

Practicum Ecological Toxicology

1. Inleiding en doelstellingen

In dit practicum zal de acute toxiciteit van drie verschillende componenten en hun mengsels worden onderzocht. Belangrijk is het type interactie tussen de verschillende componenten in het mengsel. Van elke stof zal een concentratiereeks worden opgesteld waarna vervolgens aan elke concentratie een hoeveelheid test organismen worden toegevoegd. De mortaliteit van de test organismen zal opgevolgd worden in functie van de concentratie van de stof waaraan deze werden blootgesteld. Er wordt gewerkt met watervlooien (*Daphnia magna*, O. Diplostraca, Cl. Branchiopoda). Dit is een veel voorkomende soort in de noordelijke hemisfeer. De vlooien komen algemeen voor in vijvers en meren, waar ze een belangrijke plaats innemen in voedselwebben. De organismen gebruikt in dit practicum zijn afkomstig uit een gecontroleerde cultuur uit het laboratorium.

Er worden drie stoffen onderzocht, een metaal (Cadmium), een organische micropolluent (Novosol) en een zout (CaCl_2). Cadmium is een niet-essentieel metaal dat terug gevonden wordt in aquatische milieus. Novosol is een commerciële herbicide met als actieve component Glyphosate. Wereldwijd is het de meest gebruikte herbicide. Ten slotte wordt Calciumchloride (CaCl_2) onderzocht, een algemeen voorkomende stof in de effluenten van de fosfaatindustrie. Zowel Calcium als chloor zijn essentiële elementen die in alle aquatische ecosystemen voorkomen.

2. Materiaal en methode

Het doel van dit practicum is om de concentratie te vinden waarop 50 % van de testorganismen sterft (LC_{50}). Dit kan bepaald worden na een periode van 24, 48 of 72 uur.

Voor de uitvoering van het practicum wordt gebruik gemaakt van drie stockoplossingen van respectievelijk Cadmium (10 g l^{-1}), Novosol (50 g l^{-1}) en CaCl_2 (100 g l^{-1}). Eerst wordt een range finding test uitgevoerd om te bepalen welke concentratiereeks gebruikt zal worden voor de eigenlijke toxiciteitstest. Voor deze test werden per component 5 verschillende concentraties en een blanco oplossing aangemaakt. Volgende tabel geeft de gekozen concentratiereeksen weer:

Component	Cadmium	CaCl_2	Novosol
Concentratie	Blanco	Blanco	Blanco
	1 g/l	25 g/l	100 mg/l
	100 mg/l	2,5 g/l	10 mg/l
	10 mg/l	250 mg/l	1 mg/l
	1 mg/l	25 mg/l	100 $\mu\text{g/l}$
	100 $\mu\text{g/l}$	2,5 mg/l	10 $\mu\text{g/l}$

Tabel 1. Concentratiereeksen voor het bepalen van de te gebruiken range

Vervolgens werden aan elke oplossing 10 watervlooien toegevoegd en werden de potjes bewaard in een klimaatkast (20°C). Na 48u werd dan de mortaliteit vastgesteld.

Vervolgens werden de resultaten van de verschillende groepen met elkaar vergeleken om uiteindelijk een besluit te nemen over de te gebruiken concentratie range voor de eigenlijke toxiciteitstest. Opnieuw worden voor twee componenten, 5 concentraties en een blanco oplossing aangemaakt.

Practicum Ecological Toxicology

Ook wordt een concentratiereeks van een mengsel van 2 componenten opgesteld. Volgende tabel geeft de gekozen concentratiereeksen weer:

			Mengsel	
Component	Cadmium	CaCl ₂	Cadmium	CaCl ₂
Concentratie	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	1 mg/l	10 g/l	400 µg/l	4 g/l
	800 µg/l	8 g/l	320 µg/l	3,2 g/l
	600 µg/l	6 g/l	240 µg/l	2,4 g/l
	400 µg/l	4 g/l	160 µg/l	1,6 g/l
	200 µg/l	2 g/l	80 µg/l	0,8 g/l

Tabel 2. Concentratie van de uiteindelijke concentratierange

Ook aan deze reeksen worden telkens 10 testorganismen toegevoegd, waarna deze weer in de klimaatkast worden geplaatst. Na 72u werd de mortaliteit vastgesteld. Aan de hand van deze gegevens kan de LC₅₀-72u worden berekend. Er kan worden onderzocht welk type interactie er plaatsvindt in het mengsel door de LC₅₀ verwacht voor de afzonderlijke componenten te vergelijken met deze voor het mengsel. De verwerking van de gegevens en de berekening van de LC₅₀ wordt uitgevoerd met het statistisch pakket R.

3. Resultaten

Voor de range finding test wordt na 48u de mortaliteit bepaald. De resultaten worden weergegeven in volgende tabel:

Component	Concentratie	Mortaliteit
Cadmium	Blanco	0
	1 g/l	10
	100 mg/l	10
	10 mg/l	10
	1 mg/l	10
	100 µg/l	0
CaCl ₂	Blanco	2
	25 g/l	10
	2,5 g/l	8
	250 mg/l	1
	25 mg/l	1
	2,5 mg/l	1
Novosol	Blanco	0
	100 mg/l	10
	10 mg/l	9
	1 mg/l	1
	100 µg/l	1
	10 mg/l	0

Practicum Ecological Toxicology

Tabel 3. Mortaliteit in de concentratiereeksen voor het bepalen van de te gebruiken range (na 48u).

Vervolgens werd de eigenlijke toxiciteitstest uitgevoerd. De mortaliteit werd deze keer bepaald na 72u. De resultaten worden weergegeven in volgende tabel:

Stof	Concentratie	Mortaliteit
Cadmium	Blanco	0
	1 mg/l	10
	800 µg/l	10
	600 µg/l	10
	400 µg/l	10
	200 µg/l	7
CaCl ₂	Blanco	0
	10 g/l	10
	8 g/l	10
	6 g/l	10
	4 g/l	10
	2 g/l	4

Mengsel	Cadmium	CaCl ₂	Mortaliteit
	Blanco	Blanco	0
	400 µg/l	4 g/l	10
	320 µg/l	3,2 g/l	10
	240 µg/l	2,4 g/l	10
	160 µg/l	1,6 g/l	10
	80 µg/l	0,8 g/l	10

Tabel 4. Mortaliteit in de concentratiereeksen van de eigenlijke toxiciteitstest (na 72u).

Voor het berekenen van de LC₅₀ wordt het statistisch pakket R gebruikt. Met behulp van volgende code werd de LC₅₀ geschat:

```
# first install drc package
library(drc)

# CaCl2/cd/novosol (= ~)
rm(list=ls())
~<-read.csv(file=~".csv",header=T,sep=",")
~

~.m1<-drm(no/total~_conc,weights=total,type="binomial",fct=LL.2(),data=~)
summary(~.m1)
plot(~.m1,pch=20,xlab=~"concentration (mg/L)",ylab="Mortality as fraction of total #",cex=0.5)
```

Practicum Ecological Toxicology

De waarden bekomen uit de tests, uitgevoerd tijdens de practica sessies, waren echter niet bruikbaar door het zeer hoge sterftcijfer. Een mogelijke verklaren is het feit dat de resultaten van de range finding test gebaseerd waren op een blootstellingsduur van 48 uur. Tijdens de eigenlijke test duurde de blootstelling 72 uur lang wat een hogere mortaliteit bij dezelfde concentraties ten gevolg had. Daarom wordt er gebruik gemaakt van de data van de range finding tests op blackboard.

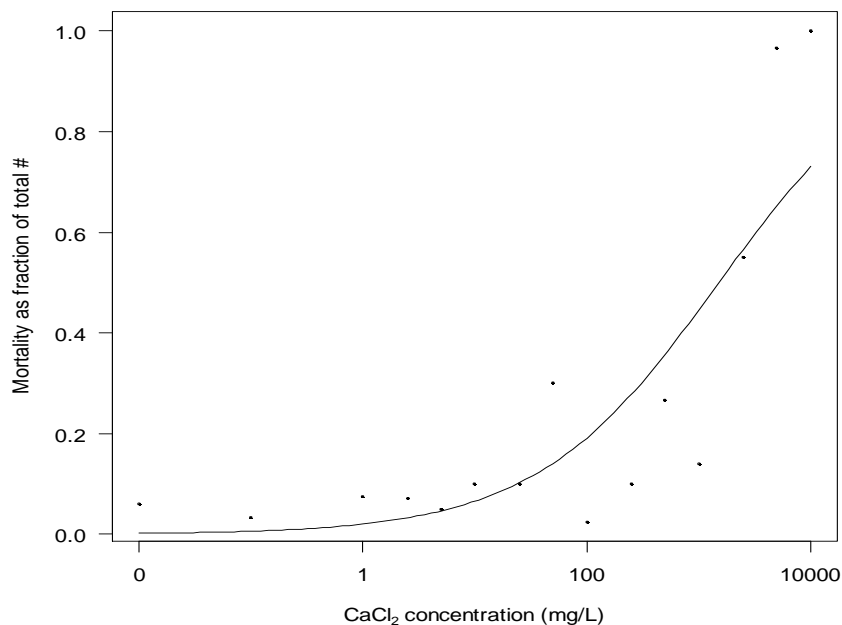
Range finding test:

LC₅₀ CaCl₂:

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	-0.529573	0.057233	-9.252966	0e+00
e:(Intercept)	1518.550628	424.214054	3.579680	3e-04



De LC₅₀ van CaCl₂ berekend met R is 1518.550628 mg/L.

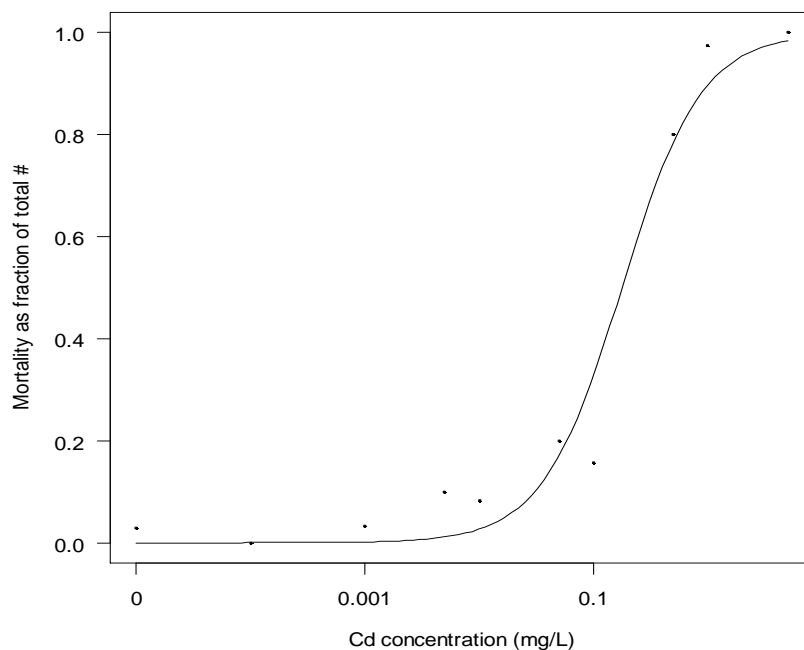
Practicum Ecological Toxicology

LC₅₀ Cd:

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	-1.252405	0.143799	-8.709445	0
e:(Intercept)	0.176771	0.026791	6.598068	0



De LC₅₀ van Cd berekend met R is 0.176771 mg/L

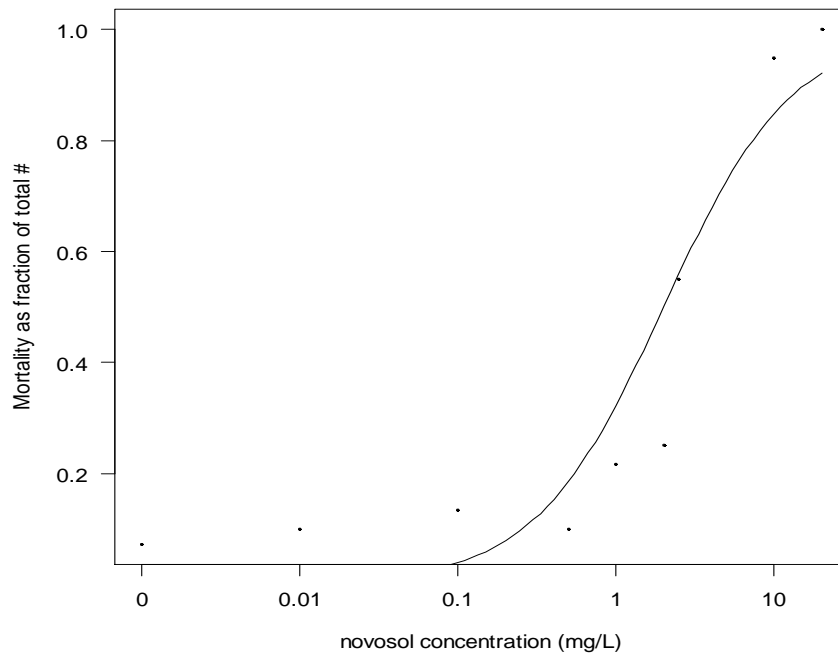
LC₅₀ Novosol:

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	-1.06936	0.14281	-7.48776	0
e:(Intercept)	1.99487	0.31582	6.31642	0

Practicum Ecological Toxicology



De LC_{50} van Novosol berekend met R is 1.99487 mg/L

Definitieve toxiciteitstest:

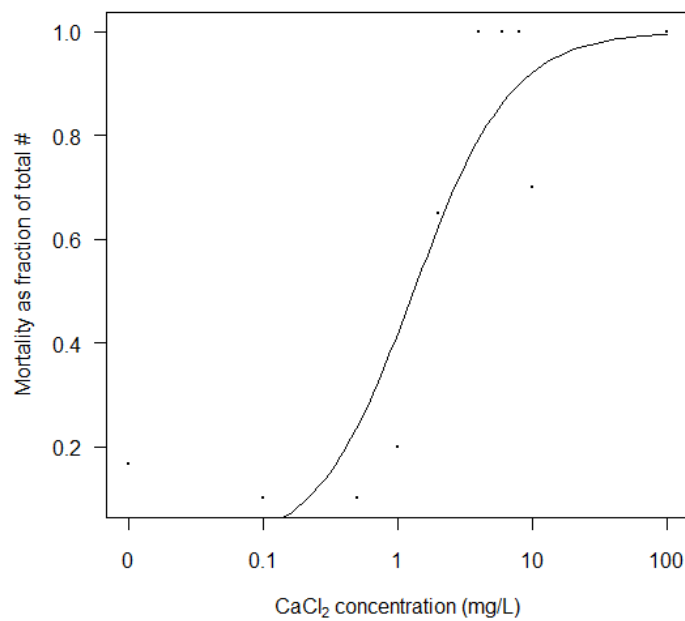
$LC_{50} CaCl_2$:

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	-1.20751	0.21796	-5.54009	0
e:(Intercept)	1.32164	0.30339	4.35628	0

Practicum Ecological Toxicology



De LC_{50} van $CaCl_2$ berekend met R is 1,32164 mg/L.

LC_{50} Cd:

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)

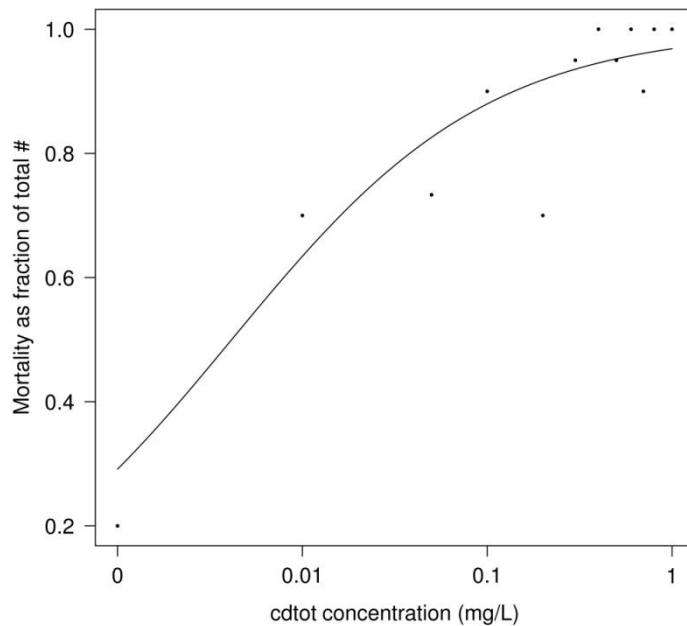
Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
--	----------	------------	---------	---------

b:(Intercept)	-0.6249611	0.1361193	-4.5912735	0.0000
---------------	------------	-----------	------------	--------

e:(Intercept)	0.0041456	0.0028900	1.4344603	0.1514
---------------	-----------	-----------	-----------	--------

Practicum Ecological Toxicology



De LC_{50} van Cd berekend met R is 0.0041456 mg/L

In het Cd/ $CaCl_2$ -mengsel waren bij elke concentratie alle watervlooien dood. Het heeft bijgevolg niet veel zin om voor dit mengsel een LC_{50} berekening uit te voeren.

4. Discussie en conclusie

De LC_{50} -waarden die berekend werden aan de hand van de range finding test, geven weer dat cadmium het meest toxische is van de drie onderzochte stoffen. Er is slechts een minimale concentratie (0.176771 mg/L) nodig om de helft van de watervlooien te doden. Novosol is de 2^e giftigste stof met een LC_{50} van 1.99487 mg/L. $CaCl_2$ is laatste met een LC_{50} van 1518.550628 mg/L. $CaCl_2$ wordt vaak als strooizout gebruikt, waardoor het best is dat deze niet al te schadelijk is voor het milieu.

Indien de resultaten van de eigenlijke toxicologische tests beschouwd worden, valt op dat er een zeer hoog algemeen sterftcijfer was. Dit cijfer is toe te schrijven aan de lange blootstellingsduur, namelijk 72 uur. De gebruikte concentraties werden immers gekozen na range finding tests van slechts 48 uur. De berekening van de LC_{50} -waarden aan de hand van de toxicologische test geven een concentratie van respectievelijk 0.0041456 mg/L voor cadmium en 1,32164 mg/L voor $CaCl_2$. Deze waarden liggen beduidend lager als bij de range finding test.

Over het mengsel kan er geen duidelijke conclusie worden getrokken omdat alle watervlooien dood waren bij alle gebruikte concentraties. Wellicht ligt de LC_{50} van het mengsel lager als bij de 2 stoffen afzonderlijk aangezien er bij de laagste concentratie, zowel bij Cd als bij $CaCl_2$, nog enkele watervlooien in leven waren terwijl dit bij het mengsel niet het geval was. We kunnen hier dan spreken over synergisme wat wil zeggen dat beide toxische stoffen elkaars werking, en dus ook hun effecten, gaan versterken.