

Grundbet Kommune

J.NR.: 06.01.06901
01 8518 025

Bilag 2

VANDKVALITETSINSTITUTTET ATV

Bilag nr. 153

ØKOTOKSIKOLOGISK UNDERSØGELSE
AF
DISULFANILYLGUANIDIN
BESTEMMELSE AF AKUT OG KRONISK
TOKSICITET OVERFOR NITOCRA SPINIPES



VKO - VAND
KVALITETS
INSTITUTTET

AGERN ALLE 11 • DK-2970 HØRSHOLM
SARALYST ALLE 52 • DK-8270 HØJBJERG

☎ *02-86 52 11
☎ *06-27 42 11

VANDKVALITETSINSTITUTTET^{ATV}

TESTRAPPORT TIL :

GRINDSTED PRODUCTS A/S
EDWIN RAHRS VEJ 38
DK-8220 BRABRAND

ØKOTOKSIKOLOGISK UNDERSØGELSE
AF
DISULFANILYLGUANIDIN
BESTEMMELSE AF AKUT OG KRONISK
TOKSICITET OVERFOR NITOCRA SPINIPES

SAGSBEHANDLER:
LIC. SCIENT. K. OLE KUSK
SAGSNUMMER 97.447/900
DATO: 1985.01.14

MK



VKI · VAND ·
KVALITETS ·
INSTITUTTET

AGERN ALLE 11 · DK-2970 HØRSHOLM
SARALYST ALLE 52 · DK-8270 HØJBJERG

☎ *02-86 52 11

☎ *06-27 42 11



STATENS TEKNISKE PRØVENÆVN

STATENS TEKNISKE PRØVENÆVN

meddeler herved i medfør af § 5 i lov nr. 144 af 21. marts 1973 om Statens tekniske Prøvenævn, som ændret ved lov nr. 45 af 11. februar 1976, jfr. handelsministeriets bekendtgørelse nr. 77 af 24. februar 1976 om autorisation af laboratorier til at udføre autoriseret teknisk prøvning

AUTORISATION

for Vandkvalitetsinstituttet
Agern Alle 11
2970 Hørsholm

til at udføre autoriseret teknisk prøvning inden for følgende prøvningsområde:


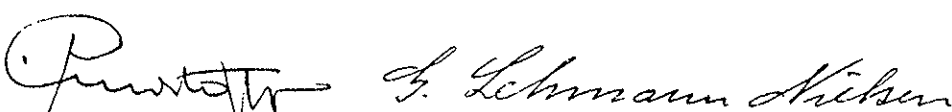
Kemiske undersøgelser af råvand, drikkevand, spildevand, vand fra ferske og marine recipienter, perkolat, badevand samt slam, sedimenter og biologisk materiale i henhold til nationale og internationale standarder og normer samt andre alment anerkendte metoder.
Bakteriologiske undersøgelser af råvand, drikkevand, spildevand, vand fra ferske og marine recipienter, badevand, slam og sedimenter samt biologisk materiale i form af fisk og muslinger i henhold til nationale og internationale standarder og normer samt andre alment anerkendte metoder.
Undersøgelse af kemiske stoffers og stofblandingers, herunder spildevands, biologiske nedbrydelighed, toxicitet og bioakkumulering i vandigt miljø, omfattende bl.a. undersøgelser i relation til lov om kemiske stoffer og produkter (lov nr. 212 af 23. maj 1979 med senere ændringer), efter danske og internationale standarder og normer (specielt OECD Guidelines for Testing of Chemicals) samt andre alment anerkendte metoder.

under registreringsnummer 26

Laboratoriet er undergivet de til enhver tid fastsatte forskrifter angående virksomheden som autoriseret laboratorium.

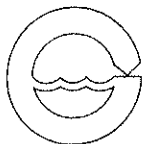
Autorisationen, der er meddelt på de i skrivelse af 28. juni 1982 fra Statens tekniske Prøvenævn fastsatte vilkår, har gyldighed indtil den 1. juli 1985, medmindre den forinden måtte være tilbagekaldt.

STATENS TEKNISKE PRØVENÆVN, den 11. august 1982



L. Christoffersen/G. Lehmann Nielsen

I N D H O L D S F O R T E G N E L S E

1.	INDLEDNING	3
2.	MATERIALE OG METODER	3
2.1.	Principper i testene	3
2.2.	Teststoffet	4
2.3.	Fortyndingsvand	4
2.4.	Fremstilling af testopløsninger	5
2.5.	Testorganismen	5
2.6.	Metoder	6
2.7.	Databehandling	7
3.	RESULTATER	8
3.1.	Akuttesten	8
3.2.	Reproduktionstesten	9
4.	DISKUSSION	11
5.	KONKLUSION	12
6.	REFERENCER	13
	BILAG 1.1	14
	Primærdata for Nitocra spinipes akuttesten med disulfanilylguanidin	
	BILAG 1.2	15
	Primærdata for Nitocra spinipes akuttesten med kaliumdikromat	
	BILAG 1.3	16
	Primærdata for reproduktionstest med Nitocra spinipes med disulfanilylguanidin	
	BILAG 1.4	17
	Hæmning af reproduktionen hos krebsdyret Nitocra spinipes med disulfanilylguanidin	
	BILAG 2	18
	Metodeforskrift for økotoxikologisk testning med krebsdyret Nitocra spinipes - akut og kronisk test	



STATENS
TEKNISKE
PRØVENÆVN

Autorisations

reg.nr.: 26

PRØVNINGSRAPPORT

over autoriseret teknisk prøvning i henhold til Statens Tekniske Prøvenævn's autorisation

For GRINDSTED PRODUCTS A/S

er på omstående vilkår foretaget prøvning af

Disulfanylylguanidin

efter prøvningsbestemmelserne i

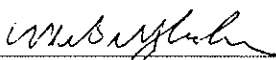
Bengtsson, B.-E., 1981. INSERM Vol. 106: 421-430 /2/

Vandkvalitetsinstituttet, ATV (VKI), 1983.

Metodeforskrift for økotoxikologisk testning med krebsdyret Nirocra spinipes. Akut og kronisk test (bilag 2).

med følgende resultat

Hørsholm, den 14. januar 1985

Underskrift: 

Niels Nyholm

Nærværende vilkår er gældende for *VANDKVALITETSINSTITUTTET* i forbindelse med prøvning og for udfærdigelse af nærværende prøvningsrapport:

1. For udførte prøvninger og udfærdigede prøvningsrapporter er laboratoriet ansvarligt overfor rekvirenten i overensstemmelse med dansk rets erstatningsregler med de begrænsninger, som følger af punkt 2-6.
2. Laboratoriets prøvning og udfærdigelse af nærværende prøvningsrapport er sket på grundlag af den viden og den teknik, som laboratoriet råder over på prøvnings-tidspunktet. Laboratoriet er ikke ansvarligt, hvis en senere udvikling måtte vise, at laboratoriets viden og teknik er mangelfuld eller urigtig.
3. Forvolder et af rekvirentens produkter skade, har laboratoriet intet ansvar for en sådan skadeforvoldelse,

hvis den skadevoldende adfærd er begået af rekvirenten, førend laboratoriets prøvningsrapport vedrørende produktet er afgivet fra laboratoriet,

hvis det skadevoldende produkt ikke konkret har været afprøvet af laboratoriet, medmindre rekvirenten godtgør, at det skadevoldende produkt er identisk med et af laboratoriet konkret afprøvet produkt, og

hvis skaden skyldes en egenskab ved produktet, eller en anvendelse af produktet, som enten ikke er prøvet og beskrevet i prøvningsrapporten, eller som afviger fra laboratoriets beskrivelse i prøvningsrapporten af produkttegenskaben eller en mulig produktanvendelse.

4. Laboratoriet har intet ansvar for skader, som indtræffer i forbindelse med en anvendelse af udtalelser fra laboratoriet, hvis det er angivet, at udtalelserne hviler på en skønsmæssig bedømmelse eller en vurdering.
5. Udenfor de i punkt 2-4 nævnte tilfælde kan laboratoriet gøres ansvarligt, såfremt det dokumenteres, at skade skyldes fejl eller forsømmelse fra laboratoriets side. Laboratoriets ansvar for skade på ting kan dog – med mindre andet udtrykkeligt er aftalt – aldrig overstige kr. 500.000 pr. skade.

Laboratoriet hæfter aldrig for tab af produktion, driftstab, avancetab og andet indirekte tab. Laboratoriet kan ikke gøres ansvarligt for skader, som ikke skriftligt er gjort gældende inden 3 år efter nærværende prøverapports dato.

6. Nedlægges der under en sag imod laboratoriet en påstand om erstatning, som rækker udover de i punkt 2-5 fastsatte grænser for laboratoriets ansvar, er klienten pligtig at overtage førelsen af en sådan sag, hvis laboratoriet fremsætter begæring herom.

I det omfang laboratoriet måtte blive pålagt et ansvar – eller måtte afholde udgifter iøvrigt – som rækker udover de i punkt 2-5 fastsatte grænser for laboratoriets ansvar, er rekvirenten pligtig at skadesløsholde laboratoriet herfor.

Toksiciteten af disulfanilylguanidin overfor den marine bundlevende vandloppe Nitocra spinipes er undersøgt i statistiske tests for akut og kronisk toksicitet.

De akut toksiske koncentrationer, definerede som de beregnede koncentrationer, som var letale for 10, 50 og 90% af testdyrene efter 96 timer, og de kronisk toksiske koncentrationer, definerede som de beregnede koncentrationer, som hæmmede reproduktionen hos testdyrene med 20 og 50% igennem en 11-døgns periode, var følgende:

	96t LC10	96t LC50	højeste konc. u. kronisk eff.	11d EC20	11d EC50
Disulfanilyl- guanidin	> 800	> 800	100	171	252

På grundlag heraf kan disulfanilylguanidin betegnes som ikke-toksisk overfor Nitocra spinipes ved korttids-eksponering.

1. INDLEDNING

Efter anmodning fra GRINDSTED PRODUCTS A/S (GP) har VANDKVALITETSINSTITUTTET, ATV (VKI) undersøgt stoffet disulfanilylguanidin for akut og kronisk toksisk effekt overfor den marine vandloppe, Nitocra spinipes.

Undersøgelsen er foretaget i perioden:

1984.12.04 - 1984.12.19.

Opgaven fik sagsnummer 97.447 og alle originale data og målinger relevante for denne undersøgelse opbevares i VKI's arkiv under dette sagsnummer.

2. MATERIALE OG METODER

2.1. Principper i testene

Akut test

Teststoffet blev undersøgt i en korttidstest for akut toksicitet overfor den marine, bundlevende vandloppe, Nitocra spinipes. Ved undersøgelsen registreres dødeligheden af dyrene hver 24. time i 96 timer i en fortyndingsrække af stoffet. På grundlag heraf beregnes stoffets akutte toksicitet, som angives som de koncentrationer, der efter 96 timer dræber 10, 50 og 90% af dyrene.

Kronisk test

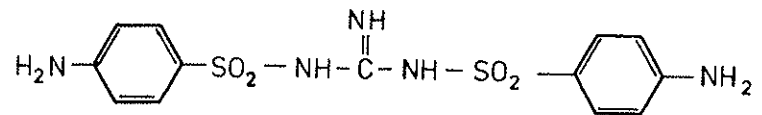
En fortyndingsrække af stoffet fremstilles. Koncentrationerne vælges bl.a. på grundlag af resultaterne i akut-testen, som altid udføres forud for reproduktionstesten.

Foder tilsættes og hunner med ægsæk overføres til glassene med testopløsninger. Efter ca 12 døgn foretages en optælling af antallet af afkom, og reproduktionen i testopløsningerne udtrykkes i forhold til kontrolreproduktionen.

Højeste koncentration uden effekt og laveste koncentration med signifikant effekt (EC 20; EC = effect concentration) angives. Tillige angives EC 50-værdien (koncentrationen som hæmmer reproduktionen 50%).

2.2. Teststoffet

En prøve af disulfanilylguanidin (DSG) blev leveret til VKI. Prøven blev mærket med sagsnummer 97.447. Stoffets kemiske formel er følgende:



Forbindelsen er et fast stof. Stoffets opløselighed i vand var 800-1000 mg/l.

Prøven var af GP mærket på følgende måde:

Disulfanilylguanidin

J. nr. 7176 - 100

01.10.1984.

2.3. Fortyndingsvand

Som fortyndingsvand blev anvendt vand fra den nordlige del af Øresund. Vandet var filtreret, indstillet til 9 o/oo salinitet med milliporevand (dobbelt

ionbyttet og aktivt kul-behandlet vand) og opvarmet til 80° C. Derefter henstand i mindst 1 døgn inden anvendelse i testen.

2.4. Fremstilling af testopløsninger

Akuttesten blev gennemført med følgende koncentrationer af teststoffet fremstillet i fortyndingsvand:

(mg DSG/l): 20; 50; 100; 200; 500 og 800.

En kontrolrække blev undersøgt sideløbende.

Den kroniske test blev gennemført med følgende koncentrationer af teststoffet fremstillet i fortyndingsvand:

(mg DSG/l): 100; 200; 500 og 736.

En kontrolrække blev undersøgt sideløbende.

2.5. Testorganismen

Krebsdyret Nitocra spinipes, Boeck (Harpacticoidae, Crustacea) er anvendt som testorganisme. Den er i Danmark fundet i Nivå Bugt /1/. Den holdes i kultur på VKI i bl.a. 9 o/oo saltvand ved 20° C.

For en nærmere beskrivelse af Nitocra spinipes henvises til bilag 2.

2.6. Metoder

Metode for akuttesten

Akuttesten er udført som en statistisk test efter metoden beskrevet i /2/ bortset fra, at testtiden er forlænget fra 48 til 96 timer.

Testen er udført med filtreret, naturligt havvand (salinitet 9 ‰) som fortyndingsvand og ved $20 \pm 0,5^{\circ}$ C.

Ca 20 dyr er anvendt pr koncentration.

Dødeligheden blandt dyrene blev registreret hver 24. time.

For en mere detaljeret gennemgang af metoden henvises til bilag 2.

Metode for reproduktionstesten

Reproduktionstesten er udført som en statistisk test i bægerglas med 25 ml testopløsning. Metoden er en modifikation af den i /3/ beskrevne.

Der er anvendt samme temperatur og fortyndingsvand som i akuttesten (20° C og 9 ‰ saltvand).

Cirka 20 hunner med ægsæk er eksponeret for hver testkoncentration.

Glassene blev tilset 2-3 gange ugentlig.

Efter 11 døgn blev testen afsluttet, og antallet af afkom optalt. Tillige blev antallet af levende moderdyr ved testen afslutning optalt.

For hver koncentration angives reproduktionen som antal afkom pr moderdyr ved starten. For en mere detaljeret gennemgang af metoden henvises til bilag 2.

2.7. Databehandling

Statistisk beregning af de akut letale koncentrationer er udført ved probitanalyse under anvendelse af EDB-program-systemet SAS /4/. Specielt beregnes de koncentrationer, som er dødelige for 10, 50 og 90% af dyrene (LC 10, LC 50 og LC 90; LC = Lethal concentration) efter 24, 48 72 og 96 timer.

I tilfælde af dødelighed i kontrollen, korrigeres herfor ved hjælp af Abbots formel.

Statistisk beregning af de reproduktionshæmmende koncentrationer er udført ved lineær regressionsanalyse under antagelse af, at hæmningen kan beskrives ved en logaritmisk normalfordelingskurve. Negative værdier (større reproduktion end i kontrollen) kan pr definition ikke forekomme med den gjorte forudsætning og kan derfor ikke indgå i beregningerne.

Herved tabes imidlertid information. Det kan lejlighedsvis øge beregningernes sikkerhed, hvis sådanne værdier vægtes i beregningerne ved at modificere deres værdi til lige under kontrolværdien.

Beregningerne er udført ved hjælp af et EDB-program, som i øjeblikket er under udvikling på VKI.

Specielt er her beregnet de koncentrationer, som hæmmede reproduktionen med 20% og 50% (EC 20 og EC 50).

EC 20-værdien antages at være laveste koncentration med signifikant hæmmende effekt.

3. RESULTATER

3.1. Akuttesten

Primærdato for akuttesten med disulfanilylguanidin er givet i bilag 1.1.

Det ses heraf, at der ingen akut dødelighed var i koncentrationer op til 800 mg/l, som er nær den maksimale opløselighed af stoffet i vand.

96 t LC 10- og LC 50-værdierne er således > 800 mg DSG/l.

I bilag 1.2 er givet data for en akuttest med kaliumdikromat.

Den fundne 96 timers LC 50-værdi var 37 mg $K_2Cr_2O_7/l$, hvilket er indenfor det koncentrationsinterval for LC 50-værdier (20-40 mg $K_2Cr_2O_7/l$) der normalt findes for Nitocra spinipes under de givne testbetingelser.

3.2. Reproduktionstesten

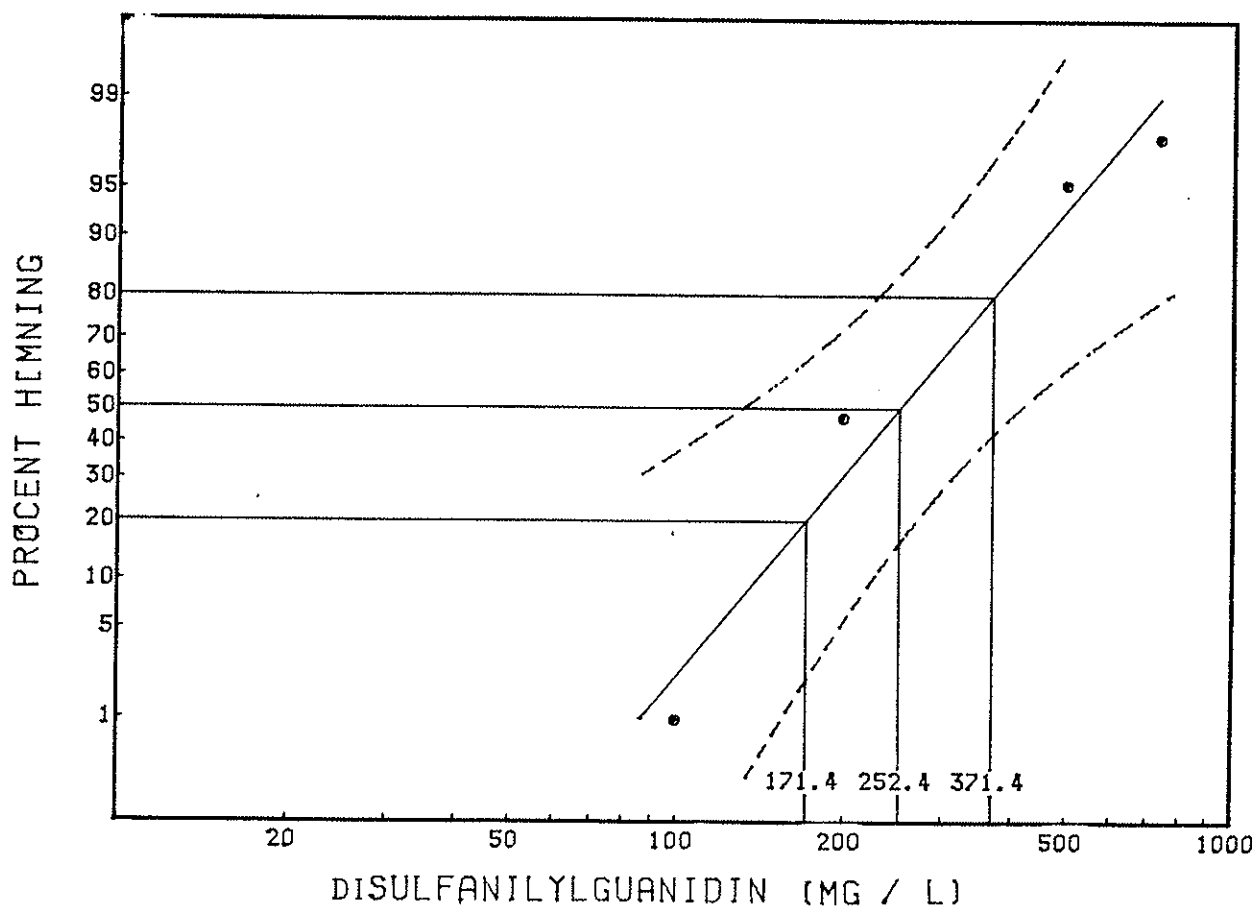
Primærdata for reproduktionstesten er vist i bilag 1.3.

Det ses heraf, at reproduktionen i koncentrationen 100 mg/l var ca 12% højere end kontrolværdien. Ved beregningerne af EC-værdierne er denne værdi ændret til 1% under kontrolværdien for at øge beregningernes sikkerhed.

Den derved fremkomne hæmningskurve er vist i figur 1, og de fundne EC-værdier er sammen med højeste undersøgte koncentration uden konstateret effekt på reproduktionen hos Nitocra spinipes angivet i tabel 1.

	Højeste konc. uden kronisk effekt	11 døgn EC 20	11 døgn EC 50
Disulfanilyl- guanidin (mg/l)	100	171	252

Tabel 1: Resultatet af reproduktionstesten udtrykt som højeste koncentration uden effekt, laveste koncentration med signifikant effekt på reproduktionen (EC 20) og koncentrationen, som halverer reproduktionen (EC 50) hos Nitocra spinipes.



Figur 1: Hæmningen af reproduktionen hos Nitocra spinipes som funktion af koncentrationen af disulfanilylguanidin under antagelse af en lineær logaritmisk normalfordeling af data.

4. DISKUSSION

Krebsdyr hører til en af de følsomste dyregrupper overfor miljøfremmede stoffer og tungmetaller. Samtidig er dyrs larve- og embryonalstadier ofte meget følsomme overfor disse stoffer. En reproduktionstest som den udførte vurderes som en generelt følsom økotoxikologisk test, idet effekten på embryonal/larvestadiet hos en repræsentant fra en følsom dyregruppe er undersøgt. Testperioden i den udførte test er af en sådan længde, at hunnerne, efter at æggene i den første ægsæk er klækket, kan nå at anlægge en ny ægsæk og få æggene i denne klækket.

Dette betyder, at ægsækdannelse, embryonstadiet og larvestadierne samt voksenstadiet i den udførte test kan påvirkes. Dyrene eksponeres således i en væsentlig del af deres livscyklus.

Reproduktionstesten giver hermed oplysninger om langtidseffekterne (kroniske effekter) af teststoffet på en repræsentant for en af de mest følsomme dyregrupper.

I akuttesten er en dødelighed på 10% eller derover at betragte som en signifikant effekt. I reproduktionstesten er variationerne på resultaterne af kontrolgrupper erfaringsmæssigt af en sådan størrelse, at hændinger på 20% og derover kan betragtes som signifikante.

I akuttesten kunne ikke konstateres nogen effekt på testdyrenes overlevelsessevne ved koncentrationer af disulfanilylguanidin til og med 800 g/l.

De i reproduktionstesten fundne effektive niveauer er vist i tabel 1. Laveste beregnede koncentration med signifikant effekt (EC 20) var 171 mg/l. Reproduktionen påvirkes således ved stofkoncentrationer, der er væsentlig lavere end den højeste koncentration, som er undersøgt for akut toksisk effekt.

Disulfanilylguanidin kan på grundlag af den foretagne undersøgelse og med den i /5/ foreslåede terminologi* betegnes som ikke-toksisk overfor Nitocra spinipes ved korttidseksponering.

5. KONKLUSION

I testene med Nitocra spinipes er følgende koncentrationer fundet at have akut og kronisk toksisk effekt:

	96t LC10	96t LC50	højeste konc. u. kronisk eff.	11d EC20	11d EC50
Disulfanilyl- guanidin ₁ mg/l	> 800	> 800	100	171	252

På grundlag heraf kan disulfanilylguanidin betegnes som ikke-toksisk overfor Nitocra spinipes ved korttidseksponering.

Begyndende kroniske effekter er konstateret ved signifikans ved en koncentration på 171 mg/l.

*) Column (B): Damage to living resources

Ratings	TLm (ppm)
4 Highly toxic.	<1
3 Moderately toxic.	1-10
2 Slightly toxic.	10-100
1 Practically nontoxic.	100-1,000
0 Nonhazardous.	>1,000
BOD Problem caused primarily by high oxygen demand.	
D Deposits liable to blanket the sea floor.	

TLm = IC 50. Fra /5/.

6. REFERENCER

- /1/ Muus, B.J., 1967.
The fauna of Danish estuaries and lagoons. Distribution and ecology of dominating species in the shallow reaches of the mesohaline zone. - Medd. Danm. Fish. Havundersøg. Bd.5 - nr. 1 (ny serie).
- /2/ Bentgsson, B.-E., 1981.
The harpacticoid Nitocra spinipes (Crustacea) as a test organism in brackish water toxicological bioassays. - INSERM Vol. 106: 421-430.
- /3/ Renberg, L. et al., 1980.
Chlorinated guaiacols and catechols bioaccumulation potential in bleak (Alburnus alburnus, Pisces) and reproductive and toxic effects on the harpacticoid Nitocra spinipes (Crustacea). - Chemosphere 9: 143-150.
- /4/ SAS Institute.
SAS/ETS User,s Guide, 1980 Edition. - SAS Institute Inc., P.O. Box 8000, Raleigh, North Carolina, 27511, USA.
- /5/ Verschueren, K., 1977.
Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. - Van Nostrand Reinholdt Company, New York.

Bilag 1.1 Primærdata for Nitocra spinipes akutte- sten med disulfanilylguanidin

TESTORGANISME: Nitocra spinipes

STARTDATO: 1984.12.04

SAGSNR.: 97.447.900

NAVN FOR TESTET STOF: disulfanilylguanidin DELTAGERE: SR, US

PRELIMINÆR	DEFINITIV x	AKUT x									
		KRONISK									
		O ₂ -indhold(% mætning)									
		pH		START		SLUT		START		SLUT	
KONTROL		8,0	8,2	99	100						
STØRSTE KONCENTRATION		8,0	7,7	96	99						

	Total antal dyr pr. konc.	ANTAL DØDE													
		Total antal dyr		24 timer		48 timer		72 timer		96 timer					
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C				
		B	D	B	D	Total	B	D	Total	B	D	Total	B	D	Total
Kontrol	19	5	5	0	0		0	0		0	0		0	0	
		4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 mg/l	20	5	5	0	0		0	0		0	0		0	0	
		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 mg/l	20	5	5	0	0		0	0		0	0		0	0	
		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/l	21	6	5	0	0		0	0		0	0		0	0	
		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 mg/l	20	5	5	0	0		0	0		0	0		0	0	
		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800 mg/l	21	5	6	0	0		0	0		0	0		0	0	
		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	0 timer		24 timer		48 timer		72 timer		96 timer	
	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH
Kontrol	99	8,00	98	7,93	100	7,94	97	8,14	100	8,18
200	98	8,04	97	7,98	99	7,94	97	8,12	99	8,14
500	97	8,02	97	7,86	98	7,83	96	8,06	99	8,00
800	96	7,98	98	7,76	98	7,59	96	7,90	99	7,71

	LC 10	LC 50	LC 90
24 timer	-	-	-
48 timer	-	-	-
72 timer	-	-	-
96 timer	> 800	> 800	> 800

Bilag 1.2 Primærdata for Nitocra spinipes akuttesten med kaliumdikromat

TESTORGANISME: Nitocra spinipes

STARTDATO: 1984.12.10

SAGSNR.: 97.447.900

NAVN FOR TESTET STOF: K₂Cr₂O₇

DELTAGERE: SR, US

PRÆLIMINER	DEFINITIV x	AKUT x			
		KRONISK			
		PH		O ₂ -indhold(% metning)	
		START	SLUT	START	SLUT
KONTROL	8,0	8,1	100	94	
STØRSTE KONCENTRATION	8,0	8,1	100	93	

	Total antal dyr pr. konc.	ANTAL DØDE															
		Total antal dyr		24 timer		48 timer		72 timer		96 timer							
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C						
		B	D	B	D	Total	B	D	Total	B	D	Total					
Kontrol	20	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
5 mg/l	24	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 mg/l	23	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	
20 mg/l	21	5	5	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	3	2	3	8
30 mg/l	22	5	6	0	0	1	0	2	0	3	1	2	1	7	5	2	10
40 mg/l	24	8	6	0	0	2	1	2	0	5	3	3	1	8	6	3	14
50 mg/l	27	5	5	0	0	2	1	2	3	2	3	4	4	13	6	7	19

	0 timer		24 timer		48 timer		72 timer		96 timer	
	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH	O ₂	pH
Kontrol	100	8,0							94	8,1
30									93	8,1
40									94	8,1
50	100	8,0							93	8,1

	LC 10	LC 50	LC 90
24 timer	> 50	> 50	> 50
48 timer	30 (18-29)	66 (53-106)	102 (77-184)
72 timer	24 (14-29)	50 (43-61)	76 (64-102)
96 timer	13 (4-19)	37 (32-43)	61 (53-74)

Bilag 1.4 Hæmning af reproduktionen hos krebsdyret *Nitocra spinipes* med disulfanilylguanidin

HÆMNING AF REPRODUKTIONEN HOS KREBSDYRET NITOCRA SPINIPES

MED STOFFET:

SULFANILYLGUANIDIN (MG / L)

MALT EFTER 11 DOGN

FORSØGSRESULTATER:

STOFKONCENTRATION I MG / L	ANTAL MODERDYR VED START	ANTAL AFKOM VED AFSLUTNING	ANTAL AFKOM PER MODERDYR	HÆMNING I PROCENT
KONTROL1	20	515	25.75	
KONTROLGEN.:			25.75	0
100.00	20	510 (580)*	25.50 (29.00)	1.0 (0.0)
200.00	15	204	13.60	47.2
500.00	20	24	1.20	95.3
736.00	20	11	0.55	97.9

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

DATA ER TESTET EFTER LOGARITMISK NORMALFORDELING

ANTAL VÆRDIER: 4

ØVRE KONFIDENSGRÆNSE ER 5000.00

EC 20 VÆRDI : 171.45 95 % KONFIDENSINTERVAL : (98.93 : 297.13)

EC 50 VÆRDI : 252.35 95 % KONFIDENSINTERVAL : (159.06 : 400.38)

EC 80 VÆRDI : 371.44 95 % KONFIDENSINTERVAL : (231.24 : 596.65)

KORRELATION : 0.98

*) Værdi modificeret; værdi i parentes er den observerede

Bilag 2 Metodeforskrift for økotoksikologisk
testning med krebsdyret *Nitocra spinipes* - akut og kronisk test

1. INDLEDNING

Krebsdyr er generelt en dyregruppe, som anses for følsom overfor miljøfremmede stoffer og tungmetaller, og krebsdyr er derfor velegnede til økotoksikologisk testning af sådanne stoffer.

Dyr, der i Danmark skal kunne anvendes i tests året rundt skal kunne holdes i kultur i laboratoriet, da det danske klima ikke tillader indsamling af dyr på alle årstider.

Krebsdyret *Nitocra spinipes*, Boeck, tilhører ordenen harpacticoida (harpacticiderne).

N. spinipes opfylder en række krav, som man må stille til dyr, der skal holdes i laboratoriet. Blandt disse kan nævnes følgende:

Den lever og reproducerer på knust fiskefoder,
den optræder ikke kannibalistisk,
den er lidet pladskrævende,
den tåler temperaturer fra 0-30° C
og saltpromiller fra 1-35.

Tillige er den påvist i Nivå Bugt samt flere steder i umiddelbar nærhed af Danmark (svenske, norske, øst- og vesttyske kyster, bl.a. ved Nordsøen) og kan således formodes at være ret almindeligt forekommende ved danske kyster. Herudover har den en vid geografisk udbredelse.

Disse egenskaber og forhold gør *N. spinipes* til en særdeles velegnet testorganisme ved økotoksikologiske undersøgelser.

2. BESKRIVELSE AF ARTEN

Nitocra spinipes opnår som voksen en længde på 0,6 mm for hanner og 0,8 mm for hunner. Arten er som nævnt vidt udbredt /1/. Den forekommer ofte i stort antal i kystnære områder, især på og i de øverste mm af sandbund og på bundens plantedække. Den tolererer saltholdigheder fra 1-35 o/oo og temperaturer fra 0-30° C /2/.

Dyrene når voksenstadiet 10-14 dage efter klækningen. Parringen finder sted umiddelbart efter at hunnerne har kastet sidste larvehud og dermed nået voksenstadiet. Parringen kan vare fra et par timer og op til 2 døgn. Hunnerne kan opbevare sæden, således at de kun behøver at parre sig én gang i deres liv /2/. Hunnerne anlægger herefter en ægsæk (figur 1). Så snart larverne er klækket og har forladt ægsækken, kastes denne og en ny anlægges efter 1-2 døgn. Dette kan gentages adskillige gange (8 eller mere) /2/.

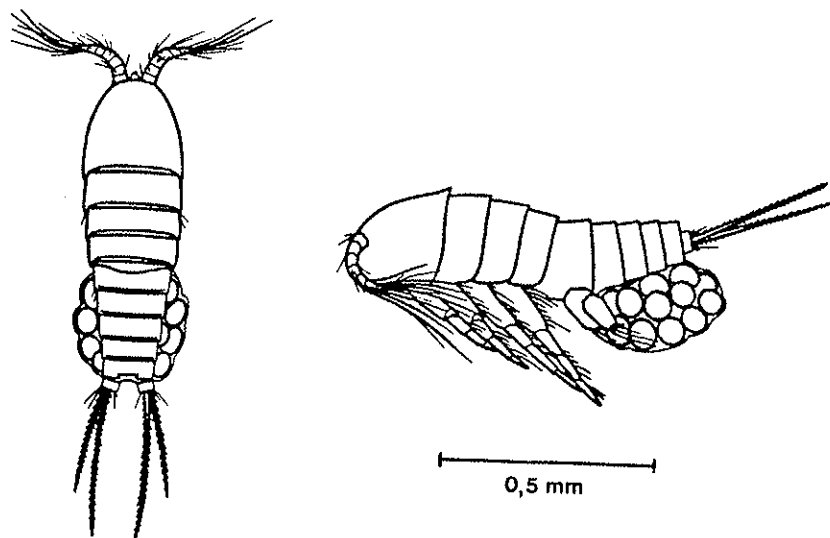
Som andre krebsdyr vokser N. spinipes kun ved hudskifter. Larverne gennemgår således adskillige stadier (figur 2), der adskilles af hudskifter. Under selve hudskiftet antages det at dyrene er særligt følsomme. Der er 6 naupliestadier og 5 copepodstadier inden voksenstadiet nås.

3. KULTIVERING AF NITOCRA SPINIPES

N. spinipes har været holdt i laboratoriet siden 1975 /2/. På VKI har den været holdt siden 1981.

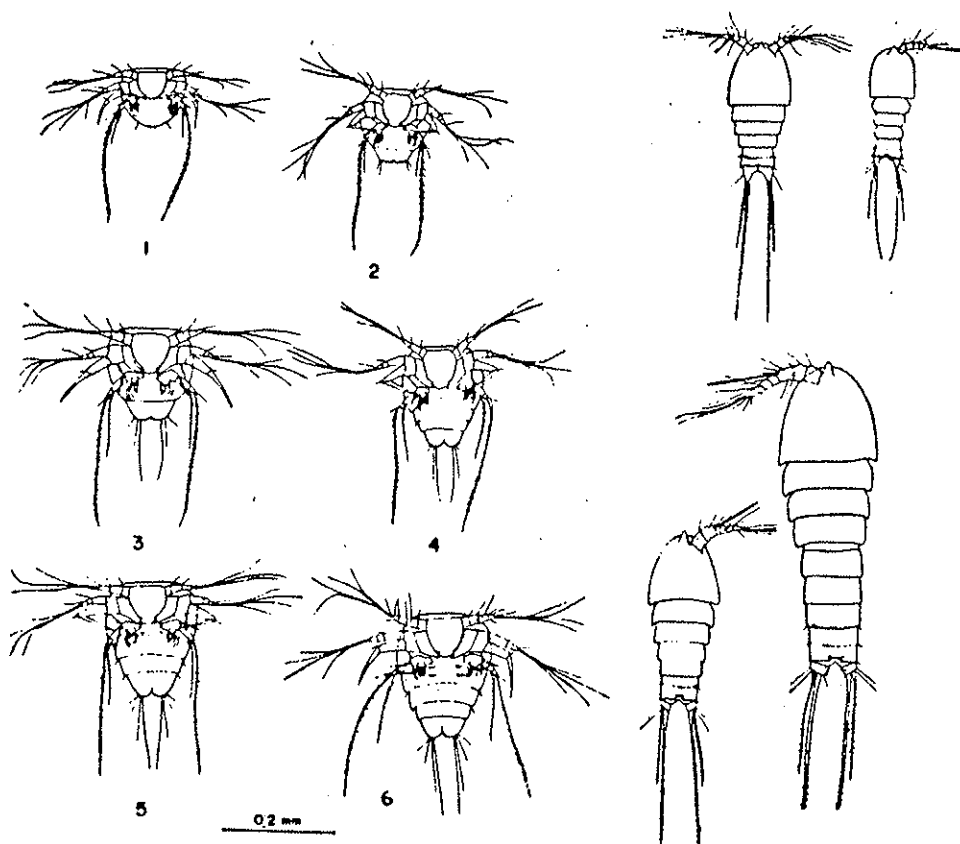
På VKI holdes dyret i filtreret, naturligt havvand med saltpromiller på 9 og på 15 ved 20° C.

Havvandet (mediet) varmebehandles (opvarmes til 80° C) inden anvendelsen.



Nitocra spinipes

Figur 1 *Nitocra spinipes* - hun med ægsæk set fra oven og fra siden



Figur 2 *Nitocra spinipes* - larveudvikling
1.-6. naupliestadie til venstre og fire copepoditstadier til højre.
Fra: Abraham & Gopalon 1975 /5/

Dyrene fodres én gang ugentligt med knust, tørret fiskefoder.

4. METODE FOR AKUT-TEST

Princip

Undersøgelsen er en korttidstest for akut toksicitet overfor N. spinipes. Ved undersøgelsen registreres dødeligheden af dyrene hver 24. time i 96 timer i en fortyndingsrække af stoffet/prøven. På grundlag heraf beregnes stoffets/prøvens toksicitet, som angives som de koncentrationer, der efter 96 timer dræber 10 og 50% af dyrene (96 hr LC 10 og LC 50).

Fremgangsmåde

Akut-testen udføres som en statistisk test som beskrevet i /2/ bortset fra, at testtiden er forlænget fra 48 timer til 96 timer.

Forsøgsmaterialet er store copepoditter og voksne dyr uden ægsæk.

Som fortyndingsvand anvendes dyrkningsmedium, dvs. naturligt saltvand almindeligvis med en saltpromille på 9 eller 15.

Testene udføres i prøverør af glas med 10 ml testopløsning. I hvert glas anbringes 5 dyr og for hver koncentration anvendes 4 glas, dvs. 20 dyr anvendes pr. koncentration. Glassene anbringes mørkt ved $20,0 \pm 0,5^{\circ}$ C.

Dyrene fodres ikke under akut-testen.

Glassene tilses hver 24. time i 96 timer og antal dyr og antal døde aflæses.

Dyr betragtes som døde, hvis de ligger ubevægelige i 15 sek eller mere efter en svag omrystning af glasset.

Iltindhold og pH måles ved aflæsningerne.

Iltindholdet skal i alle testopløsninger være > 70% af mætning under hele testen.

Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10% ved testens slutning.

Testsystemet og dyrenes følsomhed kontrolleres jævnligt på VKI med $K_2Cr_2O_7$ som referencestof.

Resultaterne behandles statistisk ved probitanalyse under anvendelse af EBD-programmet PROBIT fra programsystemet SAS /3/. Specielt beregnes de koncentrationer, som er dødelige for 10, 50 og 90% af dyrene (LC 10, LC 50 og LC 90, LC ~ lethal concentration) efter 24, 48, 72 og 96 timer.

5.

METODE FOR REPRODUKTIONSTESTEN

Princip

Fortyndingsrækker af stoffet/prøven fremstilles. Koncentrationerne vælges, bl.a. på grundlag af resultatet af akut-testen, som altid skal udføres forud for reproduktionstesten.

Foder tilsættes og hunner med ægsæk overføres til glassene med testopløsninger. Efter ca 2 uger foretages en optælling af antallet af afkom og reproduktionen i testopløsningerne udtrykkes i forhold til kontrolreproduktionen. Højeste koncentration uden effekt og laveste koncentration/koncentrationsområde med effekt (EC 20; EC ~ effect concentration) angives.

Tillige angives EC 50-værdien (koncentration/koncentrationsområde, der halverer reproduktionen).

Fremgangsmåde

Testen udføres som en statistisk eller som en gennemstrømningstest. Metoden er en modifikation af den i /4/ beskrevne.

Som fortyndingsvand anvendes samme vandtype som i akuttesten.

Testen udføres i glas med 25 ml testopløsning. Inden starten tilsættes til hvert glas 1 mg findelt fiskefoder af typen EWOS T50. 5 hunner med ægsæk overføres til hvert glas. Der anvendes mindst 20 hunner pr koncentration, dvs. mindst 4 glas pr koncentration.

Antallet af levende moderdyr optælles mindst 2 gange ugentligt og udvikling og antal larver vurderes. Ilt og pH måles samtidig i glas som ikke optælles ved testens afslutning.

Efter 7 dage fodres yderligere med 0,5 mg foder pr glas.

Testen afsluttes, når de først klækkede larver nærmer sig voksenstadiet, dvs. på et tidspunkt, hvor stadierne stadig kan skelnes fra hinanden. Ved afslutning optælles antallet af overlevende moderdyr. Herefter dræbes og fikseres alle dyr i alle glassene. Vand og dyr hældes på et filter, og vandet suges bort, hvorefter nauplier, copepoditter og moderdyr optælles.

For hver koncentration angives reproduktionen som antal afkom pr moderdyr ved starten. Dette forhold udtrykkes også i forhold til kontrolreproduktionen. Tillige angives antallet af overlevende moderdyr til testens slutning.

Højeste koncentration uden effekt på reproduktionen og laveste koncentration/koncentrationsområde med signifikant effekt (erfaringsmæssigt EC 20) angives. Tillige angives EC 50-værdien.

6.

REFERENCER

- /1/ Lang, 1948:
Monographie der Harpacticiden.
II - 1682 pp. Stockholm.
- /2/ Bentgsson, B.-E., 1981:
The harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea)
as a test organism in brackish water toxicological
bioassays.
INSERM Vol 106: 421-430.
- /3/ SAS Institute
SAS/ETS User's Guide, 1980 Edition.
SAS Institute Inc., P.O. Box 8000, Raleigh,
North Carolina 27511, USA.
- /4/ Renberg, L. et al. 1980:
Chlorinated guaiacols and catechols bio-
accumulation potential in bleaks (*Alburnus
alburnus*, Pisces) and reproductive and toxic
effects on the harpacticoid *Nitocra spinipes*
(Crustacea).
Chemosphere 9: 143-150.
- /5/ Abraham, S. and U.K. Gopalan, 1975:
Growth of an estuarine harpacticoid copepod
Nitocra spinipes Boeck cultured in the laboratory.
Bull. Dept. Mar. Sci. Univ. Cochin VII, 2:
309-318.

SUPPLERENDE LITTERATUR

- Bengtson, B.-E., 1978:
Toxicitetstest med *Nitocra spinipes*, Crustacea.
NORDFORSK, Miljøvårdssekretariatet,
Publikation 1978:2
- Gopalan, V.K., 1977:
Experimental mass culture of a harpacticoid
copepod *Nitocra spinipes* Boeck.
Proc. Symp. Warm Water Zoopl. Spl.
Publ. UNESCO/N10: 558-562.
- Bengtsson, B.-E., 1978:
Use of a harpacticoid copepod in toxicity test.
Mar. Pollut. Bull. 9: 238-241.
- Noodt, W., 1970:
Zur Ökologie der Copepoda Harpacticoidea des
Küstengebietes von Tvärminne (Finland).
Acta Zoo. Finn. 128: 1-35.
- Muus, B.J., 1967:
The fauna of the Danish estuaries and lagoons.
Distribution and ecology of the dominating species
in the shallow reaches of the mesohaline zone.
Meddl. Danm. Fisk. Havundersøg. 5: 54-55.
- Linden, E., Bengtsson, B.-E., Svanberg, O.
and Sundström, G., 1979:
The toxicity of 78 chemicals and pesticide
formulations against two brackish organisms,
the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid
Nitocra spinipes.
Chemosphere 11/12: 843-851.

Bengtsson, B.-E. and Tarkpea, M., 1983:
The acute aquatic toxicity of some substances
carried by ships.
Mar. Pollut. Bull. 14(6): 213-214.

Bengtsson, B.-E. and Bergström, B., 1982:
Toxicity tests with *Nitocra spinipes* (Crustacea)
and some metals released from a smelter industry.
In: Müller, K. (ed.): Coastal Research in the
Gulf of Bothnia. Pp. 439-444.
Dr. W. Junk Publisher, The Hague.

RAPPORTDATABLAD

1. Sag nr: 97.447/900
(Aut.testrapport nr. 16)

Dato: 1985.01.14

2. Sagsbeh. - Sekr. - Afd.
KOK MK Økologisk

3. Rekvirent:

Grindsted Products A/S

4. Evt. geografisk område:

5. Rekvireret rapport: xx

Rapporten forhandles af:

Pris: _____

6. Titel ØKOTOKSIKOLOGISK UNDERSØGELSE
AF DISULFANILYLDUANIDIN.
BESTEMMELSE AFAKUT OG KRONISK
TOKSICITET OVERFOR NITOCRA SPINIPES

Antal sider: 26

7. Nøgleord på dansk:	Keywords in English:
Disulfanilylguanidin	Disulfanilylguanidine
Akut toksicitet	Acute toxicity
Kronisk toksicitet	Chronic toxicity
Krebsdyr	Crustacean
Nitocra spinipes	Nitocra spinipes

Abstract in English:

Acute and chronic toxicity of disulfanilylguanidine have been tested in a lethality test and a reproduction test respectively with the marine crustacean Nitocra spinipes as a testorganism. Acute and chronic toxic concentrations were as follows:

	96h LC10	96h LC50	highest conc. without cronic eff.	11d EC20	11d EC50
Disulfanilyl- guanidine	> 800	> 800	100	171	252

No acute effects were observed at a concentration close to that of max. solubility in water. Disulfanilylguanidine can be designated as non-harzar-dous to Nitocra-spinipes at short time exposure. The compound was found chronic toxic at concentrations as low as 171 mg/l.

YOU MAY REACH US BY FONOTELEX. CALL TELEX 16600. FOTEX DK, ATTN: WATERQUALITY HØRSHOLM