+	0.95	-
0.10000	1	17.70	+	56.45	-	25.83	+
	2	33.68	-	64.95	-	1.36	-
	3	14.60	+	85.39	+	0.00	-
	4	33.75	-	65.59	-	0.64	-
	5	57.29	+	42.00	+	0.69	-

3.3. Toxiciteit van parathion voor *H. contubernalis*

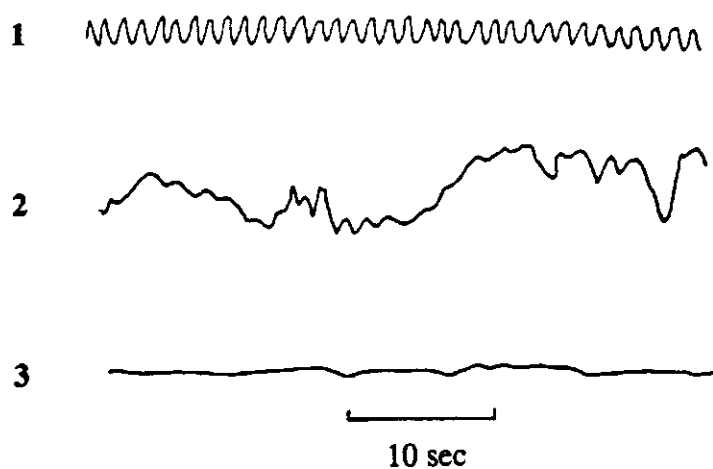
De acute toxiciteit van parathion voor *H. contubernalis* werd bepaald na een blootstellingsduur van 24 uur. Op grond van de gegevens met betrekking tot concentratie afhankelijke sterfte (tabel 6) werd een 24 uur LC₅₀ waarde berekend van 0.64 µg/l parathion (95% BI: 0.44-0.92 µg/l).

Tabel 6. Effect van parathion op de mortaliteit van *H. contubernalis* larven na een blootstelling van 24 uur. Weergegeven zijn de nominale concentraties.

concentratie µg/l	# dood exp. 1	# dood exp. 2	% gemiddeld
0	0	0	0
0.001	0	0	0
0.0032	0	0	0
0.01	0	0	0
0.032	0	0	0
0.1	1	1	5
0.18	1	0	2.5
0.32	3	1	20
0.56	5	4	45
1	7	8	75
3.2	10	10	100

3.4. Activiteitsmetingen *H. contubernalis*

Het meten van de activiteit van de *H. contubernalis* larven leverde een met de *Ch. riparius* larven vergelijkbaar resultaat op. Net als bij de *Ch. riparius* larven zijn er aan het gedragspatroon van de larven van *H. contubernalis* 3 duidelijke typen gedrag te onderscheiden; (1) ventilatie, i.e. dorsoventrale bewegingen van het lichaam, waarmee een waterstroom door het gesponnen net opgewekt kan worden; (2) ander gedrag, i.e. activiteit geassocieerd met voedselopname; en (3) inactiviteit (figuur 6, vergelijk figuur 3). In tabel 7 zijn de percentages tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit van verschillende *H. contubernalis* larven weergegeven.



figuur 6. Typen gedrag van *H. contubernalis*: (1)ventilatie, (2)ander gedrag, (3) inactiviteit.

Tabel 7. Percentage tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit door *H. contubernalis* afkomstig uit de Rijn en uit de Roer.

Vindplaats	% ventilatie	% ander gedrag	% inactiviteit
Rijn	45.73	30.32	23.93
	64.88	22.98	12.13
	18.48	29.13	52.37
	50.26	13.94	35.79
	26.40	46.45	27.14
	88.22	8.40	3.36
	69.87	8.24	21.87
gemiddelde $\pm$ s.d.	51.98 $\pm$ 24.56	22.78 $\pm$ 13.87	25.23 $\pm$ 15.89
Roer	52.41	16.82	30.76
	27.38	26.24	46.36
	11.10	15.50	73.38
	43.80	14.09	42.10
	30.96	33.05	35.97
	20.12	9.60	70.27
	72.19	21.65	6.15
	60.35	20.25	19.39
	36.28	27.15	36.56
	39.25	27.95	32.79
gemiddelde $\pm$ s.d.	39.38 $\pm$ 18.56	21.23 $\pm$ 7.34	39.37 $\pm$ 20.57

4. DISCUSSIE

Zowel de pesticiden pentachloorfenol (PCP) en parathion als het zware metaal cadmium induceren gedragsveranderingen bij *Ch. riparius*. De resultaten suggereren dat, ondanks de grote verschillen in werkingsmechanisme die er tussen de teststoffen bestaan, effecten op het gedrag van *Ch. riparius* zich op dezelfde wijze manifesteren. Als gevolg van de blootstelling aan deze toxische stoffen lijken bij de larven van *Ch. riparius* na een blootstelling van 24 (parathion) of 96 uur (PCP en Cd) twee opeenvolgende, concentratie afhankelijke stress responsen op te treden. De eerst waarneembare stressreactie van *Ch. riparius* is bij alle drie de geteste stoffen steeds het percentage tijd besteed aan het zg. ventilatiegedrag. Dit percentage tijd neemt significant toe ten gevolge van omgevingsstress. In het algemeen gaat deze toename van het ventilatiegedrag gepaard met een afname in het percentage tijd besteed aan ander actief gedrag. Deze stressreactie treedt op bij concentraties die een factor 30-1800 lager liggen dan de voor deze soort letale concentraties. De tweede, bij hogere, maar nog steeds subletale, concentraties optredende respons is duidelijk waar te nemen bij de experimenten met cadmium en parathion: de larven gaan minder tijd aan actief gedrag (i.e. ventilatie- en ander actief gedrag) besteden en brengen in plaats daarvan meer tijd in inactiviteit door.

De hiervoor beschreven effecten werden waargenomen bij larven die geruime tijd blootgesteld waren aan de toxische stoffen (resp. 96 uur aan PCP en Cd en 24 uur aan parathion). Uit een eenmalig uitgevoerd experiment blijkt dat parathion bij *Ch. riparius* ook na een kortere blootsteldingsduur, d.w.z. binnen 5 uur, significante veranderingen in het gedrag induceert. Opvallend is dat in dit experiment de eerste stressrespons zich niet openbaart in het ventilatiegedrag, maar in het andere actieve gedrag. Een significante toename in tijd besteed aan dit type gedrag wordt al waargenomen bij een concentratie van 0.001 µg/l parathion. Pas bij 0.032 µg/l wordt ook een verhoging in het percentage tijd besteed aan ventilatiegedrag waargenomen. Een verklaring voor dit verschijnsel kan zijn, dat bij een eerste contact met de toxische stof een vluchtreactie optreedt, waarneembaar als een toename in het percentage tijd besteed aan actief gedrag. Bij langere blootstelling (als gebleken is dat vluchten geen zin heeft), treedt een, aan de toxische stof aangepast activiteitspatroon op, dat gekarakteriseerd wordt door een toename in de tijd besteed aan ventilatiegedrag. Opgemerkt dient te worden dat deze verklaring enigszins speculatief is, aangezien de dataset wat betreft korte-termijn responsen van *Ch. riparius* op blootstelling aan parathion beperkt is. Wél is duidelijk dat, hoewel de

concentraties waarbij deze korte-termijn effecten waargenomen worden, hoger liggen dan de effect concentratie na een blootstelling van 24 uur, ze toch aanzienlijk lager liggen dan de voor *Ch. riparius* en *D. magna* bepaalde 24, resp. 48 uur LC₅₀ waarden.

Een vergelijking van de op grond van de activiteitsmetingen bepaalde LOEC waarden voor *Ch. riparius* en de LC₅₀ waarden van deze soort, *D. magna* en *H. contubernalis* is gegeven in tabel 8. De op grond van de activiteitsmetingen bepaalde LOEC waarden voor *Ch. riparius* liggen voor de drie geteste stoffen alle ruim onder de LC₅₀ waarden voor deze soort: uit de berekening van het quotiënt van de LOEC- en LC₅₀ waarden blijkt dat effecten op het gedrag waargenomen worden bij concentraties die een factor 30-1800 lager liggen dan LC₅₀ waarden. Voor PCP en parathion liggen deze waarden ook nog resp. een factor 10 en 2500 onder de LC₅₀ waarde voor *D. magna*. De toxiciteit van parathion is voor de larven van de kokerjuffer *H. contubernalis* ongeveer hetzelfde als voor de muggelarve *Ch. riparius*. Men kan verwachten dat ook bij *H. contubernalis* effecten op het gedrag op zullen treden bij concentraties die aanzienlijk onder de letale concentratie liggen.

Het gedrag van de larven van de kokerjuffer *H. contubernalis* blijkt net als dat van muggelarven eenvoudig te registreren en te kwantificeren te zijn. In tegenstelling tot de muggelarven waren de individuele verschillen tussen de larven echter groot. De meest voor de hand liggende oorzaken voor de waargenomen variatie zijn:

1. De verschillen in grootte van de larven, dus in ontwikkelingsstadium. Obreshkove (1930) heeft aangetoond dat er grote verschillen in metabolisme bestaan tussen jonge en oude dieren. Kokerjuffer larven nemen het grootste gedeelte van de voor het metabolisme benodigde zuurstof via ventilatiebewegingen op (Philipson, 1977). Het is dus aannemelijk dat als gevolg van het ontwikkelingsstadium van de larven, verschillen in het percentage tijd besteed aan ventilatie kunnen optreden.
2. Van larven van kokerjuffers is bekend dat het ventilatiegedrag zeer sterk beïnvloed wordt door veranderende zuurstof- en temperatuur omstandigheden. Terwijl bij *Chironomus* soorten een duidelijke toename in de ventilatie pas bij zuurstofconcentraties van ca. 3 mg/l en lager waargenomen wordt (Heinis & Swain, 1986 b), kan dit bij kokerjuffers al bij 6 mg/l optreden (Philipson & Moorhouse, 1976). Verder kan een toename in de temperatuur van 8 °C ruim een verdubbeling van het aantal ventilatiebewegingen per minuut tot gevolg hebben (Philipson, 1977). Betere standaardisering van de meet- en kweekomstandigheden zal tot een aanzienlijke

reductie van de variatie leiden.

Tabel 8. Toxiciteit van cadmium en pentachloorfenol voor *Daphnia magna* en *Chironomus riparius* en van parathion voor *D. magna*, *Ch. riparius* en *Hydropsyche contubernalis*. De LOEC geeft die concentratie van de toxicant aan waarbij het gedrag van *Ch. riparius* significant verschilt van de blanco. Weergegeven zijn de nominale concentraties van de toxicanten.

Stof	Organisme	Blootstel- lingsduur	LC50	95% betrouw- baarheidsinterval	LOEC	LC50/LOEC	Uitvoerder
cadmium*	<i>D. magna</i>	48 uur	0.056				DBW/RIZA
	<i>D. magna</i>	48 uur	0.035	0.016-0.079		1a	Aquasense
	<i>Ch. riparius</i>	96 uur	10.0				DBW/RIZA
	<i>Ch. riparius</i>	96 uur	10.8	7.3-15.9	0.032	338	Aquasense
PCP*	<i>D. magna</i>	48 uur	0.56				DBW/RIZA
	<i>D. magna</i>	48 uur	0.38	0.27-0.54		12a	Aquasense
	<i>Ch. riparius</i>	96 uur	5.0				DBW/RIZA
	<i>Ch. riparius</i>	96 uur	1.16	0.58-1.74	0.032	36	Aquasense
parathion**	<i>D. magna</i>	48 uur	1.3				DBW/RIZA
	<i>D. magna</i>	48 uur	0.85	0.50-1.45		2656a	Aquasense
	<i>Ch. riparius</i>	24 uur	0.5				DBW/RIZA
	<i>Ch. riparius</i>	24 uur	0.60	0.29-1.26	0.00032	1875	Aquasense
	<i>H. contubernalis</i>	24 uur	0.64	0.44-0.92			Aquasense

* LC50 en LOEC in mg/l

** LC50 en LOEC in µg/l

a LC50-*D. magna*/ LOEC-*Ch. riparius*

Uit het voorafgaande blijkt dat het met behulp van de impedantie conversie-techniek bepaalde gedrag van *Ch. riparius* in vergelijking met standaard toxiciteitstests met deze soort en *D. magna* een gevoelige parameter is voor de detectie van de pesticiden PCP en parathion. Met behulp van deze techniek is het mogelijk om het gedrag continu te registreren. In hoeverre de

gevoeligheid hoog genoeg is voor de signalering van een lozing is nog niet duidelijk. Wel is bekend dat bij een "PCP-ongeval" in de Mississippi in het water concentraties van 16-147 µg/l gemeten werden (Baier et al., 1985). Deze concentraties liggen in elk geval in het gebied waar *Ch. riparius* al een afwijkend gedrag vertoont. Wat betreft de signalering van PCP (en mogelijk ook aanverwante, toxische verbindingen) zou de methode gevoelig genoeg kunnen zijn. Een continue registratie in de tijd zal hier echter meer duidelijkheid over moeten verschaffen. Zoals uit het experiment met parathion bleek, kunnen effecten op het gedrag ook na een korte blootstelling van enkele uren bij lage concentraties gesignaleerd worden.

Om verder aan alle, aan biologische bewakingssystemen te stellen criteria (zie Cairns in: Botterweg 1988), te kunnen voldoen is het voor het in dit rapport beschreven testsysteem, noodzakelijk om aandacht te geven aan een aantal punten. Behalve de hierboven genoemde aspecten met betrekking tot standaardisatie van kweek- en meetomstandigheden enerzijds en tijdsafhankelijke stofspecifieke responsregistraties anderzijds, moet de nadruk liggen op het continu simultaan meten van meerdere individuele organismen en het automatiseren van de verwerking van de gegevens. Tevens is aanvullend onderzoek gewenst met betrekking tot de gevoeligheid van *Hydropsyche* larven voor specifieke stoffen en de geschiktheid van dit organisme voor het impedantie-conversie registratie systeem.

5. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Op grond van het in dit rapport uitgevoerde onderzoek, kunnen wij concluderen dat het impedantie conversie-systeem zowel voor *Ch. riparius* larven als voor *H. contubernalis* larven bruikbaar is om de aanwezigheid van toxische stoffen te signaleren. De eerste effecten van PCP, Cd en parathion op *Ch. riparius* blijken bij concentraties op te treden, die een factor 30-1800 onder de LC_{50} waarde liggen. Deze waarden liggen voor PCP en parathion ook nog resp. een factor 10 en 2500 onder de LC_{50} waarde voor *D. magna*. Voor parathion konden significante effecten binnen 5 uur waargenomen worden bij relevant lage concentraties. De eerste effecten op *H. contubernalis* ten gevolge van parathion zijn bij vergelijkbare lage concentraties te verwachten. Het feit, dat *H. contubernalis* een in de Rijn voorkomende soort is en omdat deze soort, met behulp van de ontworpen huls, makkelijk in het systeem in te brengen is, maken deze soort tot een geschikte kandidaat. Om echter aan alle, aan biologische alarmerings-systemen gestelde criteria, te kunnen voldoen zal er op verschillende punten nog verder onderzoek moeten plaatsvinden.

Biologisch

1. Indien als testorganisme de kokerjuffer *H. contubernalis* gekozen wordt dan zullen de mogelijkheden tot het kweken van deze soort verder moeten worden onderzocht. Een eerste aanvang is hiermee door Aquasense reeds gemaakt. Door dieren uit een gestandaardiseerde kweek te gebruiken zal zeker een deel van de individuele spreiding weggenomen kunnen worden.
2. Een tweede punt betreft de individuele variatie onder "blanco" omstandigheden. Onderzocht dient te worden in hoeverre variatie optreedt als de dieren aan gestandaardiseerd Rijn-water worden blootgesteld. Ook van belang is de variatie als gevolg van fluctuaties in de temperatuur, zuurstofconcentratie en stroomsnelheid.
3. Verder testen van toxische stoffen, en eventueel mengsels daarvan, na verschillende blootstellingsduren. Op grond daarvan kunnen voorspellingen gedaan worden over de respons van het organisme op een "spike" van een of meerdere toxische stoffen.

Technisch

1. De software voor de automatische verwerking van de signalen dient verder ontwikkeld te worden.

2. Ontwikkeling van een op de specifieke omstandigheden aangepast doorstroomsysteem. Hierbij moet rekening gehouden worden met het feit dat bij voorkeur het gedrag van een of meerdere testorganismen vergeleken wordt met het gedrag van "blanco" organismen.

6. LITERATUUR

- Baier, C., Hurle K. und J. Kirchhoff, 1985. Datensammlung zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen für Gewässer. DWK Schriften. Hamburg und Berlin, Verlag Paul Parey. pp. 294.
- Batac-Catalan, Z. and D.S. White, 1983. Effect of chromium on larval Chironomidae as determined by the optical-fiber light-interruption biomonitoring system. In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium, ASTM STP 802., edited by W.E. Bishop, R.D. Cardwell, and B.B. Heidolph. Am. Soc. Test. Mat., Philadelphia, pp. 469-481.
- Botterweg, J., 1988. Continue signalering van toxische stoffen in het aquatisch milieu met behulp van biologische bewakingssystemen. Literatuurstudie. Rapport Dienst Binnenwateren RIZA/Adviesbureau BKH.
- Heinis, F. and W.R. Swain, 1986 a. Impedance conversion as a method of research for assessing behavioral responses of aquatic invertebrates. Hydrobiol. Bull. 19, 183-192.
- Heinis, F. and W.R. Swain, 1986 b. Behavioral responses to changing oxygen concentrations in relation to distribution patterns of selected chironomid larvae. In: Proc. 3rd Eur. Congr. Entomol., edited by H.H.W. Velthuis. Ned. Entomol. Ver., Amsterdam, pp. 87-90.
- Heinis, F., K.R. Timmermans and W.R. Swain. in prep. Short-term sublethal effects of cadmium on the filter feeding chironomid larva *Glyptotendipes pallens* (Meigen) (Diptera).
- Henry, M.G., D.N. Chester and W.L. Mauck, 1986. Role of artificial burrows in *Hexagenia* toxicity tests: recommendations for protocol development. Environ. Toxicol. Chem. 5, 553-559.
- Konasewich, D., Traversy W., and H. Zar, 1978. Great Lakes water quality. Status report on organic and heavy metal contaminants in Lakes Erie, Michigan, Huron and Superior basins to the Implementation Committee of the Great Lakes Quality Board. Intl. Joint Commission, Windsor.
- Nimmo, D.R., 1985. In: Fundamentals of aquatic toxicology, edited by G.M. Rand and S.R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, New York, London, pp. 335-373.
- Obreshkove, V., 1930. Oxygen consumption in the developmental stages of a Cladoceran. Physiol. Zool. 11, 271-282.

- Philipson, G.N., 1977. The undulatory behaviour of larvae of *Hydropsyche pellicula* CURTIS and *Hydropsyche siltalai*. DÖHLER. in: Proc. 2nd Int. Symp. on Trichoptera.
- Philipson, G.N. and B.H.S. Moorhouse, 1974. Observations on ventilatory and net spinning activities of larvae of the genus *Hydropsyche pictet* (Trichoptera, Hydropsychidae) under experimental conditions. Freshwat. Biol. 4, 525-533.
- Rand, G.M., 1985. In: Fundamentals of aquatic toxicology, edited by G.M. Rand and S.R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, New York, London, pp. 221-263.
- Scherer, E. and R.E. McNicol, 1986. Behavioural responses of stream-dwelling Acroneuria lycorias (Ins., Plecopt.) larvae to methoxychlor and fenitrothion. Aquat. Toxicol. 8, 251-263.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf, 1969. Biometry. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 776 pp.

PUBLICATIES EN RAPPORTEN VAN HET PROJECT "ECOLOGISCH HERSTEL RIJN"

- no. 1 - 1988 Ecological rehabilitation of the river Rhine: a proposal for a Netherlands research programme. (DBW, RIVM, RIVO).
- no. 2 - 1988 Fish and their environment in large european river ecosystems; the Dutch part of the river Rhine. W.G. Cazemier, Science de l'Eau 7, 95-114 (1988). (RIVO).
- no. 3 - 1988 High rates of denitrification in a storage reservoir fed with water of the river Rhine. W. Admiraal en J.C. van der Vlugt, Arch.Hydrobiol. 113, 593-605 (1988). (RIVM)
- no. 4 - 1988 Impact of biological activity on detritus transported in the lower river Rhine: an exercise in ecosystem analy. W. Admiraal en B. van Zanten, Freshwater Biology 20, 215-225 (1988). (RIVM).
- no. 5 - 1988 Continue signalering van toxische stoffen in het aquatische milieu met behulp van biologische bewakingssystemen - literatuurstudie. J. Botterweg, 31 pp., Den Haag (1988). (DBW).
- no. 6 - 1988 Environmental stress in five aquatic ecosystems in the floodplain of the river Rhine. W. Admiraal, E.D. de Ruyter van Steveninck en H.A.M. de Kruijf. The Science of the Total Environment 78, 59-75 (1988). (RIVM).
- no. 7 - 1989 Bioaccumulation in yellow ell (*Anguilla anguilla*) and perch (*Perca fluviatilis*) from the Dutch branches of the Rhine-mercury, organochlorine compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. F. van der Valk, H. Pieters en R.C.C. Wegman. (RIVO).
- no. 8 - 1989 Beoordeling en evaluatie van biologische alarmeringssystemen op het meetstation Lobith. Bio-alarm projekt fase I. J. Botterweg. (DBW)
- no. 9 - 1989 Ecologisch herstel Rijn - beleid en onderzoek. Symposium-verslag 26 mei. E.C.L. Marteijs (red.) (DBW).
- no. 10 - 1989 Summary of results and conclusions from the first phase (1988-1989) of the Netherlands research programme "Ecological Rehabilitation Rhine". J.A.W. de Wit, W. Admiraal, C. van der Guchte and W.G. Cazemier. (DBW).
- no. 11 - 1989 Literature survey into the possibility of restocking the River Rhine and its tributaries with Atlantic salmon (*Salmo salar*). S.J. de Groot. (RIVO).
- no. 12 - 1989 Literature survey into the possibility of restocking the River Rhine and its tributaries with sea trout (*Salmo trutta trutta*). S.J. de Groot. (RIVO).
- no. 13 - 1989 Water- en oeverplanten in het zomerbed van de Nederlandse grote rivieren in 1988. Hun voorkomen en relatie met algemene fysische en chemische parameters. M.M.J. Maenen. (DBW).
- no. 14 - 1989 Ecologisch herstel van de Rijnmakrofauna. B. van Dessel. (DBW).
- no. 15 - 1989 Comparison of nitrification rates in three branches of the lower river Rhine. Biogeochemistry 8, 135-151. W. Admiraal and Y.J.H. Botermans. (RIVM).
- no. 16 - 1990 Vegetatie in de uiterwaarden: de invloed van hydrologie, beheer en substraat. M.C.C. de Graaf, H.M. van de Steeg, L.A.C.J. Voeseek en C.W.P.M. Blom. (DBW).
- no. 17 - 1990 Chemicals affecting the spawning migration of anadromous fish by causing avoidance responses or orientational disability, with special reference to concentrations in the River Rhine. T.C. van Brummelen. (DBW)
- no. 18 - 1990 Biomonitoring met de larven van Chironomiden en kokerjuffers. F. Heinis en T. Krommentuijn. (DBW)

Aanvragen/requests:

(DBW): Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment, P.O. Box 17, 8200 AA Lelystad, The Netherlands.
 (RIVM): National Institute for Public Health and Environmental Protection, P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands.
 (RIVO): Netherlands Institute for Fishery Investigations, P.O. Box 68, 1970 AB IJmuiden, The Netherlands.

bijlage Ia Bereiding van de pentachloorfenol Stock-oplossingen en toegevoegde hoeveelheden.

Er werd 10 mg pentachloorfenol (PCP) afgewogen. Dit werd opgelost in 10 ml Dimethylsulfoxide (DMSO, Merck art.2931), waardoor Stock I ontstond (1 mg/ml PCP). 1 ml uit stock I werd doorverdund tot Stock II, door er 9 ml DMSO aan toe te voegen (0.1 mg/ml PCP). Stock III (0.01 mg/ml) ontstond door 1 ml uit stock II met 9 ml DMSO te vermengen. Om de gebruikte nominale concentraties te verkrijgen zijn uit deze Stocks aan 250 ml gefiltreerd Maarsseveenwater de volgende hoeveelheden toegevoegd:

<u>Nominale concentratie (mg/l).</u>	<u>µl toegevoegd aan 250 ml Maarsseveenw.</u>
0.000	0
0.032	80 µl uit Stock II
0.100	250 µl uit Stock II
0.320	80 µl uit Stock I
1.000	250 µl uit Stock I
3.200	800 µl uit Stock I
10.000	2500 µl uit Stock I

De maximale concentratie van DMSO in de testmedia was minder dan 1%

bijlage Ib Bereiding van de cadmium Stock-oplossingen en toegevoegde hoeveelheden.

Voor de bereiding van Stock I (0.1 mg/ml) werd uit een standaard-oplossing CdCl₂ (Merck, 1000 mg/l Cd) 1 ml gepipetteerd, die werd aangevuld met 9 ml bidest. Hieruit werd Stock II (0.01 mg/ml) bereid door 1ml uit Stock I aan te vullen met 9 ml bidest. Uit Stock II werd vervolgens weer Stock III bereid door 1 ml uit Stock II aan te vullen met 9 ml bidest. Om de gebruikte nominale concentraties te verkrijgen werden uit deze Stocks de volgende hoeveelheden toegevoegd:

<u>Nominale concentratie(mg/l).</u>	<u>µl toegevoegd aan 250 ml Maarsseveenw.</u>
0.000	0
0.032	80 µl uit Stock II
0.100	250 µl uit Stock II
0.320	80 µl uit Stock I
1.000	250 µl uit Stock I
3.200	800 µl uit Stock I
10.000	2500 µl uit Stock I

bijlage Ic Bereiding van de parathion Stock-oplossingen en toegevoegde hoeveelheden.

Uit een voorraad-Stock parathion-ethyl (10ng/μl) werd 1 ml gepipetteerd en aangevuld met 9 ml aceton (=Stock I, 1ng/μl). Hieruit werd Stock II (0.1 ng/μl) bereid, door aan 1 ml Stock I 9ml aceton toe te voegen. Uit Stock II werd vervolgens weer Stock III (0.01 ng/μl) bereid, door aan 1ml Stock II 9 ml aceton toe te voegen en uit Stock III werd vervolgens Stock IV (0.001 ng/μl) bereid door aan 1 ml Stock III 9 ml aceton toe te voegen. Om de gebruikte nominale concentraties te verkrijgen werden uit deze Stocks de volgende hoeveelheden toegevoegd:

-Ch. riparius-proef.

<u>Nominale concentratie(μg/l).</u>	<u>μl toegevoegd aan 250 ml Maarsseveenw.</u>
0.00000	0
0.00010	25 μl uit Stock IV
0.00032	80 μl uit Stock IV
0.00100	25 μl uit Stock III
0.00320	80 μl uit Stock III
0.01000	25 μl uit Stock II
0.03200	80 μl uit Stock II
0.10000	25 μl uit Stock I
0.32000	80 μl uit Stock I
1.00000	25 μl uit voorraad-Stock
3.20000	80 μl uit voorraad-Stock

De concentratie van het oplosmiddel aceton in de testmedia was nooit meer dan 0.01%

-H. contubernalis-proef.

<u>Nominale concentratie(μg/l).</u>	<u>μl toegevoegd aan 250 ml Maarsseveenw.</u>
0	0
0.00010	25 μl uit Stock IV
0.00032	80 μl uit Stock IV
0.00100	25 μl uit Stock III
0.00320	80 μl uit Stock III
0.01000	25 μl uit Stock II
0.03200	80 μl uit Stock II
0.10000	25 μl uit Stock I
0.18000	45 μl uit Stock I
0.32000	80 μl uit Stock I
0.56000	14 μl uit voorraad-Stock
1.00000	25 μl uit voorraad-Stock

bijlage IIa Significantieverschillen van de percentages tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na 96 uur blootstelling aan PCP. Een (+) geeft aan dat er wél en een (-) dat er geen significant verschil is ($p < 0.05$).

ventilatie

concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.320
0.000			
0.032	+		
0.320	+	-	

ander gedrag

concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.320
0.000			
0.032	+		
0.320	+	-	

inactiviteit

concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.320
0.000			
0.032	-		
0.320	+	-	

bijlage IIb Significantieverschillen van de percentages tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na 96 uur blootstelling aan Cd. Een (+) geeft aan dat er wél en een (-) dat er geen significant verschil is (p <0.05).

<u>ventilatie</u>					
concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.100	1.000	2.000
0.000					
0.032	+				
0.100	-	-			
1.000	+	+	+		
2.000	+	+	+	-	
3.200	+	+	+	-	-

<u>ander gedrag</u>					
concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.100	1.000	2.000
0.000					
0.032	+				
0.100	-	-			
1.000	+	-	-		
2.000	+	+	+	-	
3.200	-	-	-	-	-

<u>inactiviteit</u>					
concentratie (mg/l)	0.000	0.032	0.100	1.000	2.000
0.000					
0.032	-				
0.100	-	-			
1.000	+	+	+		
2.000	+	+	+	+	
3.200	+	+	-	-	-

bijlage IIc Significantieverschillen van de percentages tijd besteed aan ventilatie, ander gedrag en inactiviteit na 24 uur blootstelling aan **parathion**. Tevens is aangegeven of er een verschil is tussen dieren die gedurende 24 uur waren blootgesteld aan 25 µl en 80 µl aceton (per bakje). Een (+) geeft aan dat er wél en een (-) dat er geen significant verschil is ($p < 0.05$).

ventilatie

concentratie (µg/l)	0	0.00032	0.001	0.0032	0.01	0.032	0.1	25µl Ac	80µl Ac
0								-	-
0.00032	+								
0.001	+	+							
0.0032	+	-	-						
0.01	+	-	+	-					
0.0320	+	+	-	+	+				
0.1	+	+	+	+	+	+			

ander gedrag

concentratie (µg/l)	0	0.00032	0.001	0.0032	0.01	0.032	0.1	25µl Ac	80µl Ac
0								-	-
0.00032	+								
0.001	+	+							
0.0032	+	-	-						
0.01	+	-	+	-					
0.0320	+	+	-	+	+				
0.1	-	-	-	-	-	-			

inactiviteit

concentratie (µg/l)	0	0.00032	0.001	0.0032	0.01	0.032	0.1	25µl Ac	80µl Ac
0								-	-
0.00032	-								
0.001	-	-							
0.0032	-	-	-						
0.01	-	-	-	-					
0.0320	-	-	-	-	-				
0.1	+	+	+	+	+	+			

bijlage III Nominale en gemeten concentraties PCP en Cd na 96 uur en parathion na 24 uur.

<u>Nominale concentratie PCP (mg/l)</u>	<u>Gemeten concentratie PCP na 96 uur (mg/l)</u>
0.032	0.04
0.32	0.447

<u>Nominale concentratie Cd (mg/l)</u>	<u>Gemeten concentratie Cd na 96 uur (mg/l)</u>
0	0.00 ± 0.00
0.100	0.02 ± 0.00
1.000	0.63 ± 0.01
2.000	1.75 ± 0.22
3.200	2.90 ± 0.12

<u>Nominale concentratie parathion (µg/l)</u>	<u>Gem. concentratie parathion na 24 uur (µg/l)</u>
0.1	
0.32	