

TOXICON AB

**EKOTOXIKOLOGISK TEST PÅ VATTEN TILLSATT
PESTICIDER**

Tiilväxthämningstest med grönalgen
Pseudokirchneriella subcapitata

RAPPORT 003/08

HÄRSLÖV DEN 5 FEBRUARI 2008

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	3
Inledning.....	4
Metodik.....	5
Resultat	8

Bilaga 1: Rådata från algtesten

Sammanfattning

En tillväxthämningstest med grönalgen *Pseudokirchneriella subcapitata* (fd. *Raphidocelis subcapitata*) har utförts av Toxicon AB under januari 2008 på ett vatten tillsatt pesticider. Målet med studien var att undersöka om en, för Saxån, realistisk sammansättning av pesticider med totalhalter i nivå med vad som förekommer i ån ger ekotoxikologiska effekter. Resultat redovisas från försök 003/08.

Följande metod har använts:

Tillväxthämningstest med grönalgen *Pseudokirchneriella subcapitata* enligt SS-EN ISO 8692:2005

Följande testartikel har testats:

”Stamlösning-pesticider”

Toxicon provmärkning
003/08-1

Följande resultat erhöles (tabell 1):

Tabell 1. E_rC_{10} - och E_rC_{50} -värden ($\mu\text{g/L}$) samt NOEC (högsta koncentration med en tillväxthastighet ej signifikant skild från kontrollen) för testartikeln efter 72 timmars inkubering. E_rC_x anger den testkoncentration som ger x % reduktion i specifik tillväxthastighet relativt kontrollen. E_rC_x har bestämts med grafisk interpolering och med probit-analys. Resultaten är baserade på cellräkningsdata.

Metod	NOEC ($\mu\text{g/L}$)	E_rC_{10} ($\mu\text{g/L}$)	E_rC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
Grafisk interpolering	4,27	19	34
Probit-analys	4,27	15	40

Ingen hämning av tillväxthastigheten, relativt kontrollen, erhöles upp till 4,27 μg pesticider/liter. Detta kan således betraktas som en nolleffektskoncentration (NOEC).

Den lägsta testade koncentrationen med hämning (LOEC) var 9,39 $\mu\text{g/L}$.

EC_{50} -värdet låg på 34 $\mu\text{g/L}$ (grafisk interpolering).

Inledning

En tillväxthämningstest med grönalgen *Pseudokirchneriella subcapitata* (fd. *Raphidoceles subcapitata*) har utförts av Toxicon AB under januari 2008 på ett vatten tillsatt pesticider. Målet med studien var att undersöka om en, för Saxån, realistisk sammansättning av pesticider med totalhalter i nivå med vad som förekommer i ån ger ekotoxikologiska effekter. Resultat redovisas från försök 003/08.

Testlaboratorium: Toxicon AB
Rosenhällsvägen 29
261 92 HÄRSLÖV
Telefon: 0418-70700
Organisationsnummer: 556383-7474

Försöksledare: Datum
Anders Sjölin

Utförande: Ingrid Trulsson
Weste Nylander
Daniel Kuster

Uppdragsgivare: Landskrona Kommun
Miljöförvaltningen
261 80 Landskrona

Ref: Olle Nordell

Försöksprotokoll: 003/08

Testartikel:

”Stamlösning-pesticider”	<u>Provtyp</u> Pesticider	<u>Toxiconprovmarkning</u> 003/08-1
--------------------------	------------------------------	--

Metodik

Metoden som utnyttjades var SS-EN ISO 8692:2005 "Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae (ISO 8692:2004)". Algkulturen som användes härstammar från Norskt Institut for Vandforskning (NIVA), Oslo, och odlas kontinuerligt på Toxicon. Kulturen kvalitetstestas regelbundet, som specificerat i standarden. Vid senaste testningen i december 2007 erhöles ett EC₅₀-värde på 0,96 mg K₂Cr₂O₇ / liter, vilket ligger inom det specificerade intervallet för att kulturen skall kunna användas för toxicitetstestning.

Metoden innebär att alger inkuberas under 72 timmar i en koncentrationsserie av en testartikel. Sex replikat används för kontroller och triplikat för varje testkoncentration. Då testartikeln innehöll pesticider lösta i lösningsmedel, användes en lösningsmedelkontroll med tre replikat. Näringsmediet (redovisas nedan) är definierat i manualen och har samma koncentration i samtliga testkolvar. 100 ml av alger, medium och testartikel inkuberas i 250 ml E-kolvar på ett roterande skakbord med kontinuerligt ljus med ljusstyrkan 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Inkubering sker i ett termokonstantrum där temperaturen är 18 ± 1 °C (vilket motsvarar en temperatur i algkolvarna på 22 ± 1 °C. pH mäts vid starten och efter 72 timmar i ett replikat per testgrupp. Prov tas ut från samtliga kolvar för cellräkning, som mått på celltätheten, vid tidpunkterna 0, 24, 48, och 72 timmar.

Provberedning

Separata stamlösningar, i glasampuller, av tio olika pesticider erhöles från Jenny Krüger, SLU (Ulltuna), i december 2007. Pesticiderna var lösta i antingen metanol, aceton eller vatten. Utifrån lösningarna blandades en stamlösning innehållande totalt 100 μg pesticider/L näringsmedium ("Stamlösning-pesticider"). Det inbördes förhållandet mellan pesticiderna samt totalkoncentrationen bestämdes av beställaren (tabell 2).

Tabell 2. Koncentration ($\mu\text{g/L}$) och relation av de ingående pesticiderna i testartikeln ("Stamlösning-pesticider") samt använt lösningsmedel vid blandning av de separata stamlösningarna (genomfört av SLU).

Pesticid	Koncentration ($\mu\text{g/L}$)	Relation	Lösningsmedel
MCPA	26,8	1	metanol
Bentazon	26,8	1	metanol
Kloridazon	8,93	0,33	aceton
Mekoprop	8,93	0,33	aceton
Glyfosat	8,93	0,33	vatten
Isoproturon	8,93	0,33	aceton
Etofumesat	2,68	0,10	aceton
Diflufenikan	2,68	0,10	aceton
Terbutlazin	2,68	0,10	aceton
Metazaklor	2,68	0,10	metanol

En lösningsmedelskontroll innehållande den volym lösningsmedel som testartikeln ”Stamlösning-pesticider” innehöll ingick också i testen. Totala volymen lösningsmedel per liter var 95 μl (39,4 μl aceton och 55,6 metanol) i såväl testartikeln som lösningsmedelskontrollen. Volymen lösningsmedel var därmed lägre än den maximala tillåtna volymen på 100 $\mu\text{l/L}$ enligt OECD TG 201 (”Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”).

En spädningsfaktor på 2,2 användes för att komma ner i en totalhalt av pesticider i nivå med vad som förekommer i Saxån (ca 0,2-5 $\mu\text{g/L}$ enligt beställaren). Följande testkoncentrationer användes i försöket:

<u>Testartikel</u>	<u>Testkoncentration ($\mu\text{g/L}$)</u>
”Stamlösning-pesticider”	0,401; 0,882; 1,94; 4,27; 9,39; 20,7; 45,5 och 100

Beräkningar

Tillväxthastighet (μ) = $(\log_2 \text{celler/ml } 72 \text{ h} - \log_2 \text{celler/ml } 0 \text{ h}) / (\text{tid i dagar})$.

Tillväxthämning (%) = $[(\mu_{\text{kontroll}} - \mu_{\text{test}}) / \mu_{\text{kontroll}}] * 100$.

EC-värdena bestäms med grafisk interpolering och med probit-analys.

Nolleffektsvärdet (NOEC-värdet) bestäms statistiskt med en icke-parametrisk test (Mann-Whitney U-test).

Näringsmedium

Följande medium användes (mg/L):

<u>Stamlösning 1</u>	<u>Stamkonc.</u>	<u>Testkonc.</u>
NH_4Cl	1500	15
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1200	12
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1800	18
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1500	15
KH_2PO_4	160	1.6

<u>Stamlösning 2</u>	<u>Stamkonc.</u>	<u>Testkonc.</u>
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	64	0.06
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	100	0.1

Stamlösning 3

H ₃ BO ₃	185	0.185
MnCl ₂ x 4H ₂ O	415	0.415
ZnCl ₂	3	0.003
CoCl ₂ x 6H ₂ O	1.5	0.0015
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0.01	0.00001
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	7	0.007

Stamlösning 4

NaHCO ₃	50000	50
--------------------	-------	----

Stamlösningarna 1 – 3 autoklaveras vid 120 °C eller sterilfiltreras (0,2 µm). Stamlösning 4 sterilfiltreras. Lösningarna förvaras i 4 °C i mörker. Vid testning blandas 100 ml av stamlösning 1 samt 10 ml av vardera stamlösningarna 2 – 4 till en slutvolym av 1000 ml. 10 ml av denna blandning används för att göra 100 ml testlösningar. pH-värdet i mediet skall efter jämvikt med luft ligga mellan 8,1 ± 0,2 . Mediet justeras vid behov med HCl eller NaOH.

Resultat

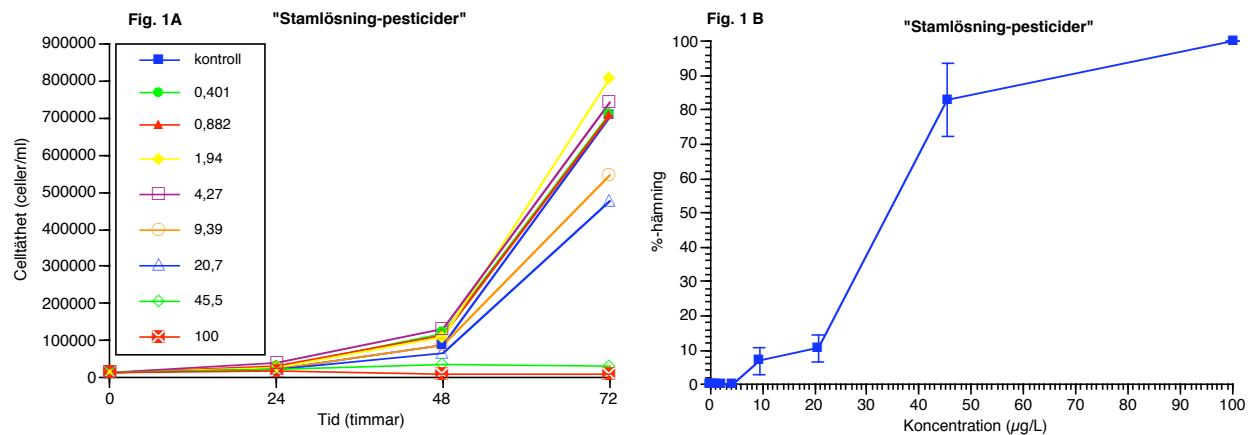
Kraven för att resultaten från testerna skall bedömas som giltiga enligt SS-EN ISO 8692:2005 har uppfyllts:

- Celltätheten i kontrollerna har ökat med minst en faktor 67 under testtiden.
- pH har varierat med högst 1,5 enheter i kontrollerna.
- Variationskoefficienten (CV) i tillväxthastighet i kontrollerna var ej högre än 5%.

Tillväxten i de olika testkoncentrationerna efter 24, 48 respektive 72 timmars exponering för testartikeln presenteras i figur 1A medan hämningen av tillväxthastigheten, relativt kontrollen, vid de olika testkoncentrationerna presenteras i figur 1B. I tabell 3 presenteras EC-värden, för såväl grafisk interpolering som probit-analys. Rådata presenteras i bilaga 1.

Tabell 3. E_rC_{10} - och E_rC_{50} -värden ($\mu\text{g/L}$) samt NOEC (högsta koncentration med en tillväxthastighet ej signifikant skild från kontrollen) för testartikeln efter 72 timmars inkubering. E_rC_x anger den testkoncentration som ger x % reduktion i specifik tillväxthastighet relativt kontrollen. E_rC_x har bestämts med grafisk interpolering och med probit-analys. Resultaten är baserade på cellräkningsdata.

Metod	NOEC ($\mu\text{g/L}$)	E_rC_{10} ($\mu\text{g/L}$)	E_rC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
Grafisk interpolering	4,27	19	34
Probit-analys	4,27	15	40



Figur 1. Tillväxten av grönalgen *Pseudokirchneriella subcapitata* efter 24, 48 och 72 timmar i en koncentrationsserie av testartikeln "Stamlösning-pesticider" (1A) samt procentuell hämning (medelvärde \pm SA) av tillväxthastigheten (μ) i de olika koncentrationerna av testartikeln (1B). Resultaten är baserade på cellräkningsdata.

Kommentarer

Lösningsmedelskontrollen

Tillväxthastigheten i lösningsmedelskontrollen (95 μ l metanol/acetone) var lägre relativt kontrollen och resulterade i en 20%-ig hämning (bilaga 1). Orsaken till detta berodde troligen på en kontaminering. En ny test genomfördes där enbart lösningsmedelkontrollen testades (data visas ej). Resultaten från denna test visade att hämningen i högsta testkoncentrationen (95 μ l metanol/acetone) endast var 2,6% efter 72 timmars exponering. De lägre koncentrationerna som testades (43 respektive 20 μ g/L) gav inte upphov till någon hämning.

Detta indikerar att tillsatsen av lösningsmedel (acetone/metanol) inte påverkade tillväxten av algerna upp till en koncentration av testartikeln på 45.5 μ g/L. En marginell effekt på tillväxten kan ha förelegat i högsta testkoncentrationen (100 μ g pesticider/L), men då hämningen i denna koncentration var 100% är en marginell effekt av mindre betydelse.

Effekten av pesticidblandningen

Ingen hämning av tillväxthastigheten, relativt kontrollen, erhöles upp till 4,27 μ g pesticider/liter. Detta kan således betraktas som en nolleffektskoncentration (NOEC).

Den lägsta testade koncentrationen med hämning (LOEC) var 9,39 μ g/L.

EC₅₀-värdet låg på 34 μ g/L (grafisk interpolering).