

AFSNIT C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET

GENEREL INDLEDNING: AFSNIT C

De herunder beskrevne undersøgelsesmetoder er metoder til bestemmelse af visse af de økotoxikologiske egenskaber, der er opregnet i bilag VIII til direktiv 79/831/EØF. Anmeldere gøres opmærksom på, at teksten ikke omfatter metoder til bestemmelse af følgende egenskaber, som er omhandlet under niveau 1 i bilag VIII:

- forlænget toksicitetsundersøgelse på *Daphnia magna*
- undersøgelse på højerestående plante
- forlænget toksicitetsundersøgelse på en fiskeart

Når der er færdigudviklet egnede undersøgelsesmetoder til bestemmelse af disse egenskaber, vil de blive offentliggjort i form af en yderligere tilpasning til den tekniske udvikling. I mellemtiden skal anmeldere anvende passende, internationalt anerkendte metoder, som meddeles vedkommende myndighed.

C. 8

TOKSICITET FOR REGNORME

TEST I SYNTETISK JORD

1. METODE

1.1. Indledning

I denne laboratorietest tilsættes teststoffet til syntetisk jord, hvori der anbringes orme i 14 dage. Efter denne periode (og eventuelt efter syv dage) undersøges stoffets dødelige virkning på regnormene. Testen giver en metode til i løbet af relativt kort tid at foretage en screening af kemikaliers virkning på regnorme ved optagelse gennem huden eller føden.

1.2. Definition og enhed

LC₅₀: Koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af testdyrenes død i løbet af testperioden.

1.3. Referencestof

Der anvendes regelmæssigt et referencestof til påvisning af, at testsystemets følsomhed ikke har ændret sig signifikant.

Som referencestof anbefales analytisk rent chloracetamid.

1.4. Testmetodens princip

Jord er et variabelt medium, så der anvendes en omhyggeligt defineret syntetisk lerjord til denne test. Der holdes voksne regnorme af arten *Eisenia foetida* (se anmærkningen i tillægget) i en veldefineret syntetisk jord, som er behandlet med forskellige koncentrationer af teststoffet. Beholdernes indhold spredes på en bakke 14 dage (og eventuelt syv dage) efter forsøgets indledning, og der optælles for hver koncentration, hvor mange regnorme der har overlevet.

1.5. Kvalitetskriterier

Testen er beregnet til at være så reproducerbar som muligt med hensyn til testsubstrat og organisme. Dødeligheden hos kontroldyrene må ikke overstige 10 % ved testens afslutning; ellers er testen ugyldig.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. Materialer

1.6.1.1. Testsubstrat

Der anvendes veldefineret syntetisk jord som grundsubstrat.

a) Grundsubstrat (vægtprocent tørstof)

- 10 % sphagnum (så nær pH 5,5 til 6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt)
- 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 50 % kaolinit
- ca. 69 % industrielt kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 0,05 til 0,2 mm). Hvis stoffet ikke er tilstrækkeligt let at opslæmme i vand, holdes 10 g pr. testbeholder tilbage for blanding med teststoffet senere
- ca. 1 % calciumcarbonat (CaCO₃), pulveriseret, kemisk rent, tilsat for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består af grundsubstrat, teststof og deioniseret vand.

Vandindholdet svarer til ca. 25 til 42 vægtprocent af grundsubstratets tørstof. Substratets vandindhold bestemmes ved tørring af en prøve til konstant vægt ved 105° C. Hovedkriteriet er, at den syntetiske jord er befugtet så meget, at der ikke er noget stående vand. Blandingen foretages omhyggeligt, således at der bliver en jævn fordeling af teststoffet og substratet. Metoden for tilsætning af teststoffet til substratet skal rapporteres.

c) Kontrolsubstrat

Kontrolsubstratet består af grundsubstrat og vand. Hvis der anvendes et tilsætningsstof, skal et ekstra kontrolsubstrat indeholde samme mængde af tilsætningsstoffet.

1.6.1.2. Testbeholdere

Glasbeholdere med et rumfang på ca. en liter (hensigtsmæssigt tildækket med plastlåg, skåle eller plastfolie med ventilationshuller), fyldt med en mængde vådt test eller kontrolsubstrat svarende til 500 g substrattørstof.

1.6.2. Testbetingelser

Beholderne opbevares i klimakamre ved en temperatur på $20 \pm 2^\circ \text{C}$ og i konstant lys. Lysstyrken bør være 400 til 800 lux.

Testperioden er på 14 dage, men dødeligheden kan eventuelt vurderes syv dage efter testens indledning.

1.6.3. Fremgangsmåde

Testkoncentrationer

Koncentrationerne af teststof udtrykkes som stoffets vægt i forhold til grundsubstratets tørstofvægt (mg/kg).

Forprøve

Det koncentrationsområde, der netop forårsager dødelighed fra 0 til 100 % kan bestemmes ved en forprøve, der giver viden om de koncentrationsintervaller, der skal anvendes ved den endelige test.

Stoffet bør testes i følgende koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 og 0,1 mg/stof/kg testsubstrat (tørstofvægt).

Hvis der skal foretages en fuldstændig endelig test, vil én testgruppe pr. koncentration og én til den ubehandlede kontrolgruppe med hver ti orme være tilstrækkelig til forprøven.

Endelig test

Resultaterne af forprøven anvendes til at vælge mindst fem koncentrationer i en kvotientrække, der går fra 0 til 100 % dødelighed, og hvor den konstante faktor ikke må være over 1,8.

Ved test med disse koncentrationsrækker vil LC_{50} -værdien og dens konfidensgrænser kunne skønnes med størst mulig nøjagtighed.

Ved den endelige test anvendes der mindst fire testgrupper pr. koncentration og fire ubehandlede kontrolgrupper med hver ti orme. Resultaterne af disse gentagne grupper angives som en middelværdi og en standardafvigelse.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50} -intervallet.

Blanding af grundsubstratet og teststoffet

Når det er muligt, tilberedes teststoffet uden anden tilsætning end vand. Umiddelbart før testens indledning blandes en emulsion eller dispersion af teststoffet i deioniseret vand eller andet opløsningsmiddel med grundsubstratet eller sprøjtes jævnt ud over dette med en fin kromatografisprøjte eller lignende.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform).

Kun midler, der let fordamper, må bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Testsubstratet beluftes inden brug. Den fordampede vandmængde erstattes. Kontrolsubstratet må indeholde eventuelle tilsætningsstoffer i samme mængde.

Hvis teststoffet ikke kan opløses, dispergeres eller emulgeres i organiske opløsningsmidler, blandes en blanding af finsand af formalet kvarts og den til behandling af 500 g tørstofvægt syntetisk jord nødvendige mængde teststof med 490 g tørstofvægt testsubstrat.

For hver testgruppe anbringes en mængde vådt testsubstrat svarende til 500 g tørstofvægt i hver glasbeholder, og ti regnorme, der i 24 timer er blevet tilvænnet i et lignende vådt grundsubstrat og derefter hurtigt afskyllet og afdryppet på filterpapir før brugen, anbringes på testsubstratets overflade.

Beholderne tildækkes med perforerede plastlåg, skåle eller folie for at forhindre, at substratet indtørker, og de opbevares under testbetingelser i 14 dage.

Vurderingerne foretages 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning. Substratet spredes på en plade af glas eller rustfrit stål. Regnormene undersøges, og antallet af overlevende regnorme bestemmes. Regnorme anses for døde, hvis de ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning af forenden.

I tilfælde af at undersøgelsen foretages efter syv dage, fyldes substratet atter i beholderen, og de overlevende regnorme genanbringes på den samme testsubstratoverflade.

1.6.4. *Testorganismer*

Testorganismerne bør være voksne *Eisenia foetida* (se anmærkningen i tillægget) (mindst to måneder gamle med bælte) af en vægt (våd) på 300 til 600 mg. (Med hensyn til opdrætningsmetode henvises til tillægget).

2. **DATA**

2.1. **Behandling og vurdering af resultaterne**

De anvendte teststofkoncentrationer rapporteres med henvisning til den procentvise dødelighed for hver koncentration.

Når de opnåede data er dækkende, kan LC_{50} og dens konfidensgrænser ($p = 0,05$) bestemmes ved brug af standardmetoder (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eller tilsvarende metode). LC_{50} angives som mg teststof pr. kg testsubstrat (tørstofvægt).

I de tilfælde, hvor koncentrationskurvens hældning er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er en grafisk bestemmelse af denne værdi tilstrækkelig.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100% dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50} -intervallet.

3. **RAPPORTERING**

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med ovenstående kvalitetskriterier
- angivelse af den foretagne test (forprøve og/eller endelig test)
- nøje beskrivelse af testbetingelserne eller angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med metoden; eventuelle afvigelser skal rapporteres
- nøje beskrivelse af, hvorledes teststoffet er blevet iblandet i grundsubstratet
- oplysninger om testorganismer (art, alder, gennemsnitsvægt samt minimums- og maksimumsvægt, betingelserne for avl og opdrætning samt leverandør)
- angivelse af den anvendte metode til bestemmelse af LC_{50}
- testresultaterne, herunder alle anvendte data
- beskrivelse af observerede symptomer eller adfærdsændringer hos testorganismerne
- dødelighed i kontrolgrupperne
- LC_{50} eller højeste testkoncentration uden dødelighed og laveste testkoncentration med en dødelighed på 100% 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning.
- afbildning af koncentrations-responskurven
- resultater, der er opnået med referencestoffet enten i forbindelse med den pågældende test eller ved tidligere kvalitetskontrolundersøgelser.

4. **REFERENCER**

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 99—113.
- (5) EEC 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Tillæg

Avl og opdrætning af ormene før test

Med henblik på avl anbringes 30 til 50 voksne orme i en avlekasse med frisk substrat og fjernes efter 14 dage. Disse dyr kan bruges til avl af senere grupper. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne (under de foreskrevne betingelser efter to til tre måneders forløb).

Avls- og opdrætningsbetingelser

Klimakammer: temperatur $20 \pm 2^\circ \text{C}$, helst med konstant lys (lysintensitet 400 til 800 lux).

Avlekasser: Egnede lave beholdere med et rumfang på 10 til 20 l.

Substrat: Eisenia foetida kan opdrættes i forskellige dyrekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Substratet må have en pH-værdi på ca. 6 til 7 (justeret med calciumcarbonat) og lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5% saltkoncentration).

Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt.

Andre egnede fremgangsmåder ud over ovennævnte metode kan benyttes.

Anmærkning: Der findes to racer af Eisenia foetida, som nogle systematikere har klassificeret som arter (Bouche, 1972). De er morfologisk set omtrent ens, men den ene, Eisenia foetida foetida, har typisk tværgående striber på leddene, hvad den anden, Eisenia foetida andrei, ikke har, og dennes farve er rødbrøget. Så vidt muligt bør Eisenia foetida andrei anvendes. Andre arter kan anvendes, hvis den fornødne metodik er til rådighed.

C. 9

BIOLOGISK NEDBRYDNING

ZAHN-WELLENS TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Metoden har til formål at vurdere vandopløselige ikke flygtige organiske stoffers potentielle fuldstændige bionedbrydelighed, når de skal udsættes for forholdsvis høje koncentrationer af mikroorganismer under en statisk test.

Der kan forekomme fysisk/kemisk adsorption på de opslæmmede artikler, og der må tages hensyn hertil, når resultaterne fortolkes (jf. 3.2).

De stoffer, der skal undersøges, anvendes i koncentrationer svarende til DOC-værdier i området 50 til 400 mg/l eller COD-værdier i området 100 til 1 000 mg/l (DOC = opløst organisk kulstof; COM = kemisk iltforbrug). Disse forholdsvis høje koncentrationer har den fordel, at de i analytisk henseende er pålidelige. Forbindelser med toksiske egenskaber kan hæmme eller hindre nedbrydningsprocessen.

Ved denne metode anvendes måling af koncentrationer af opløst organisk kulstof eller af det kemiske iltforbrug til bedømmelse af teststoffets fuldstændige biologiske nedbrydning.

Samtidig anvendelse af en specifik analysemetode kan muliggøre vurdering af stoffets primære biologiske nedbrydning (dvs. den oprindelige kemiske forbindelses forsvinden).

Metoden finder kun anvendelse på de organiske teststoffer, som ved koncentrationen under testen:

- er opløselige i vand under forsøgsbetingelserne
- har forsvindende lavt damptryk under forsøgsbetingelserne
- ikke hæmmer bakterier
- kun adsorberes i testsystemet i begrænset omfang
- ikke forsvinder fra testopløsningen som følge af skumning.

Oplysninger om mængdeforholdet mellem teststoffets hovedbestanddele vil være til nytte ved fortolkning af resultaterne, især hvis disse er lave eller usikre.

Ved fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer er det ønskeligt at have oplysninger om stoffets giftvirkning over for mikroorganismer.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningsgraden ved testens afslutning anføres således: Biologisk nedbrydelighed i Zahn – Wellens Test:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

hvor:

D_T = biologisk nedbrydning (%) ved tidspunktet T ,

C_A = DOC (eller COD)-værdier i forsøgsblandingen, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l).
(DOC = Opløst organisk kulstof, COD = kemisk iltforbrug)

C_T = DOC- eller COD-værdier i forsøgsblandingen ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_B = DOC- eller COD-værdi for blindprøven ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_{BA} = DOC- eller COD-værdi for blindprøven, målt 3 timer efter igangsætning af testen (mg/l).

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent.

Den procentvise nedbrydning er angivet som den procentvise DOC- (eller COD-) fjernelse af teststoffet.

Forskellen mellem den værdi, der er målt efter tre timer, og den beregnede, eller helst målte, startværdi kan give nyttige oplysninger om stoffets eliminering (jf. 3.2 »Fortolkning af resultater«).

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelse af nye stoffer; der kan dog endnu ikke anbefales bestemte referencestoffer.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam, uorganiske næringsstoffer og teststoffet, der er den eneste kulstofkilde i vandig opløsning, anbringes sammen i en glasbeholder på 1 til 4 liter, som er forsynet med omrøring og beluftning. Blandingen omrøres og beluftes ved 20 til 25° C under indirekte belysning eller mørke i op til 28 dage. Nedbrydningsprocessen følges ved bestemmelse af DOC- (eller COD-) værdier i den filtrerede opløsning én gang dagligt eller regelmæssigt med et andet passende mellemrum. Forholdet mellem den eliminerede DOC (eller COD) efter hvert tidsrum og værdien tre timer efter starten udtrykkes som procentvis biologisk nedbrydning og er et mål for nedbrydningsgraden på dette tidspunkt. Resultatet afbildes mod tiden, hvorved kurven over biologisk nedbrydning fremkommer.

Hvis der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i det oprindelige stofs koncentration som følge af biologisk nedbrydning måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Det er ved ringtest godtgjort, at denne metodes reproducerbarhed er tilfredsstillende.

Metodens følsomhed afhænger hovedsagelig af blindprøvens variationer og i mindre grad af nøjagtigheden ved bestemmelsen af opløst organisk kulstof og teststofkoncentrationen i væsken.

1.6. Beskrivelse af fremgangsmåden

1.6.1. Forberedelser

1.6.1.1. Reagenser

vand: drikkevand med mindre end 5 mg organisk kulstof pr. liter. Koncentrationen af calcium- og magnesiumioner må ikke overstige 2,7 mmol/l tilsammen; i modsat fald må der fortyndes passende med deioniseret eller destilleret vand

svovlsyre, analysen (A.R.):	50 g/l
natriumhydroxidopløsning, A.R.:	40 g/l
opløsning af uorganiske næringsstoffer: i 1 l deioniseret vand opløses:	
Ammoniumchlorid, NH_4Cl , A.R.:	38,5 g
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, A.R.:	33,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , A.R.:	8,5 g
Dikaliummonohydrogenphosphat, K_2HPO_4 , A.R.:	21,75 g

Blandingen fungerer dels som næringsstofkilde, dels som buffersystem.

1.6.1.2. Apparatur

glasbeholdere på 1 til 4 (f.eks. cylindriske beholdere)

omrører med rørehoved af glas eller metal på en passende aksel (Omrøreren bør rotere 5 til 10 cm over beholderens bund). Der kan i stedet anvendes en magnetomrører med en 7 til 10 cm lang magnetpind

glasrør med indvendig diameter på 2 til 4 mm til beluftning. Rørets åbning bør befinde sig ca. 1 cm over beholderens bund

centrifuge (ca. 3 550 g)

pH-meter

apparat til måling af opløst ilt

papirfiltre

apparat til membranfiltrering

membranfiltre med porestørrelse 0,45 μm . Membranfiltre er kun egnede, hvis der er vished for, at de hverken afgiver kulstoffet eller absorberer stoffet under filtreringen

analyseudstyr til bestemmelse af indholdet af organisk kulstof og det kemiske iltforbrug.

1.6.1.3. Tilberedning af inoculum

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg vaskes (flere gange) med vand (jf. ovenfor) ved centrifugering eller dekantering.

Det aktiverede slam skal være i passende stand. Sådant slam kan fås fra et velfungerende anlæg til spildevandsrensning. For at få så mange forskellige bakteriestammer som muligt kan det være bedre at blande inocula fra forskellige kilder (f.eks. forskellige rensningsanlæg, jordekstrakter, flodvand osv.).

Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres, jf. »egnhedskontrol«.

1.6.1.4. Fremstilling af testopløsningerne

Til testbeholderen sættes 500 ml vand, 2,5 ml opløsning af uorganiske næringsstoffer pr. liter samt en mængde aktiveret slam, der svarer til 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter færdigblanding. Der tilsættes en så stor mængde stamopløsning af teststoffer, at den færdige blanding får en DOC-koncentration på 50 til 400 mg/l. Det tilsvarende COD-interval er 100 til 1 000 mg/l. Der fyldes op til i alt 1 til 4 l med vand. Valg af det samlede volumen afhænger af det antal prøver, der skal udtages til DOC- eller COD-bestemmelser, og det nødvendige analysevolumen.

Normalt kan et volumen på 2 l betragtes som tilstrækkeligt. Mindst én kontrolbeholder (blindprøve) sættes i gang samtidig med hver testserie; den indeholder kun aktiveret slam og opløsning af uorganiske næringsstoffer fortyndet med vand til samme totalvolumen som i testbeholdererne.

1.6.2. Testens gennemførelse

Testbeholderne omrøres med magnetomrørere eller propelomrørere under indirekte belysning eller i mørke ved 20 til 25° C. Beluftning sker med komprimeret luft, der om nødvendigt renses med et vatfilter og en vaskeflaske. Det må påses, at slammet ikke bundfælder, og at iltkoncentrationen ikke falder til under 2 mg/l.

pH-værdien kontrolleres regelmæssigt (f.eks. dagligt) og indstilles om nødvendigt til pH 7 til 8.

Lige før prøveudtagningen kompenseres der for tab ved fordampning ved tilsætning af deioniseret eller destilleret vand. Det kan f.eks. anbefales at afmærke væskehøjden i beholderen før testen startes. Der sættes nye mærker efter hver prøveudtagning (uden beluftning og omrøring). De første-prøver udtages altid tre timer efter testens start, således at det kan konstateres, om testmaterialet adsorberes på det aktiverede slam.

Elimineringen af testmaterialet følges ved DOC- eller COD-bestemmelser dagligt eller regelmæssigt med et andet interval. Prøverne fra testbeholderen og blindforsøget filtreres gennem et omhyggeligt vasket papirfilter. De første 5 ml filtrat bortkastes. Slam, der er vanskeligt at filtrere, kan fjernes ved først at centrifugere i ti min. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC og COD. Testens løber i op til 28 dage.

NB: Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter. Membranfiltrene må hverken afgive eller adsorbere organisk materiale.

Egnedhedskontrol af det aktiverede slam

I hver testserie bør indgå en beholder, der indeholder et kendt stof, således at man kan kontrollere egnetheden af det aktiverede slam. Til dette formål er diethylen glycol fundet egnet.

Adaptation

Hvis der foretages analyser med forholdsvis korte mellemrum (f.eks. dagligt), vil adaptation klart fremgå af nedbrydningskurven (jf. figur 2). Testen bør derfor ikke sættes i gang umiddelbart før weekenden.

Hvis der forekommer adaptation ved slutningen af perioden, kan testen fortsættes, indtil nedbrydningen er afsluttet.

NB: Hvis der er behov for større viden om det adapterede slams opførsel, udsættes det samme aktiverede slam endnu engang for det samme testmateriale efter følgende fremgangsmåde:

Omrøringen og beluftningen standses, og man lader det aktiverede slam bundfælde sig. Den ovenstående væske fjernes, der fyldes op til 2 l med vand og omrøres i 15 minutter, og blandingen henstår til ny bundfældning. Efter fjernelse af den ovenstående væske anvendes det tilbageblevne slam til gentagelse af testen med det samme materiale som under punkt 1.6.1.4 og 1.6.2.

Det aktiverede slam kan isoleres ved centrifugering i stedet for bundfældning.

Det adapterede slam kan eventuelt blandes med frisk slam, så man når op på i alt 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter.

Analyse

Normalt filtreres prøver gennem et omhyggeligt vasket papirfilter (til vask anvendes deioniseret vand).

Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter (0,45 µm).

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i prøvefiltraterne (de første 5 ml bortkastes) med TOC-instrumentet. Hvis filtratet ikke kan analyseres samme dag, skal det opbevares i køleskab til næste dag. Længere tids opbevaring kan ikke anbefales.

COD-koncentrationen bestemmes i prøvefiltraterne med et COD-analyseudstyr efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i reference 2 nedenfor.

2. DATA OG VURDERING

Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC- og COD-koncentrationerne i prøverne ifølge 1.6.2. Nedbrydningen ved tidspunktet T beregnes med den formel (med definitioner), der anført under 1.2.

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent. Den nedbrydning, der opnås ved slutningen af testen, anføres som »den biologiske nedbrydelighed ved Zahn-Wellens test«.

NB: Hvis der opnås fuldstændig nedbrydning før testperioden er udløbet og dette resultat bekræftes ved endnu en analyse den følgende dag, kan testen afsluttes.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- stoffets begyndelseskonzentration
- alle andre oplysninger og forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, et eventuelt referencestof og blindforsøget
- koncentrationen efter tre timer
- kurve over biologisk nedbrydning med forklaring
- hvornår og hvor prøveorganismerne er udtaget, adaptationsgrad, anvendt koncentration osv.
- fyldestgørende begrundelse for alle afvigelser fra fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af resultater

Gradvis fjernelse af DOC (COD) i løbet af dage eller uger viser, at teststoffet nedbrydes biologisk.

Fysisk/kemisk adsorption kan dog i visse tilfælde spille en vis rolle, og et tegn herpå er, at der inden for de første tre timer sker fuldstændig eller delvis fjernelse, og at forskellen mellem supernatant væsken fra kontrolforsøget og prøven bliver liggende på et uventet lavt niveau.

Det er nødvendigt at foretage yderligere testning, hvis der skal skelnes mellem biologisk nedbrydning (eller delvis biologisk nedbrydning) og adsorption.

Dette kan gøres på flere måder, mest troværdigt ved at anvende supernatant væsken som inoculum i en basis sat test (helst en respirometriske test).

Teststoffer, der giver høj fjernelse af DOC (COD), som ikke skyldes adsorption, ved denne test, bør betragtes som potentielt biologisk nedbrydelige. Delvis fjernelse, som ikke skyldes adsorption, betyder, at kemikaliet i hvert fald i et vist omfang nedbrydes biologisk.

Ringe eller ingen fjernelse af DOC (COD) kan skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismerne; dette kan undertiden også vise sig ved, at slammet opløses og forsvinder, hvorved supernatant væsken bliver uklar. Testen bør gentages med en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelse af en stofs specifik analysemetode eller ^{14}C -mærket teststof kan give større følsomhed. Hvis der anvendes ^{14}C -mærket teststof, vil påvisning af $^{14}\text{CO}_2$ bekræfte, at der er tale om biologisk nedbrydning.

Dersom resultaterne anføres som primær biologisk nedbrydning, bør der om muligt anføres en forklaring på den kemiske strukturændring, som fører til, at analyseresultaterne for det oprindelige teststof falder.

Valget af analysemetode skal underbygges, og analyseresultaterne for blindprøven skal anføres.

4.

REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981 *Test Guideline 302 B*. Decision of the Council C(81) 30 Final
 - (2) Bilag V C.9 Nedbrydning: Kemisk iltforbrug. Kommissionens direktiv 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende*, nr. L 251 af 19. 9. 1984.
-

BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — SIMULATIONSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

1.1.1. Generelle bemærkninger

Metoden er kun anvendelig for organiske teststoffer, der ved den benyttede testkoncentration:

- er opløselige i vand i det omfang, det er nødvendigt for tilberedning af testopløsningerne
- har et ubetydeligt damptryk under testbetingelserne
- ikke er hæmmende for bakterier.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedbestanddele vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, især i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismerne kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af egnede testkoncentrationer.

1.1.2. Bestemmelse af fuldstændig bionedbrydelighed (DOC/COD-analyse)

Formålet med metoden er at bestemme den fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af fjernelsen af stoffet og eventuelle metabolitter i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration svarende til 12 mg DOC/l (eller ca. 40 mg COD/l); 20 mg DOC/l synes at være optimal. (DOC = dissolved organic carbon, dvs. opløst organisk kulstof; COD = chemical oxygen demand, dvs. kemisk oxygenforbrug).

Teststoffets indhold af organisk kulstof (eller dets kemiske oxygenforbrug) skal fastlægges.

1.1.3. Bestemmelse af primær bionedbrydelighed (specifik analyse)

Formålet med metoden er at bestemme den primære bionedbrydelighed af et stof i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration på ca. 20 mg/l ved anvendelse af en specifik analysemetode (der kan benyttes lavere eller højere koncentration, hvis analysemetoden og toksicitetshensyn tillader dette). Herved kan stoffets primære bionedbrydelighed bedømmes (dvs. forsvinden af den oprindelige kemiske forbindelse).

Formålet med denne metode er *ikke* at bestemme teststoffets mineralisering.

Der må foreligge en passende analysemetode til bestemmelse af teststoffet.

1.2. Definitioner og enheder

1.2.1. DOC/COD-analyse

Nedbrydningen er defineret som den del af teststoffet, der fjernes, efter følgende formel:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100 \% \quad [1 \text{ a}]$$

hvor:

DR = procent DOC (eller COD) fjernet i den givne middellopholdstid med hensyn til teststoffet

T = teststofkoncentrationen i indløbet i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i testenhedens udløb i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E₀ = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i blindprøveenhedens udløb i mg DOC/l (eller COD/l).

Nedbrydningen angives som den procentdel DOC (eller COD), der fjernes i en given retentionstid med hensyn til teststoffet.

1.2.2. *Specifik analyse*

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_W) i den givne middellopholdstid, fremgår af følgende formel:

$$R_W = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100 \% \quad [1 \text{ b})]$$

hvor:

C_1 = stofkoncentrationen i testenhedens indløb (mg stof/l, bestemt ved specifik analyse)

C_0 = stofkoncentrationen i testenhedens udløb (mg stof/l, bestemt ved specifik analyse).

1.3. **Referencestoffer**

I nogle tilfælde, hvor et nyt stof undersøges, kan referencestoffer være nyttige; der kan endnu ikke anbefales specifikke referencestoffer.

1.4. **Testmetodens princip**

Til bestemmelse af den endelige bionedbrydelighed benyttes der parallelt to aktiv slam pilotenheder (OECD »Confirmatory testenheder« eller »Porous pot-enheder«). Teststoffet tilsættes til den ene enheds indløb (syntetisk spildevand eller husholdnings-spildevand), medens den anden enhed kun tilføres spildevand. Til bestemmelse af primær bionedbrydning med specifik analyse i indløb og udløb benyttes der kun én enhed.

DOC-koncentrationerne (eller COD-koncentrationerne) måles i udløbene, eller stofkoncentrationerne bestemmes ved specifik analyse.

DOC, som skyldes teststoffet, måles ikke, men angives blot.

Når der foretages DOC-målinger (eller COD-målinger), antages forskellene mellem test- og kontroludløbenes gennemsnitkoncentrationer at skyldes ikke-nedbrudt teststof.

Når der foretages specifikke analyser, kan ændringen i stamforbindelsens koncentration måles (primær bionedbrydning).

Der kan arbejdes med enhederne efter »koblingsmetoden«, hvor der foretages transinokulering.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Stoffets startkoncentration afhænger af, hvilken type analyse der foretages og dens begrænsninger.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. **Apparatur**

Der kræves to enheder af samme type, undtagen når der foretages specifikke analyser. Der er to typer, der kan benyttes:

OECD Confirmatory test:

Udstyret (tillæg I) består af holdetank (A) til syntetisk spildevand, doseringspumpe (B), luftningstank (C), separator (sedimenteringstank) (D), slampumpe (E) til recirkulering af aktiveret slam samt tank (F) til opsamling af det behandlede spildevand.

Tank (A) og (F) skal være af glas eller egnet plast og skal mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Normalt er separatorens højde (D) indstillet således, at luftningstanken indeholder 3 l blandet væske. En sintret luftningsklods (G) er ophængt i tank (C) over keglens spids. Den luftmængde, der blæses gennem luftningstanken, kan kontrolleres ved hjælp af et flowmeter.

Slampumpen (E) er indstillet således, at de aktiverede slam fra separatoren kontinuerligt og regelmæssigt recirkuleres til luftningstanken (C).

Porous pot:

Den porøse krukke laves af porøs polyethylenplade (2 µm tyk, maksimal porestørrelse 95 µm), der formes til cylindre med en diameter på 14 cm og en konisk bund, der danner en vinkel på 45° med siderne (figur 1 og 2 i tillæg II). Den porøse krukke anbringes i en uigennemtrængelig beholder af egnet plastic med en diameter på 15 cm og et udtag i 17,2 cm højde på den cylindriske del, som bestemmer, hvor meget krukken kan rumme (3 l). Der er en stiv støttering af egnet-plast omkring den indre beholders øverste kant, således at der er 0,5 cm plads til udløbsvand mellem den indre og den ydre beholder.

De porøse krukker kan opstilles på bunden af et termostatstyret vandbad. Den indre beholder tilføres luft i bunden, hvorpå der er anbragt egnede luftningsklodser.

Beholder (A) og (E) skal være af glas eller egnet plast og mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Der er behov for ekstra indre porøse krukker til erstatning af krukker, der måtte blive tilstoppet; tilstoppede krukker renses ved 24 timers neddykning i en hypochloritopløsning efterfulgt af grundig afskylning i ledningsvand.

1.6.1.2. Filtrering

Membranfiltreringsapparat og membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 µm. Membranfiltre er egnede, hvis det sikres, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer teststoffet under filtreringen.

1.6.1.3. Spildevand

Der kan anvendes enten syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand.

Eksempel på syntetisk spildevand pr. liter ledningsvand opløses:

pepton:	160 mg
kødekstrakt:	110 mg
urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Husholdningsspildevand:

Husholdningsspildevandet indsamles frisk hver dag fra overløbet fra primærsedimenteringstanken i et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.1.4. Stamopløsning af teststof

Der fremstilles en opløsning af teststoffet (f.eks. 1 %) for tilsætning til testenheden. Stofkoncentrationen skal bestemmes, så det vides, hvilken mængde, der skal tilsættes spildevandet eller direkte i enheden via en anden pumpe for at give den krævede testkoncentration.

1.6.1.5. Inokulum

NB: Hvis der anvendes husholdningsspildevand, tjener det ikke noget formål at anvende et inokulum med lav bakteriekoncentration, men der kan bruges aktiveret slam.

Der kan anvendes forskellige former for inokulum.

Her er tre eksempler på et egnet inokulum:

a) Inokulum fra sekundært spildevand

Inokulum laves af sekundært spildevand af god kvalitet fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven skal holdes under aerobe forhold indtil brugen. Som forberedelse af inokulum filtreres prøven gennem et groft filter, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

b) Blandet inokulum

Inokulum fra sekundært spildevand se beskrivelsen ovenfor.

Inokulum fra jord:

100 g havejord (fertil, ikke steril) opslættes i 1 000 ml chlorfrit drikkevand (jord med et ekstremt højt indhold af ler, sand eller humus er ikke egnet). Efter omrøring henstår suspensionen i 30 minutter for sedimentering. Supernatanten filtreres gennem et groft filterpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Beluftning af filtratet begyndes straks og fortsættes indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Inokulum fra overfladevand:

Der tages endnu en del til inokulum fra et mesosaprob overfladevand. Prøven filtreres gennem et groft filterpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Lige dele af de tre inokulumprøver blandes godt sammen, og det endelige inokulum tages fra denne blanding. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

c) Inokulum af aktiveret slam

Der kan som inokulum bruges en mængde (højest 3 l) aktiveret slam (indhold af suspenderede faste bestanddele på op til 2,5 g/l) udtaget fra luftningstanken i et anlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.2. Fremgangsmåde

Testen foretages ved stuetemperatur; temperaturen skal være mellem 18 og 25° C.

Hvis det er hensigtsmæssigt, kan testen foretages ved en lavere temperatur (ned til 10° C): hvis stoffet nedbrydes, kræves der normalt ikke noget yderligere. Hvis stoffet imidlertid ikke nedbrydes, må testen foretages ved en konstant temperatur på mellem 18 og 25° C.

1.6.2.1. Indkøringsperiode: slamdannelse/stabilisering af enhederne

Slamdannelses-/stabiliseringsperioden er den periode, hvori koncentrationen af de suspenderede faste bestanddele af det aktiverede slam og enhedernes ydeevne bliver stationær under de anvendte driftsbetingelser.

Indkøringsperioden er den periode, der går fra det tidspunkt, hvor teststoffet første gang tilsættes, indtil det tidspunkt, hvor dets fjernelse har nået et plateau (relativt konstant værdi). Denne periode må højst være på seks uger.

Vurderingsperioden er en tre-ugersperiode, tre uger fra det tidspunkt, hvor teststoffets fjernelse når en relativt konstant og sædvanligvis høj værdi. For stoffer, der viser ringe eller ingen nedbrydning i de første seks uger, regnes vurderingsperioden for de følgende tre uger.

Man indleder med at fylde den eller de enheder, der er nødvendige til én test, med inokulum blandet med tiløb.

Beluftningen (og luftpumpen (E)), hvis der er tale om OECD Confirmatory test-enheder) og doseringspumpen (B) sættes derefter i gang.

Tiløb uden teststof skal passere gennem luftningstanken (C) med en hastighed på enten 1 l i timen eller 0,5 l i timen; det giver en middellopholdstid på enten tre eller seks timer.

Beluftningshastigheden reguleres, således at tankens (C) indhold konstant holdes i suspension, medens indholdet af opløst ilt er mindst 2 mg/l.

Man må med egnede midler forhindre skumdannelse. Der må ikke anvendes skumdæmpende midler, der hæmmer det aktiverede slam.

Det slam, der har samlet sig rundt om toppen af luftningstanken (C) (og for OECD Confirmatory test-enheder vedkommende i bunden af sedimenteringstanken (D) og i kredsløbet), skal mindst én gang om dagen føres tilbage til den blandede væske ved afbørstning eller på anden passende vis.

Hvis slammet ikke sedimenterer, kan dets massefylde øges ved tilsætning af 2 ml-portioner af en 5% ferri-chloridopløsning; dette gentages om fornødent.

Udløbet opsamles i tank (E) eller (F) i 20 til 24 timer, og der udtages en prøve efter grundig blanding. Tanken (E eller F) må omhyggeligt rengøres.

For at kunne overvåge og kontrollere, at processen er effektiv, måles mindst to gange om ugen det kemiske oxygenforbrug (COD) eller indholdet af opløst organisk kulstof (DOC) både i filtratet af det akkumulerede udløb og i det filtrerede indløb (der bruges en membran med en porestørrelse på 0,45 µm, idet de første (ca.) 20 ml af filtratet bortkastes).

COD- eller DOC-reduktionen skulle flade ud, når der er opnået en nogenlunde regelmæssig daglig nedbrydning.

Tørstofindholdet i det aktiverede slam i luftningstanken bestemmes mindst to gange om ugen (i g/l). Man kan benytte enhederne på to forskellige måder: enten bestemmes det aktiverede slams tørstofindhold to gange ugentligt, og hvis det er over 2,5 g/l, bortkastes det overskydende aktiverede slam, eller der fjernes dagligt 500 ml blandet væske fra hver krukke, således at slammet får en middellopholdstid på seks dage.

Når de målte og skønnede parametre (processens effektivitet (med hensyn til COD- eller DOC-fjernelse), slamkoncentration, slamsedimenteringsegenskaber, udløbets uklarhed osv.) for de to enheder er tilstrækkeligt stabile, kan teststoffet tilsættes indløbet til den ene af enhederne (i henhold til 1.6.2.2).

Det er også muligt at tilsætte teststoffet ved begyndelsen af slamdannelsesperioden (1.6.2.1), især hvis slammet tilsættes som inokulum.

1.6.2.2. Test

Arbejdsbetingelserne er de samme som for indkøringsperioden, og der tilsættes så meget stamopløsning (ca. 1 %) af teststoffet til testenhedens indløb, at den ønskede teststofkoncentration (ca. 10 til 20 mg DOC/l eller 40 mg COD/l) i spildevandet opnås. Det kan ske ved, at stamopløsningen blandes i spildevandet dagligt eller ved hjælp af et særskilt pumpesystem. Denne koncentration kan opnås gradvis. Hvis teststoffet ikke har nogen toksiske virkninger på det aktiverede slam, kan også højere koncentrationer testes.

Blindprøveenheden tilføres kun indløb uden tilsatte stoffer. Der udtages passende mængder af udløbene til analyse, og de filtreres gennem membranfiltre (0,45 µm), idet de første (ca.) 20 ml filtrat bortkastes.

De filtrerede prøver skal analyseres samme dag eller konserveres ved en egnet metode, f.eks. ved brug af 0,05 ml af en 1 % mercurichloridopløsning (HgCl₂) for hver 10 ml filtrat eller ved opbevaring ved 2 til 4° C i indtil 24 timer eller under -18° C i en længere periode.

Indkøringstiden med tilsætning af teststoffet bør ikke være på over seks uger, og vurderingsperioden bør ikke være på under tre uger, dvs. at der foreligger 14 til 20 bestemmelse til beregning af det endelige resultat.

Koblingsmetoden:

Enhederne kobles ved at ombytte 1,5 l blandet væske (inkl. slam) mellem de to enheders luftningskamre en gang om dagen. Hvis der er tale om stærkt adsorberende teststoffer, tages der kun 1,5 l supernatant fra sedimenteringstankene, som hældes i den anden enheds aktivslamtank.

1.6.2.3. Analyse

Der kan foretages to former for analyse for at følge, hvad der sker med stoffet:

DOC og COD

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationerne med kulstofanalysatoren og/eller af COD-værdierne ifølge reference 2.

Specifik analyse:

Teststofkoncentrationerne bestemmes ved en egnet analysemetode. Når det er muligt, foretages der en særlig bestemmelse af det stof, der er adsorberet på slammet.

2. DATA OG VURDERING

2.1. Koblingsmetoden

Når koblingsmetoden anvendes, udregnes den daglige fjernelse, DR, ifølge 1.2.1.

De daglige værdier for fjernelse, DR, korrigeres for den materialeoverførsel, der skyldes transinokuleringen, og benævnes DR_c; der benyttes ligning [2] for en tre timers eller ligning [3] for en seks timers middellopholdstid.

$$DR_c = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Gennemsnittet af DR_c-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge ligning [4].

$$S_{DR_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR}_c - DR_{ci})^2}{n-1}} \quad [4]$$

hvor:

S_{DR_c} = DR_c-værdiernes standardafvigelse

\overline{DR}_c = gennemsnit af DR_c-værdierne

n = antal bestemmelser.

Outliers i DR_c-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DR_c-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [5] som:

$$DR_c = \overline{DR}_c \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR_c} \quad [5]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdien af t for n værdipar af E og E₀ og ved en statistisk konfidens på P (P = 1 - α), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DR_c-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DR_c = 98,6 ± 2,3 % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2. Metode uden kobling

Enhedernes ydeevne kan kontrolleres på følgende måde:

$$\text{procent fjernelse af COD eller DOC} = \frac{\text{COD eller DOC i spildevand} - \text{COD eller DOC i afløb}}{\text{COD eller DOC i spildevand}} \times 100$$

Den daglige fjernelse kan afbildes grafisk, således at det fremgår, om der er nogen tendenser til f.eks. tilvænnning.

2.2.1. Benyttelse af COD/DOC-bestemmelser

Den daglige procent fjernelse, % DR, udregnes ifølge 1.2.1.

Gennemsnittet af DR-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

hvor:

S_{DR} = DR_i-værdiernes standardafvigelse

\overline{DR} = gennemsnit i DR_i-værdierne

n = antal bestemmelser,

Outliers i DR-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DR-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [7] som:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \quad [7]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdi af t for n værdipar af E og E_0 og ved en statistisk konfidens på P ($P = 1 - \alpha$), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DR-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DR = (98,6 ± 2,3) % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2.2. Benyttelse af specifik analyse

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_w), udregnes ifølge 1.2.2.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- det i tillæg III gengivne skema, der viser arbejdsbetingelserne for testen
- det valgte apparatur (OECD Confirmatory tester eller porous pot)
- den valgte arbejdsmetode: koblingsmetode eller ej
- form for spildevand: syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand. Hvis der er tale om husholdnings-spildevand anføres dato og sted for prøveudtagning
- anvendt inokulum med dato og sted for prøvens udtagning
- angivelse af analysemetoden, hvis der er foretaget specifikke analyser, og en beskrivelse af den
- afbildning af COD- eller DOC-fjernelse mod tiden, herunder indkørings- og vurderingsperiode
- analytisk genfindning af teststoffet som COD eller DOC i stamopløsningen
- afbildning af den procentvise fjernelse af teststof fra den vandige fase mod tiden (indkøringsperiode og vurderingsperiode), hvis der er foretaget specifikke analyser
- den gennemsnitlige fjernelse af DOC, COD eller teststof samt standardafvigelse udregnes af resultaterne fra vurderingsperioden, dvs. når der er en stabil fjernelse af teststof
- afbildning af aktivslamkoncentration mod tiden
- eventuelle bemærkninger vedrørende det aktiverede slam (bortkastet overskydende slam, forekomst af klumpdannelse $FeCl_3$ osv.)
- teststofkoncentration benyttet ved testen
- eventuelle resultater af analyser af slammet
- alle oplysninger og forsøgsresultater vedrørende teststoffet og referencestoffer, hvis sådanne er anvendt
- videnskabelige grunde til eventuelle ændringer af fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af Resultaterne

Hvis den procent teststof, der fjernes fra den vandige fase, er lav, kan de skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismer. Også lysis og tab af slam, som giver uklar supernatant, samt nedsat effektivitet med hensyn til fjernelse af COD (eller DOC) kan afsløre dette.

Undertiden kan fysisk-kemisk adsorption spille en rolle. Forskelle mellem biologisk virkning på molekylet og fysisk-kemisk adsorption kan afsløres ved analyse af slammet efter passende desorption.

Der kræves yderligere tests, hvis der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption.

Det kan gøres på flere forskellige måder, men den mest overbevisende er brug af supernatanten som inokulum i en basis-sæt test (helst respirometrisk test)

Hvis det observeres, at den procentvise fjernelse af DOC eller COD er høj, skyldes dette bionedbrydning, hvorimod der ved lave fjernelsesprocenter ikke kan skelnes mellem bionedbrydning og eliminering. Som eksempel kan nævnes, at hvis et opløseligt stof udviser en høj adsorptionskonstant på 98 %, og der bortkastes 10 % overskydende slam pr. dag, er en eliminering på op til 40 % mulig; hvis der bortkastes 30 % overskydende slam, kan eliminering på grund af adsorption på og fjernelse sammen med overskydende slam komme op på 65 % (reference 4).

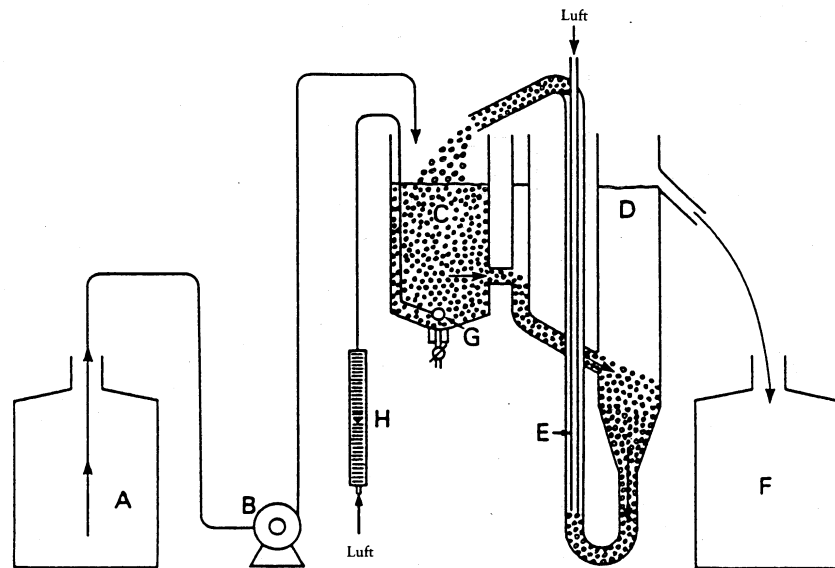
Når der benyttes specifik analyse, må man være opmærksom på forholdet mellem stoffets struktur og den benyttede specifikke analyse. I dette tilfælde kan det observerede fænomen ikke fortolkes som en mineralisering af stoffet.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Bilag V C9 Nedbrydningstest — kemisk oxygenforbrug Kommissionens direktive 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende*, nr. L 251 af 19. 9. 1984.
- (3) Painter, H. A. and King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center, UK.
- (4) Wierich, P. and Gerike, P., »The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants« — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, no 2, June 1981, p. 161, 171.
- (5) Rådets direktiv 82/242/EØF og 82/243/EØF (*De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 109 af 22. 4. 1982) om ændring af direktiv 73/404/EØF og 73/405/EØF: vaske- og rengøringsmidlers bionedbrydelighed (*De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 347 af 17. 12. 1973).
- (6) H. Streuli, Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980) 406—408.

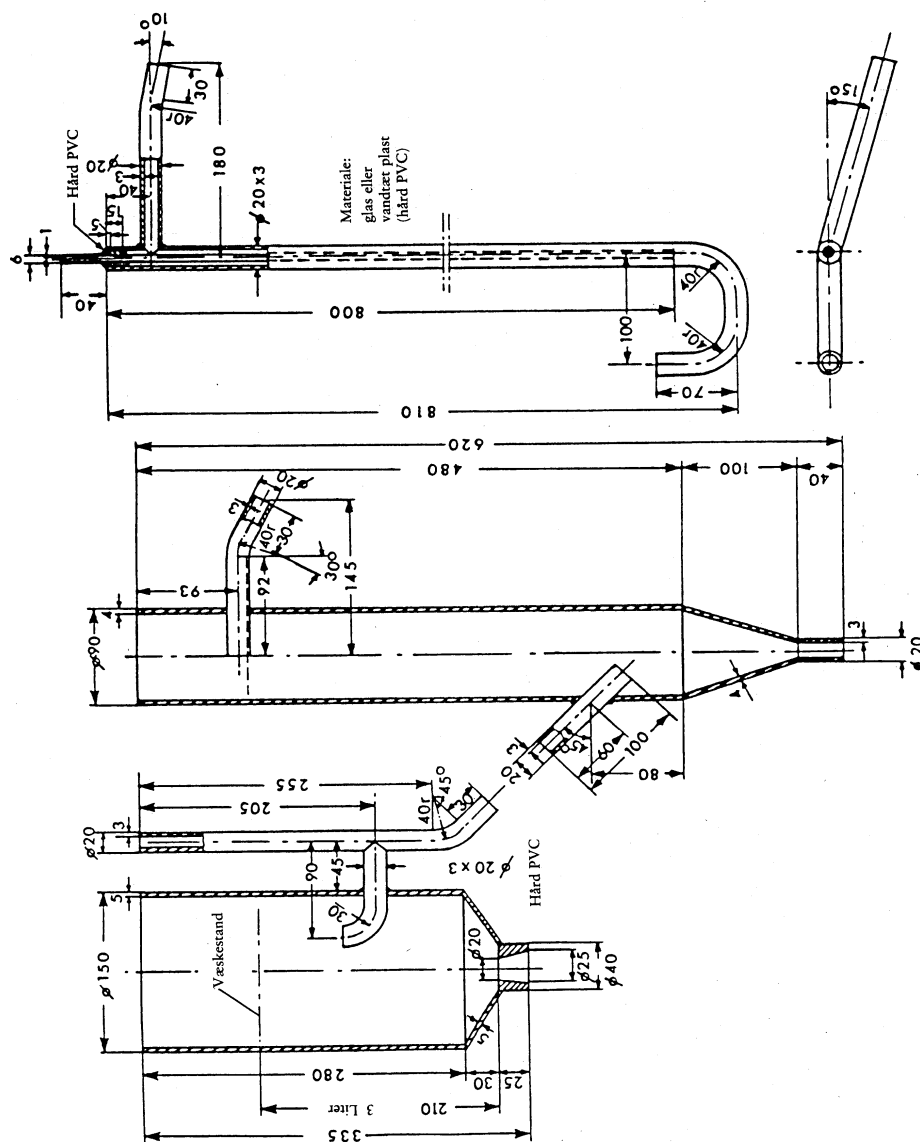
Tillæg 1

Figur 1



- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| A = holdetank | E = slampumpe |
| B = doseringspumpe | F = opsamlingstank |
| C = luftningstank (kapacitet 3 l) | G = luftningsklods |
| D = sedimenteringstank | H = flowmeter (valgfrit) |

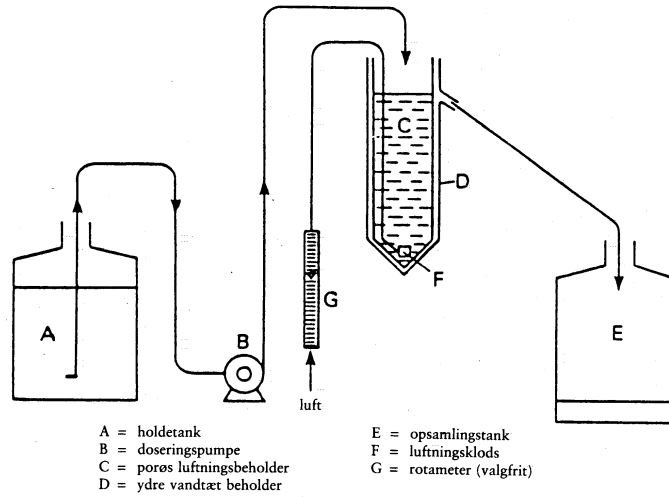
Figur 2



Tillæg 2

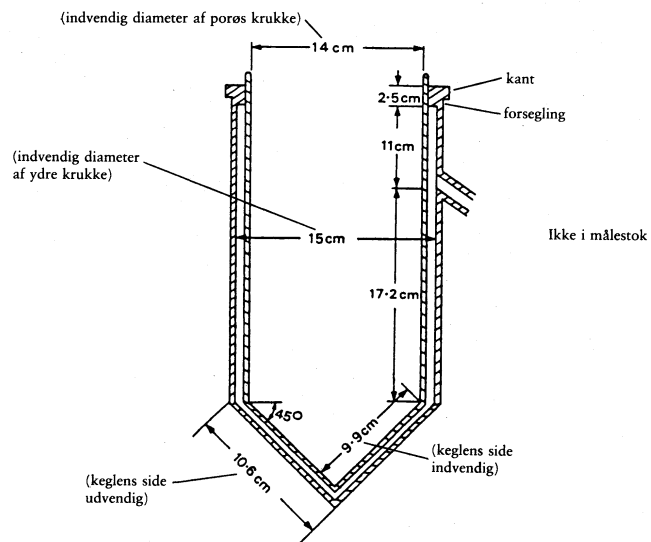
Figur 1

Udstyr til bedømmelse af bionedbrydelighed



Figur 2

Tre-liters porøs luftningskrukke



Tillæg 3

Arbejdsbetingelser for simulationstest for aktiveret slam

Der sættes et kryds i hver gruppe

Apparatur

OECD Confirmatory
Porous Pot

Arbejdsmetode

enkelt enhed
koblede enheder
ikke-koblede enheder

Transinokulering

ingen
aktiveret slam
supernatant

Middelopholdstid

tre timer
seks timer

Basisnæringsstof

husholdningsspildevand
syntetisk spildevand

Inokulum

sekundært spildevand
blandet inokulum
aktiveret slam

Tilsætning af teststof

fra starten
trinvis forøgelse
efter slamdannelse

Analyse

specifik
COD
DOC

C. 11

BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Den beskrevne metode vurderer virkningen af et teststof på mikroorganismer ved måling af respirationshastigheden under definerede betingelser ved forskellige koncentrationer af teststoffet.

Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til identifikation af stoffer, der kan påvirke et aerobt mikrobielt rensningsanlæg uheldigt, og at indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af teststoffer til anvendelse i bionedbrydelighedstests.

Inden den endelige test kan der udføres en forprøve. Den giver oplysninger om det koncentrationsinterval, som skal anvendes i hovedtesten.

I testen indgår to kontroltests, én i begyndelsen og én i slutningen af testrækken. Desuden bør hvert parti aktiveret slam også kontrolleres ved brug af et referencestof.

Metoden kan lettest benyttes for stoffer, der på grund af deres opløselighed i vand og ringe flygtighed sandsynligvis vil forblive i vandet.

Det kan for stoffer med begrænset opløselighed i testmediet vise sig umuligt at bestemme EC_{50} .

Resultater, der er baseret på oxygenoptagelse, kan føre til fejlslutninger, hvis teststoffet har tendens til at afkoble oxidativ phosphorylering.

Det er nyttigt at have følgende oplysninger, når testen skal foretages:

- vandopløselighed
- damptryk
- strukturformel
- teststoffets renhed.

Anbefaling:

Aktiveret slam kan indeholde potentielt patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

1.2. Definitioner og enheder

Respirationshastigheden er oxygenforbruget hos mikroorganismer i aerobt spildevandsslam og udtrykkes almindeligvis i mg O_2 pr. mg slam pr. time.

Til beregning af et teststofs hæmmende virkning i en bestemt koncentration udtrykkes respirationshastigheden som en procentdel af gennemsnittet af to kontrolrespirationshastigheder:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \% \text{ hæmning}$$

hvor:

R_s = oxygenforbruget ved testkoncentrationen af teststoffet,

RC_1 = oxygenforbruget, kontrol 1,

RC_2 = oxygenforbruget, kontrol 2.

I forbindelse med denne metode er EC_{50} den koncentration af teststoffet, hvorved respirationen er 50 % af den, som kontroltesten viser under de i denne metode beskrevne betingelser.

1.3. Referencestoffer

Det anbefales at bruge 3,5-dichlorphenol, som vides at hæmme respiration, som referencestof og at teste det for EC_{50} for hvert parti aktiveret slam for at kontrollere, at slammets følsomhed ikke er unormal.

1.4. Testmetodens princip

Respirationshastigheden i aktiveret slam tilført en standardmængde syntetisk spildevand måles efter en kontaktid på 30 minutter og/eller tre timer. Respirationshastigheden i det samme aktiverede slam ved forskellige koncentrationer af teststoffet under i øvrigt identiske betingelser måles også. Teststoffets hæmmende virkning ved en bestemt koncentration udtrykkes som en procentdel af middelrespirationshastigheden i to kontroltests. Der beregnes en EC_{50} -værdi ud fra bestemmelser ved forskellige koncentrationer.

1.5. Kvalitetskriterier

Testresultaterne er gyldige, hvis:

- respirationshastigheden i de to kontroltests ligger inden for 15% af hinanden
- EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) for 3,5-dichlorphenol ligger inden for det accepterede område på 5 til 30 mg/l.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. Reagenser

1.6.1.1. Opløsninger af teststoffet

Teststofopløsningerne frisklaves ved undersøgelsens indledning ved brug af en stamopløsning. En stamopløsningskoncentration på 0,5 g/l er egnet, hvis nedenstående anbefalede fremgangsmåde følges.

1.6.1.2. Opløsning af kontrolstoffet

Der fremstilles som eksempel en 3,5-dichlorphenolopløsning ved at opløse 0,5 g 3,5-dichlorphenol i 10 ml 1 M NaOH og fortynde med destilleret vand til ca. 30 ml; derefter tilsættes under omrøring 0,5 M H_2SO_4 til det punkt, hvor udfældning begynder — der kræves ca. 8 ml 0,5 M H_2SO_4 — og endelig fortyndes blandingen med destilleret vand til 1 l. pH skulle derefter være omkring 7 til 8.

1.6.1.3. Syntetisk spildevand

Der kan laves syntetisk spildevand ved opløsning af følgende mængder stof i 1 l vand:

- 16 g pepton
- 11 g kødekstrakt
- 3 g urea
- 0,7 g NaCl
- 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,8 g K_2HPO_4 .

Note 1: Dette syntetiske spildevand er 100 gange så koncentreret som det, der er beskrevet i OECD Technical Report »Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents« af 11. juni 1976 med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.

Note 2: Hvis det fremstillede medium ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4° C, dog ikke længere end en uge og under forhold som ikke giver anledning til ændring i sammensætningen.

Medium kan også steriliseres forud for oplagringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt kort tid før testen udføres. Umiddelbart før brug blandes omhyggeligt og pH justeres.

1.6.2. Apparatur

Måleapparatur: Det er ikke afgørende, hvordan apparaturet nærmere er udformet. Der må imidlertid ikke være luftmellemrum mellem væske og prop, og sonden skal slutte tæt til kolbens hals.

Der kræves normalt laboratorieudstyr og især følgende:

- måleapparatur
- beluftningsapparatur
- pH-elektrode og -måleudstyr
- O_2 -elektrode.

1.6.3. Forberedelse af inokulum

Som mikrobielt inokulum til testen anvendes aktiveret slam fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

På laboratoriet kan grovere praktikker om nødvendigt fjernes ved kort henstand, f.eks. 15 minutter, efterfulgt af dekantering af det øverste lag med finere slampartikler. Alternativt kan slammet anvendes efter blanding i få sekunder i blender. Hertil kommer, at slammet bør vaskes med vand (fra hanen) eller en isotonisk opløsning, hvis hæmmende stoffer kan forudses at være til stede. Efter centrifugering dekanteres supernatanten fra, hvilket gentages tre gange.

En mindre mængde af slammet afvejes og tørres. Herudfra kan beregnes den mængde af vådt slam, som skal suspenderes i vand for at opnå et aktivt slam med et indhold af faste bestanddele suspenderet i en blandet væske på 2 til 4 g/l. Dette svarer til en koncentration på 0,8 til 1,6 g/l i testmediet, hvis den nedenfor anbefalede procedure følges.

Hvis slammet ikke kan anvendes den dag, det er indsamlet, tilsættes der 50 ml syntetisk spildevand til hver liter aktiveret slam, der er fremstillet som ovenfor beskrevet; slammet beluftes derefter natten over ved $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Det holdes derefter beluftet, indtil det anvendes den følgende dag. Inden anvendelsen kontrolleres pH, som om nødvendigt bufferes til pH 6 til 8. De faste bestanddele, der er suspenderet i den blandede væske, bestemmes som beskrevet i foregående afsnit.

Hvis der er behov for at anvende det samme parti slam de efterfølgende dage (højst fire dage), tilsættes yderligere 50 ml syntetisk spildevand ved hver arbejdsdags slutning.

1.6.4. Fremgangsmåde

Varighed/kontaktid:	30 minutter og/eller tre timer under beluftning
Vand:	Drikkevand (om nødvendigt befriet for chlor)
Lufttilførsel:	Ren, oliefri luft. Luftgennemstrømning 0,5 til 1,0 l/min.
Måleapparatur:	Fladbundet kolbe som f.eks. en BOD-kolbe (se figur 1)
Oxygenmåler:	Oxygenelektrode med tilhørende skriver
Næringsopløsning:	Syntetisk spildevand (se ovenfor)
Teststof:	Testopløsningen laves frisk ved testens begyndelse
Referencestof:	F.eks. 3,5-dichlorphenol (mindst tre koncentrationer)
Kontroltest:	Inokuleret prøve uden teststof
Temperatur:	$20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Nedenfor gives forslag til en eksperimentel procedure, der kan følges for både testen og referencestoffet i tre-timers kontaktp perioden:

Der anvendes flere beholdere (f.eks. et-liters bægerglas).

Der benyttes mindst fem koncentrationer med et fast koncentrationsforhold på helst ikke over 3,2.

På tidspunktet »0« fortyndes 16 ml af det syntetiske spildevand med vand til 300 ml. Der tilsættes 200 ml af det mikrobielle inokulum, og hele blandingen (500 ml) hældes i en første beholder (første kontrol C_1).

Testbeholderen skal gennemlufte kontinuerligt for at sikre, at opløst ilt (O_2) ikke falder under 2,5 mg/l, og at iltkoncentrationen er i størrelsesorden 6,5 mg/l umiddelbart før målingen af respirationshastigheden.

På tidspunkt »15 minutter« (15 minutter er et vilkårligt, men bekvemt interval) gentages ovenstående proces, bortset fra at der tilsættes 100 ml teststofopløsning til de 16 ml syntetisk spildevand, før der tilsættes vand til 300 ml og mikrobielt inokulum til i alt 500 ml. Denne blanding hældes dernæst i et andet bægerglas og beluftes som omhandlet ovenfor. Denne proces gentages med 15 minutters intervaller med forskellige mængder teststofopløsning, således at der bliver en række beholdere med forskellige koncentrationer af teststoffet. Til slut fremstilles en anden kontrol (C_2).

Efter tre timers forløb måles pH, og efter god blanding hældes en del af den første beholders indhold over i måleapparatet, og respirationshastigheden måles over en periode på indtil ti minutter.

Denne bestemmelse gentages for hver beholders indhold med 15 minutters intervaller, således at kontakttiden for hver beholder bliver tre timer.

Referencestoffet testes med hver parti mikrobielt inokulum på samme måde.

Et andet system (f.eks. mere end én oxygenmåler) vil være nødvendigt, når der skal foretages målinger efter 30 minutters kontakt.

Hvis der kræves måling af det kemiske oxygenforbrug, må der fremstilles andre beholdere, som indeholder teststof, syntetisk spildevand og vand, men ikke aktiveret slam.

Oxygenforbruget måles og registreres efter en beluftningstid på 30 minutter og/eller tre timer (kontakttid).

2. DATA OG VURDERING

Respirationshastigheden beregnes ud fra skriverkurven som $\text{mg O}_2/\text{l} \times \text{h}$ mellem ca. 6,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$ og 2,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$, eller over en ti minutters periode, hvis respirationshastigheden er lav. Den del af respirationskurven, som respirationshastigheden måles over, skal være lineær.

Hvis respirationshastighederne i de to kontroltests ikke ligger inden for 15 % af hinanden, eller hvis referencestoffets EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) ikke ligger inden for det accepterede område (5 til 30 mg/l for 3,5-dichlorphenol), er testen ugyldig og må gentages.

Hæmningsprocenten beregnes ved hver testkoncentration (se 1.2). Hæmningsprocenten aftegnes mod koncentration på semilogaritmisk papir (eller probit), og der udledes en EC_{50} -værdi.

95 %-konfidensgrænserne for EC_{50} -værdierne kan bestemmes ved hjælp af standardprocedurer.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- teststof: data for kemisk identifikation
- testsystem: kilde, koncentration og eventuel forbehandling af det aktiverede slam
- testbetingelser:
 - reaktionsblandings pH før respirationsmåling
 - testtemperatur
 - testens varighed
 - referencestof og dets målte EC_{50}
 - eventuel abiotisk oxygenoptagelse
- resultater:
 - alle målte data
 - hæmningskurve og metode til beregning af EC_{50}
 - EC_{50} og om muligt 95 % konfidensgrænser, EC_{20} og EC_{80}
 - alle observationer og eventuelle afgivelser fra denne testmetode, som kan have haft indflydelse på resultatet.

3.2. Fortolkning af data

EC_{50} værdien må kun betragtes som vejledende for teststoffets sandsynlige toksicitet for enten spildevandsbehandling med aktiveret slam eller mikroorganismer i spildevand, da de komplekse vekselvirkninger, der forekommer i miljøet, ikke kan simuleres nøjagtigt i en laboratorietest. Hertil kommer at teststoffer, som har en hæmmende effekt på ammoniak oxidation også kan give anledning til atypiske hæmningskurver. Sådanne kurver må fortolkes med forsigtighed.

4.

REFERENCER

- (1) International Standard ISO/8192 — 1986.
 - (2) Broecker, B. and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).
 - (3) Brown, D., Hiltz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, også beskrevet af:
 - (5) B. Robra, *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).
 - (6) W. Schefer, *Textilveredlung* 6, 247 (1977).
 - (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*. Decision of the Council C(81) 30 Final.
-

C. 12

BIOLOGISK NEDBRYDNING

MODIFICERET SCAS-TEST

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at bedømme den potentielle fuldstændige bionedbrydelighed af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer, når disse udsættes for ret høje koncentrationer af mikroorganismer over et længere tidsrum. I dette tidsrum holdes mikroorganismene i live ved en daglig tilførsel af næring bestående af bundfældet spildevand. (I forbindelse med weekenden kan spildevandet opbevares ved 4° C, eller det syntetiske spildevand til OECD's confirmatory test kan anvendes.)

Der kan finde fysisk-kemisk adsorption sted på de suspenderede faste stoffer, og der skal tages hensyn hertil ved fortolkningen af resultaterne (jf. 3.2).

På grund af den flydende fases lange opholdstid (36 timer), og da der med mellemrum tilføres næringsstoffer, simulerer testen ikke de normale vilkår i et spildevandsanlæg. De resultater, der er opnået med forskellige teststoffer, viser, at denne metode har en høj bionedbrydningsevne.

De betingelser, der skabes i denne metode, letter i høj grad selektion og/eller adaptation af mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde teststoffet. (Denne fremgangsmåde kan ligeledes anvendes til at fremstille akklimatiserede inocula til brug i andre tests.)

I denne test vurderes teststoffernes fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af koncentrationen af opløst organisk kulstof (DOC). Det bør foretrækkes at bestemme koncentrationen af opløst organisk kulstof efter oprensning af den sure opløsning snarere end som forskellen mellem total C og uorganisk C.

Ved samtidig brug af en specifik analysemetode kan teststoffets primære nedbrydning (nedbrydning af en oprindelige kemiske struktur) vurderes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske teststoffer, som ved den i analysen anvendte koncentration:

- er opløselige i vand (mindst 20 mg opløst organisk kulstof/l)
- har et ubetydeligt damptryk
- ikke er hæmmende overfor bakterier
- ikke adsorberes væsentligt i testsystemet
- ikke går tabt ved, at testopløsningen skummer.

Teststoffets indhold af organisk kulstof skal være bekendt.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen for lidet signifikante resultater og for valg af en egnet testkoncentration.

1.2. Definitioner og enheder

C_t = koncentration af organisk kulstof i teststoffet, til stede i eller tilsat det bundfældende spildevand ved begyndelsen af belufningsperioden (mg/l)

C_t = koncentrationen af opløst organisk kulstof i supernatanten ved afslutningen af belufningsperioden (mg/l)

C_c = koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrollens supernatant ved afslutningen af belufningsperioden (mg/l).

Bionedbrydeligheden defineres i denne test som det organiske kulstofs forsvinden. Bionedbrydningen kan udtrykkes som:

1. Den procentvise forsvinden D_{da} af den mængde af stoffet, der tilføres dagligt:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

hvor:

D_{da} = nedbrydning/daglig tilførsel.

2. Den procentvise forsvinden D_{ssd} af den mængde stof, der er til stede ved hver dags begyndelse:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

hvor:

D_{ssd} = nedbrydning/stof ved dagens begyndelse.

Indekserne i og $(i+1)$ henviser til testdagen; ligning [2(a)] bør anvendes, hvis spildevandets indhold af opløst organisk kulstof svinger fra dag til dag, medens ligning [2(b)] kan anvendes, når mængden af opløst organisk kulstof er forholdsvis konstant fra dag til dag.

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelsen af et nyt stof. Der kan imidlertid ikke anbefales noget bestemt referencestof.

Der angives oplysninger om flere forskellige stoffer, der er evalueret i ringtests (jf. tillæg 1), først og fremmest for at testmetoden af og til kan kalibreres, men også for at resultaterne kan sammenlignes, hvis der anvendes en anden metode.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg placeres i en semi-kontinuerlig aktiveret slamenhed (semi-continuous activated sludge – SCAS). Teststoffet og bundfældet husholdningsspildevand tilføres, og blandingen beluftes i 23 timer. Beluftningen indstilles derefter, slammet gives tid til at bundfælde sig, og supernatant væsken fjernes.

Det tilbageblevne slam i beluftningskammeret blandes dernæst en yderligere mængde af teststoffet og spildevandet, hvorefter cyklusen begynder forfra.

Bionedbrydning konstateres ved at bestemme indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væsken. Dette resultat sammenlignes med resultatet af analysen af væsken fra en kontrolenhed, som kun er tilført bundfældet spildevand.

Såfremt der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i koncentrationen af det oprindelige stof som følge af bionedbrydningen måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Denne metodes reproducerbarhed, baseret på fjernelse af opløst organisk kulstof, er endnu ikke fastslået. (For så vidt angår primær bionedbrydning, er der opnået meget nøjagtige data for let nedbrydelige stoffer).

Metodens følsomhed afhænger i vid udstrækning af variabiliteten i blindprøven og i mindre grad af den nøjagtighed, hvormed indholdet af opløst organisk kulstof kan bestemmes, eller af væskens indhold af teststof ved påbegyndelsen af hver enkelt cyklus.

1.6. Beskrivelse af testproceduren

1.6.1. Forberedelse

Et tilstrækkeligt antal rene beluftningsenheder (i stedet kan den oprindelige 1,5 l SCAS-prøveenhed anvendes) og lufttilførselsslanger (figur 1) for hvert enkelt teststof og til kontrollen klargøres. Den komprimerede luft, der tilføres testenhederne, renses med et vatfilter og bør være fri for organisk kulstof og være forudmættet med vand, så fordampningstab reduceres.

Fra et aktiveret slam anlæg der primært behandler husholdningsspildevand, tages en prøve af blandet væske, indeholdende 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter.

Til hver beluftsingsenhed kræves ca. 150 ml af den blandede væske.

Stamopløsninger af teststoffet tilberedes i destilleret vand. Den normalt krævede koncentration er 400 mg organisk kulstof pr. liter hvilket giver en koncentration af teststoffet på 20 mg/l ved påbegyndelsen af hver beluftsingscyklus, såfremt der ikke finder bionedbrydning sted.

Der kan anvendes højere koncentrationer, hvis toksiciteten over for mikroorganismerne tillader det.

Slamopløsningernes indhold af organisk kulstof måles.

1.6.2. Testbetingelser

Testen bør foretages ved 20 til 25° C.

Der anvendes en høj koncentration af aerobe mikroorganismer (fra 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter), og den effektive opholdstid er 36 timer. Det kulstofholdige materiale i det tilførte spildevand iltes grundigt, sædvanligvis inden otte timer efter påbegyndelsen af hver beluftsingscyklus. Derefter respirerer slammet endogent i resten af beluftsingsperioden, hvorunder det eneste tilgængelige substrat er teststoffet, medmindre også dette metaboliseres hurtigt. Disse forhold, kombineret med daglig genpodning af prøven når husholdningsspildevand anvendes som medium, giver uhyre gunstige betingelser for såvel akklimatisering som høj grad af bionedbrydning.

1.6.3. Gennemførelsen af testen

Der fremstilles en prøve af blandet væske fra en laboratorieenhed, der overvejende behandler husholdningsspildevand eller fra et egnet aktiveret slamanlæg, og prøven opbevares under aerobe betingelser indtil anvendelsen i laboratoriet. Hver beluftsingsenhed samt kontrolenheden påfyldes 150 ml (hvis den oprindelige SCAS-test anvendes, multipliceres de anførte volumener med 10) blandet væske, og beluftsningen påbegyndes. Efter 23 timers forløb indstilles beluftsningen, og slammet bundfældes i 45 minutter. Hanen på hver kolbe åbnes successivt, og der udtages 100 ml af supernatant væsken. Der klargøres en prøve bundfældet husholdningsspildevand umiddelbart før brug, og 100 ml heraf tilsættes det tilbageblevne slam i hver beluftsingsenhed. Beluftsningen påbegyndes på ny. På dette stadium tilsættes intet teststof. Enhederne tilsættes dagligt husholdningsspildevand, men kun indtil det tidspunkt, hvor bundfældningen resulterer i en klar supernatant væske. Dette tager sædvanligvis op til to uger, hvorefter det opløste organiske kulstof i supernatant væsken ved afslutningen af hver beluftsingscyklus nærmer sig en konstant værdi.

Ved afslutningen af dette tidsrum blandes de forskellige bundfældede slamprøver, og 50 ml af denne blandede slamprøve tilsættes til hver enhed.

Der tilsættes 95 ml bundfældet spildevand og 5 ml vand til kontrolenhederne, og 95 ml bundfældet spildevand plus 5 ml af den pågældende stamopløsning af teststoffet (400 mg/l) til testenhederne. Beluftsningen påbegyndes atter og fortsættes i 23 timer. Slammet bundfældes i 45 minutter, og supernatant væsken fjernes og analyseres for opløst organisk kulstof.

Ovenstående påfyldnings- og aftapningsprocedure gentages dagligt under hele testens forløb.

Inden bundfældningen kan det være nødvendigt at rense enhedernes vægge for at forhindre akkumulering af faste stoffer over væskens niveau. For at undgå krydskontaminering anvendes der en separat skraber eller børste for hver enkelt enhed.

Ideelt set bør indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væskerne bestemmes dagligt, selv om mindre hyppige analyser kan tillades. Inden analysen filtreres væskerne gennem vaskede membranfilter med en porestørrelse på 0,45 µm, eller væskerne centrifugeres. Membranfilter er egnede, hvis der er sikkerhed for, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen. Prøvens temperatur må ikke overstige 40° C, så længe den er i centrifugen.

Testens varighed er ubestemt for stoffer, der udviser ringe eller ingen bionedbrydning. Erfaringerne viser dog, at den generelt bør vare mindst tolv uger, men ikke længere end 26 uger.

2. DATA OG EVALUERING

Værdierne for indholdet af opløst kulstof i supernatant væskerne i testenhederne og i kontrolenhederne afbildes mod tiden i et koordinatsystem.

Efterhånden som nedbrydningen skrider frem, vil niveauet i testenheden nærme sig niveauet i kontrolenheden. Når forskellen mellem de to niveauer er konstant i tre på hinanden følgende målinger, gennemføres der et tilstrækkeligt antal yderligere målinger til en statistisk behandling af dataene, og den procentvise bionedbrydning af teststoffet beregnes (D_{da} eller D_{ssd} , jf. 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- fuldstændige oplysninger om spildevandets art, om hvilken type enhed der er anvendt samt om forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, referencestoffet, hvis et sådan er anvendt, og blindprøven
- temperatur
- kurve for det organiske kulstofs forsvinden, med beskrivelse af beregningsmetode (jf. 1.2)
- dato og sted for prøveudtagning af aktiveret slam og spildevand, status vedrørende adaptation, koncentration osv.
- videnskabelige grunde til eventuelle ændringer i testproceduren
- underskrift og dato.

3.2. Fortolkning af resultaterne

Eftersom det stof, der kan testes med denne metode, ikke vil være let bionedbrydeligt, vil enhver forsvinden af opløst organisk kulstof, som udelukkende skyldes bionedbrydning, normalt forløbe gradvis over dage eller uger, undtagen i sådanne tilfælde, hvor akklimatiseringen er pludselig, hvilket fremgår af en abrupt forsvinden efter nogle uger.

Fysisk-kemisk adsorption kan imidlertid nogle gange spille en betydelig rolle. Dette er tilfældet, når der ved begyndelsen indtræder en fuldstændig eller delvis forsvinden af det tilsatte opløste organiske kulstof. Hvad der derefter sker, afhænger af forskellige faktorer, såsom adsorptionsgraden og koncentrationen af suspenderet fast stof i det bortkastede spildevand. Forskellen mellem koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrol- og testenhedernes supernatant væsker øges sædvanligvis gradvis fra den først indtrufne værdi, og denne forskel forbliver dernæst på den nye værdi under resten af forsøget, medmindre der finder akklimatisering sted.

Når der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption, er yderligere analyser påkrævet. Dette kan gøres på flere forskellige måder, men den mest pålidelige metode er at anvende supernatant væsken, eller slam, som podestof i en basissæt test (helst en respiometrisk test).

Teststoffet, der resulterer i omfattende, ikke adsorptiv forsvinden af opløst organisk kulstof, bør i denne test betragtes som potentielt bionedbrydeligt. Delvis ikke adsorptiv forsvinden tyder på, at stoffet i hvert fald er bionedbrydeligt til en vis grad.

Ringe eller ingen forsvinden af opløst organisk kulstof kan skyldes teststoffets hæmning af mikroorganismerne. Dette kan ligeledes afsløres af lysis og tab af slam, hvilket giver uklare supernatant væsker. Testen bør i så fald gentages med anvendelse af en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelsen af en specifik analysemetode eller C-14-mærket teststof kan give større følsomhed. Anvendes der et C-14-teststof, vil genfindning af $^{14}\text{CO}_2$ bekræfte, at der fundet bionedbrydning sted.

Såfremt der ligledes angives resultater for primær bionedbrydning, bør der om muligt gives en forklaring på den forandring i den kemiske struktur, der medfører, at det oprindelige teststof ikke kan påvises.

Valideringen af analysemetoden skal anføres sammen med værdierne for blindprøvemedit.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*. Decision of the Council C(81) 30 Final.

Tillæg 1

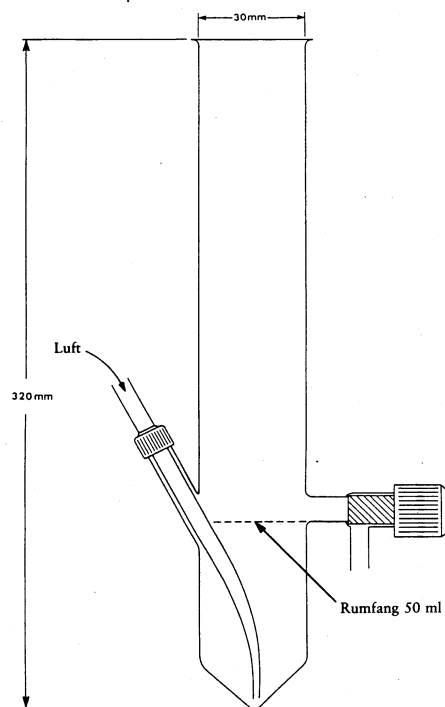
SCAS-test: eksempel på resultater

Stof	C_T (mg/l)	$C_T - C_C$ (mg/l)	Procent bionedbrydning D_{ds}	Testens varighed (dage)
4-acetylaminobensensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropylenbensensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylen glycol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

Tillæg 2

Eksempel på apparatur

Figur 1



C.13 BIOKONCENTRERING: GENNEMSTRØMNINGSTEST MED FISK

1. METODE

Denne biokoncentreringsmetode er en gengivelse af OECD Test Guideline 305 (1996).

1.1 INDLEDNING

I denne metode beskrives en fremgangsmåde for karakterisering af stoffers biokoncentreringspotentiale i fisk under gennemstrømning. Test ved gennemstrømning er langt at foretrække, men også semi-statistiske systemer tillades, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Testen er så detaljeret beskrevet, at den kan udføres, samtidig med at der er tilstrækkelig frihed til at tilpasse tilrettelægnings af forsøgene til særlige forhold i laboratorierne og teststofferne særlige egenskaber. Metoden er bedst til stabile organiske kemiske stoffer med en $\log P_{ow}$ -værdi mellem 1,5 og 6,0¹⁾, men den kan også anvendes for ekstremt lipofile stoffer (med $\log P_{ow} > 6,0$). Den på forhånd skønnede biokoncentreringsfaktor (BCF), undertiden benævnt K_B , for sådanne ekstremt lipofile stoffer vil normalt være højere end den værdi af ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}), man må forvente at finde ved laboratorieforsøg. Forhåndsskøn over biokoncentreringsfaktoren for organiske stoffer med $\log P_{ow}$ -værdier op til ca. 9,0 kan beregnes efter udtrykket i Bintein et al.²⁾ De parametre, der karakteriserer biokoncentreringspotentialet, er hastighedskonstanten for optagelse (k_1), hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) og BCF_{SS} .

Radioaktivt mærkede teststoffer kan gøre analyse af vand- og fiskeprøver lettere og kan benyttes til at afgøre, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (f.eks. ved forbrænding eller opløsning af væv), vil BCF blive baseret på den oprindelige forbindelse, eventuelle tilbageholdte metabolitter og assimileret kulstof. BCF-værdier, der baseres på det samlede indhold af radioaktivt materiale, kan derfor ikke altid sammenlignes direkte med en BCF-værdi, der er bestemt ved specifik kemisk analyse for den oprindelige forbindelse alene.

Ved undersøgelser med radioaktivt mærkede stoffer kan der benyttes oprensningsprocedurer til bestemmelse af BCF baseret på den oprindelige forbindelse, og de vigtigste metabolitter kan om nødvendigt karakteriseres. Man kan også kombinere en undersøgelse af metabolisme i fisk med en biokoncentreringsundersøgelse ved at analysere og identificere stofrester i væv.

1.2 DEFINITIONER OG ENHEDER

Ved biokoncentrering/bioakkumulering forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificerede væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium.

Ved biokoncentreringsfaktoren (BCF eller K_B) på et givet tidspunkt under optagelsesfasen af akkumuleringstesten forstås koncentrationen af teststoffet i/på fiskene eller specificerede væv deraf (C_f i $\mu\text{g/g}$ (ppm)) divideret med koncentrationen af det kemiske stof i det omgivende medium (C_w i $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

Ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS} eller K_B) ændrer sig ikke væsentligt over et længere tidsrum, idet koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium er konstant i dette tidsrum.

Man taler om et plateau eller en ligevægtstilstand i afbildningen af teststoffet i fisk (C_f) mod tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når 3 på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst 2 dages mellemrum, ligger inden for $\pm 20\%$ af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de 3 prøveudtagningsperioder. Ved pooling af prøver til analyse, kræves der mindst 4 på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på 7 dage være mere passende.

En biokoncentreringsfaktor, der er beregnet direkte ud fra kinetiske hastighedskonstanter (k_1/k_2), betegnes den kinetiske koncentreringsfaktor, BCF_k .

Ved octanol-vand fordelingskoefficienten (P_{ow}) forstås forholdet mellem et kemisk stofs opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt (metode A.8), også betegnet K_{ow} . Logaritmen til P_{ow} benyttes som rettesnor for et kemisk stofs potentiale for biokoncentrerung i vandorganismer.

Ved eksponeringsfasen eller optagelsesfasen forstås det tidsrum, hvori fiskene udsættes for teststoffet.

Ved hastighedskonstant for optagelse (k_1) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsforøgelsen af teststoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf), når fiskene udsættes for stoffet (k_1 udtrykkes i dag⁻¹).

Ved udskillelsesfasen forstås det tidsrum efter overførsel af forsøgsfiskene fra et medium med teststoffet i til et medium uden stoffet, hvor man undersøger udskillelsen (eller nettoafgivelsen) af stoffet fra forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf).

Ved hastighedskonstant for udskillelse (k_2) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsfaldet af teststoffet i forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf), efter at de er overført fra et medium med teststoffet i til et medium uden dette stof (k_2 udtrykkes i dag⁻¹).

1.3

TESTMETODENS PRINCIP

Testen falder i to faser, en eksponeringsfase (optagelsesfase) og en udskillelsesfase. I optagelsesfasen udsættes separate grupper af fisk af én art for mindst to koncentrationer af teststoffet. De overføres dernæst til et medium uden teststoffet, hvor udskillelsesfasen forløber. Der kræves altid en udskillelsesfase, undtagen hvis optagelsen af stoffet under eksponeringsfasen har været ubetydelig (f.eks. hvis BCF er mindre end 10). Under begge testens faser følges koncentrationen af stoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf). Der holdes samtidig en kontrolgruppe af fisk under samme betingelser bortset fra, at der ikke er noget teststof til stede, så man kan sammenholde eventuelle skadevirkninger i biokoncentrerings testen med en tilsvarende kontrolgruppe og bestemme baggrundskoncentrationer af teststof.

Optagelsesfasen varer i 28 dage, medmindre det godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Ud fra ligningerne i bilag 3 kan man forudsige, hvor lang tid optagelsesfasen vil vare, og hvor lang tid der vil gå, inden der er ligevægt. Udskillelsesperioden indledes dernæst ved, at fiskene overføres til en ren beholder med samme medium men uden teststof. Når det er muligt, beregnes biokoncentreringsfaktoren både som forholdet (BCF_{ss}) mellem koncentrationen i fiskene (C_f) og i vandet (C_w) ved ligevægt, og som kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_k) som forholdet mellem hastighedskonstanterne for optagelse (k_1) og udskillelse (k_2), idet kinetikken antages at være af første orden. Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, må der benyttes mere komplekse modeller (bilag 5).

Hvis der ikke nås ligevægt inden 28 dage, forlænges optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage; derefter påbegyndes udskillelsesfasen.

Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for udskillelse (eller konstanterne, hvis der er tale om mere komplekse modeller), biokoncentreringsfaktoren og så vidt muligt konfidensgrænser for hver af disse parametre beregnes ud fra den model, der bedst beskriver de målte koncentrationer af teststof i fisk og vand.

BCF udtrykkes som en funktion af fiskenes samlede vægt. I særlige tilfælde kan dog bestemte væv eller organer (f.eks. muskeltvæv eller lever) anvendes, hvis fiskene er tilstrækkelig store, eller fiskene kan opdeles i en spiselig fraktion (filet) og en ikke-spiselig fraktion (indvolde). Da der for mange organiske stoffer er en tydelig sammenhæng mellem biokoncentreringspotentialet og stoffets lipofile karakter, er der en tilsvarende sammenhæng mellem forsøgsfiskenes fedtindhold og stoffernes observerede biokoncentrerung. For at imødegå sådanne udsving i forsøgsresultater for stærkt lipofile stoffer (dvs. $\log P_{ow} > 3$) bør biokoncentrerungen udtrykkes både i forhold til fedtindholdet og i forhold til den samlede legemsvægt.

Fedtinholdet skal om muligt bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til bestemmelse af teststoffets koncentration.

1.4 OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Inden biokoncentreringstesten udføres, skal følgende oplysninger om teststoffet foreligge:

- a) opløselighed i vand
- b) octanol-vand fordelingskoefficient P_{ow} (betegnes også K_{ow} , bestemt ved en HPLC-metode i A.8)
- c) hydrolyse
- d) fotokemisk omdannelse i vand bestemt ved bestråling med sollys og simuleret sollys under samme bestrålingsforhold som ved testen for biokoncentrering³⁾
- e) overfladespænding (dvs. for stoffer, hvis P_{ow} ikke kan bestemmes)
- f) damptryk
- g) umiddelbar bionedbrydelighed (når det er relevant)

Blandt andre nødvendige oplysninger er toksiciteten over for den fiskeart, der benyttes til testen, helst den asymptotiske (dvs. tidsuafhængige) LC_{50} . Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af teststoffet i opløsninger og biologisk materiale og oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares. Hvis der bruges ^{14}C -mærkede teststoffer, skal den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt.

1.5 TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være til stede for, at testen betragtes som gyldig:

- temperaturudsving må ikke være større end $\pm 2^{\circ}C$
- koncentrationen af opløst oxygen må ikke komme under 60% af mætning
- koncentrationen af teststoffet i kamrene skal ligge inden for $\pm 20\%$ af gennemsnittet af de målte værdier under eksponeringsfasen
- dødeligheden og andre skadevirkninger/sygdomme må ved testens afslutning højst være 10% både i kontrolgruppen og i de eksponerede fisk; hvis testen strækker sig over flere uger eller måneder, må dødsfald og andre skadevirkninger i begge grupper højst være 5% om måneden og højst 30% i alt.

1.6 REFERENCESTOFFER

Det kan være nyttigt at anvende referencestoffer med kendt biokoncentreringspotentiale til kontrol af forsøgsmetoden, hvis dette er påkrævet. Der kan dog endnu ikke anbefales nogen bestemte stoffer.

1.7 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.7.1 Apparatur

Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, der kan opløses eller adsorbere, absorbere eller afgive stoffer og have en skadelig virkning på fiskene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardkar af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af fisk. Bløde plastslanger bør benyttes mindst muligt. Der skal helst bruges rør og slanger af teflon[®], rustfrit stål eller glas. Erfaringerne har vist, at det til stoffer med høj adsorptionskoefficient såsom syntetiske pyrethroider kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde må udstyret kasseres efter brug.

1.7.2 Vand

Til testen benyttes sædvanligvis råvand, som skal være af ensartet kvalitet og komme fra en ikke-forurenet kilde. Vand til fortynding skal være af en sådan kvalitet, at den valgte fiskeart kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Allerhelst bør det godtgøres, at fiskearten kan overleve, vokse og formere sig i fortyndingsvandet (f.eks. i laboratoriekultur eller en toksicitetstest over en hel livscyklus). Vandet skal beskrives i hvert fald ved sit pH, hårdhed, tørstof i alt og organisk kulstof i alt, og gerne også indholdet af ammonium, nitrit og nitrat, samt for saltvandsfisk saltholdigheden. Selv om det er velkendt, hvilke parametre der er vigtige for fisks velfærd, er der i bilag 1 anført anbefalede maksimumkoncentrationer for en række parametre for fersk- og saltvand til forsøg.

Vandet skal være af konstant kvalitet under hele forsøget. Dets pH skal være mellem 6 og 8,5 men for en given test skal det ligge konstant inden for $\pm 0,5$. For at sikre at fortyndingsvandet ikke ubehørigt påvirker forsøgsresultatet (f.eks. ved kompleksdannelse med teststoffet) eller indvirker negativt på fiskebestanden, udtages der regelmæssigt prøver til analyse. Indholdet af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), vigtige anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), pesticider (f.eks. organiske phosphorforbindelser i alt og organiske chlorforbindelser i alt), organisk kulstof i alt og opslæmmet tørstof bør bestemmes f.eks. hver tredje måned, når fortyndingsvandet vides at være af forholdsvis konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten kan påvises at have været konstant i mindst et år, kan hyppigheden sættes ned (til f.eks. hvert halve år).

Både det naturlige partikelindhold og indholdet af organisk kulstof i alt (TOC) i fortyndingsvandet skal være så lavt som muligt, så man undgår adsorption af teststoffet til organisk materiale, hvilket kan nedsætte dets biotilgængelighed⁴⁾. Den højeste acceptable værdi er 5 mg/l for partikler (tørstof, der ikke passerer et 0,45 μm filter) og 2 mg/l for organisk kulstof i alt (se bilag 1). Om nødvendigt må vandet filtreres inden brugen. Bidraget til indholdet af organisk kulstof i vandet fra testfiskene (ekskrementer) og føderester skal holdes så lavt som muligt. Under hele testen må koncentrationen af organisk kulstof i testkarret ikke overstige koncentrationen af organisk kulstof hidrørende fra teststoffet og et eventuelt opløsende stof med mere end 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3 Testopløsninger

Der fremstilles en stamopløsning af teststoffet med en passende koncentration. Den skal helst fremstilles ved simpel blanding eller omrystning af teststoffet med vand. Brug af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløsende stoffer) anbefales ikke, men det kan i visse tilfælde være nødvendigt for at opnå en passende koncentreret stamopløsning. Som opløsningsmiddel kan der benyttes ethanol, methanol, ethylenglycol-monomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% methylcellulose eller HCO-40. Der bør udvises forsigtighed med brug af let bionedbrydelige midler, da de kan skabe problemer med bakterievækst i test med gennemstrømning. Teststoffet kan være radioaktivt mærket og skal være af størst mulig renhed (f.eks. helst $> 98\%$).

Til forsøg med gennemstrømning kræves der et system, der kontinuerligt leverer og fortynder en stamopløsning af teststoffet (f.eks. doseringspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), til tilførsel af teststoffet til kamrene. Der tilstræbes en udskiftning på mindst 5 gange dagligt pr. testkammer. Gennemstrømningsmetoden bør foretrækkes, men kan det ikke lade sig gøre (f.eks. hvis testorganismerne tager skade), kan der bruges en semi-statisk teknik, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt. Flowhastighederne for stamopløsning og fortyndingsvand kontrolleres 48 timer før testens begyndelse og derefter mindst dagligt under testen. Ved denne kontrol måles flowet i hvert testkammer, og det sikres, at det ikke varierer med mere end 20%, hverken inden for hvert kammer eller mellem kamrene.

1.7.4 Valg af fiskeart

Blandt de vigtige kriterier ved valg af fiskearten er, at den skal være let at få fat i, kunne fås i passende størrelser og let kunne holdes i laboratoriet. Andre kriterier for valg af fiskeart kan være dens rekreative, kommercielle eller økologiske betydning, dens følsomhed i forhold til andre arter og gode erfaringer med den.

I bilag 2 er anført nogle fiskearter, som anbefales til test. Der kan anvendes andre arter, men testmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Der skal da anføres en begrundelse for valg af art og testmetode.

1.7.5 **Opbevaring af fisk**

Stampopulationen af fisk akklimatiseres i mindst 2 uger i vand ved testtemperaturen og gives hele tiden tilstrækkeligt af det foder, som skal benyttes under testen.

Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

- dødelighed over 10% efter 7 dage: hele partiet forkastes
- dødelighed mellem 5% og 10% efter 7 dage: akklimatiseringen fortsættes i endnu 7 dage
- dødelighed under 5% efter 7 dage: partiet accepteres; hvis dødeligheden er over 5% efter endnu 7 dage, forkastes hele partiet.

Det sikres, at ingen af fiskene til testen har synlige sygdomme eller misdannelser. Syge fisk kasseres. Fisk må ikke behandles mod sygdomme hverken under testen eller i to uger forud for testen.

1.8 **TESTENS UDFØRELSE**

1.8.1 **Indledende test**

Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment med henblik på at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af eksponerings- og udskillelsesfasen.

1.8.2 **Eksponeringsbetingelser**

1.8.2.1 *Optagelsesfasens længde*

Forudsigelse af optagelsesfasens længde kan ske på grundlag af praktiske erfaringer (f.eks. fra en tidligere undersøgelse eller et andet kemisk stof, der akkumuleringsmæssigt ligner) eller ved hjælp af forskellige empiriske sammenhænge ud fra kendskab til stoffets opløselighed i vand eller dets octanol/vand fordelingskoefficient (se bilag 3).

Optagelsesfasen bør vare 28 dage, medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Er der ikke opnået ligevægt efter 28 dage, forlænges optagelsesfasen, og målingerne fortsættes, indtil der er nået ligevægt, dog højst 60 dage.

1.8.2.2 *Udskillelsesfasens længde*

Normalt er en periode på halvdelen af optagelsesfasen tilstrækkeligt til at opnå et passende fald (f.eks. 95%) i fiskenes belastning med stoffet (se redegørelsen for skønnet i bilag 3). Hvis der skal bruges urealistisk lang tid til at opnå et fald på 95%, f.eks. dobbelt så lang tid som en normal optagelsesfase (dvs. mere end 56 dage), kan tidsrummet sættes ned (dvs. indtil koncentrationen af teststoffet er mindre end 10% af ligevægtskoncentrationen). For stoffer med mere komplekse optagelses- og udskillelsesmønstre end det, hvor fisken betragtes som en helhed, og hvor der gælder førsteordenskinetik, må der dog benyttes en længere udskillelsesfase til bestemmelse af hastighedskonstanterne. Periodens længde kan f.eks. bestemmes af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i fiskene er højere end påvisningsgrænsen.

1.8.2.3 *Antal testfisk*

Der udvælges så mange fisk pr. testkoncentration, at der mindst er 4 fisk til rådighed pr. prøve ved hver prøveudtagning. Ønskes der større statistisk styrke, må antallet af fisk pr. prøve øges.

Hvis der benyttes voksne fisk, anføres i rapporten, om der er brugt hanner, hunner eller begge køn i eksperimentet. Hvis begge køn er anvendt, skal det dokumenteres, at der inden eksponeringen ikke er nogen signifikant forskel i fedtindhold mellem kønnene; pooling af alle hanner og hunner kan være påkrævet.

Til en given test udvælges der fisk af samme vægt, således at den mindste ikke vejer mindre end to tredjedele af den største. Alle fisk skal være af samme årgang og komme fra samme kilde. Da fiskenes alder og vægt undertiden synes at indvirke signifikant på BCF-værdierne¹⁾, skal disse oplysninger noteres nøjagtigt. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af fiskebestanden.

1.8.2.4 *Belastning*

Der benyttes et højt forhold mellem vand og fisk, så faldet i C_w som følge af overførsel af fiskene ved testens begyndelse bliver så lille som muligt, og for at undgå, at koncentrationen af opløst oxygen falder. Det er vigtigt, at belastningen afpasses efter den anvendte fiskeart. I alle tilfælde anbefales normalt en belastning på 0,1-1,0 g fisk (våd vægt) pr. liter vand pr. dag. Belastningen kan sættes op, hvis det godtgøres, at den nødvendige koncentration af teststof kan fastholdes inden for $\pm 20\%$, og at koncentrationen af opløst oxygen ikke kommer under 60% af mætning.

Der skal tages hensyn til fiskeartens normale levevilkår ved valget af belastning. Eksempelvis kan bundfisk kræve større bundareal i akvariet for samme vandrumfang end pelagiske fiskearter.

1.8.2.5 *Fodring*

Under akklimatisering og test gives fiskene passende foder med kendt fedt- og proteinindhold i en sådan mængde, at de forbliver sunde og bevarer deres legemsvægt. Fiskene fodres dagligt under akklimatisering og test med en mængde svarende til ca. 1-2% af legemsvægten; på denne måde holdes fedtkoncentrationen i de fleste fiskearter nogenlunde konstant under testen. Fodermængden beregnes på ny f.eks. en gang om ugen, så legemsvægt og fedtindhold holdes konstant. Til denne beregning kan man skønne vægten af fiskene i de enkelte kamre ud fra vægten af de fisk, der senest er taget op fra det pågældende kammer. De fisk, der bliver tilbage i kamrene, må ikke vejes.

Hver dag kort efter fodringen ($\frac{1}{2}$ -1 time) suges overskydende foder og ekskrementer op fra testkamrene. Kamrene holdes så rene som muligt under testen, så koncentrationen af organisk kulstof er så lav som muligt, eftersom tilstedeværende organisk kulstof kan nedsætte teststoffets biotilgængelighed¹.

Da meget foder er fremstillet af fiskemel, må det analyseres for teststoffet. Foderet bør tillige analyseres for pesticider og tungmetaller.

1.8.2.6 *Lys og temperatur*

Lysperioden er normalt 12-16 timer, og temperaturen ($\pm 2^\circ\text{C}$) skal være afpasset efter testfiskearten (se bilag 2). Belysningens type og karakteristika skal være kendt. Man bør være opmærksom på en eventuel fotokemisk omdannelse af teststoffet ved belysningsforholdene under undersøgelsen. Der skal benyttes en passende belysning, hvor det undgås, at fiskene udsættes for kunstigt fremkaldte fotokemiske omdannelsesprodukter. Det kan i nogle tilfælde være hensigtsmæssigt at afblænde UV-stråling under 290 nm med et filter.

1.8.2.7 *Testkoncentrationer*

Fiskene udsættes under gennemstrømning for mindst to koncentrationer af teststoffet i vand. Normalt sættes den højeste koncentration af teststoffet til ca. 1% af den akutte asymptotiske LC_{50} og mindst 10 gange højere end påvisningsgrænsen i vand ved den anvendte analysemetode.

Den højeste testkoncentration kan også fastsættes ved division af den akutte 96h LC₅₀ med et passende akut/kronisk-forhold (for nogle kemiske stoffer vil et passende forhold ligge fra ca. 3 op til 100). Om muligt vælges den eller de andre testkoncentrationer, således at den (de) er en faktor 10 lavere. Kan det ikke lade sig gøre på grund af 1% af LC₅₀-kriteriet og analysegrænsen, kan der benyttes en mindre faktor, eller man kan overveje at benytte ¹⁴C-mærket teststof. Der må ikke benyttes koncentrationer højere end teststoffets opløselighed.

Hvis der benyttes et opløsende stof, må koncentrationen ikke være større end 0,1 ml/l, og den skal være den samme i alle testkar. Dette stofs og teststoffets bidrag til det samlede indhold af organisk kulstof i testvandet skal være kendt. Det skal dog så vidt muligt undgås at benyttes sådanne materialer.

1.8.2.8 *Kontrolgrupper*

Der skal ud over testrækken være en kontrolgruppe med fortyndingsvand eller en kontrolgruppe med et eventuelt opløsende stof, forudsat at det er fastslået, at det opløsende stof ikke har nogen virkning på fisk. Er det ikke tilfældet, skal begge kontrolgrupper forefindes.

1.8.3 **Hyppeghed af målinger af vandkvaliteten**

Under testen måles opløst oxygen, TOC, pH og temperatur i alle kar. I kontrolkarrene og karret med den højeste koncentration måles vandet samlede hårdhed og saltholdighed, hvis det er relevant. Som minimum måles opløst oxygen og eventuel saltholdighed 3 gange - ved begyndelsen, midt i og ved slutningen af optagelsesperioden - og en gang ugentligt i udskillelisesperioden. TOC måles ved testens begyndelse (24 h og 48 h før optagelsesfasen begynder), før fiskene overføres, og mindst en gang ugentligt under både optagelses- og udskillelisesfasen. Temperaturen måles dagligt, pH ved begyndelsen og slutningen af hver periode, og hårdheden én gang ved hver test. Temperaturen skal helst følges kontinuerligt i mindst ét af karrene.

1.8.4 **Prøveudtagning og analyse af fisk og vand**

1.8.4.1 *Plan for udtagning af prøver af fisk og vand*

Der udtages prøver af vandet fra testkamrene med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både inden fiskene overføres og under optagelses- og udskillelisesfasen. Som minimum udtages der prøver af vandet samtidig med prøver af fisk og før fodring. Under optagelsesfasen bestemmes teststofkoncentrationen til kontrol af, at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Der udtages prøver af fisk mindst 5 gange under optagelsesfasen og mindst 4 gange under udskillelisesfasen. Da det i nogle tilfælde vil være vanskeligt at beregne et rimelig præcist skøn over BCF-værdien ud fra dette prøveantal, især hvis det formodes, at udskillelsen ikke følger en simpel førsteordenskinetik, kan det anbefales at øge prøveudtagningshyppigheden i begge perioder (se bilag 4). De ekstra prøver opbevares og analyseres kun, hvis resultaterne af den første analyserunde viser sig utilstrækkelig til beregning af BCF med den ønskede præcision.

I bilag 4 er der vist et eksempel på en acceptabel prøveudtagningsplan. Der kan let opstilles andre planer efter beregning af eksponeringstider for 95% optagelse ud fra andre antagne P_{ow}-værdier.

Prøveudtagningen fortsættes under optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 28 dage. Er der ikke nået ligevægt inden for 28 dage, fortsættes prøveudtagningen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage. Før udskillelisesfasen overføres fiskene til rene kar.

1.8.4.2 *Udtagning og forberedelse af prøver*

Vandprøver til analyse kan f.eks. udtages ved opsugning gennem et rør af inert materiale fra et sted midt i testkammeret. Da hverken filtrering eller centrifugering synes at kunne adskille den ikke-biotilgængelige fraktion af teststoffet fra den biotilgængelige (især for ekstremt lipofile stoffer, dvs. stoffer med log P_{ow} > 5)¹⁵⁾ i alle tilfælde, må prøverne ikke behandles på denne måde.

I stedet må man sørge for at holde karrene så rene som muligt, og indholdet af organisk kulstof i alt følges under såvel optagelses- som udskillelsesfasen.

Der udtages et passende antal fisk (normalt mindst fire) fra testkarrene ved hver prøveudtagning. De udtagne fisk skylles hurtigt med vand, duppes tørre og aflives med det samme på den mest velegnede og humane måde, hvorefter de vejes.

Fiske- og vandprøver skal helst analyseres umiddelbart efter udtagningen, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og udskillelseshastigheder. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau er nået.

Foretages analyserne ikke med det samme, opbevares prøverne hensigtsmæssigt. Inden undersøgelsen påbegyndes, indhentes der oplysninger om, hvordan det pågældende teststof bør opbevares, f.eks. dybfrysning, henstand ved 4°C, opbevaringstid og ekstraktion.

1.8.4.3 *Analysemetodens kvalitet*

Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfindning af teststoffet i både vand og fisk for den valgte metode. Det kontrolleres tillige, at teststoffet ikke kan påvises i det anvendte fortyndingsvand.

Om nødvendigt korrigeres de under testen fundne C_w - og C_f -værdier for genfindning og baggrundsværdier i kontrolgrupperne. Fiske- og vandprøver håndteres hele tiden på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. ved adsorption i prøveudtagningsudstyret) er mindst mulige.

1.8.4.4 *Analyse af fiskeprøver*

Hvis der i testen anvendes radioaktivt mærket materiale, kan man analysere for det samlede indhold af radioaktivitet (dvs. det oprindelige stof og dets metabolitter), eller prøverne kan oprenses, så den oprindelige forbindelse kan analyseres særskilt. Også de vigtigste metabolitter kan karakteriseres ved ligevægtstilstanden eller ved afslutningen af optagelsesfasen, hvis den nås først. Hvis BCF udtrykt som samlet mængde radioaktivt mærket materiale er $\geq 1000\%$ tilrådes det - for visse stoffers, f.eks. pesticiders, vedkommende henstilles det kraftigt - at nedbrydningsprodukter, der udgør $\geq 10\%$ af restindholdet i alt i fiskevævet ved ligevægt, identificeres og bestemmes kvantitativt. Hvis nedbrydningsprodukter, der udgør $\geq 10\%$ af radioaktivt mærket restindhold i alt i fiskevævet, identificeres og bestemmes kvantitativt, anbefales det at gøre det samme for nedbrydningsprodukter i testvandet.

Normalt skal koncentrationen af teststoffet bestemmes i hver enkelt fisk efter vejning. Er det ikke muligt, kan prøverne fra hver prøveudtagning pooles, men pooling indskrænker mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis en bestemt statistisk metode og styrke er vigtige hensyn, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange fisk til, at den ønskede pooling og styrke tilgodeses⁶⁷⁾.

BCF udtrykkes både som funktion af samlet våd vægt og - for stærkt lipofile stoffer - som funktion af fedtindholdet. Fiskenes fedtindhold bestemmes om muligt ved hver prøveudtagning. Bestemmelsen af fedtindholdet skal bestemmes ved hjælp af egnede metoder (ref. 8 og ref. 2 i bilag 3). Som standardmetode kan ekstraktion med chloroform/methanol anbefales⁹⁾. Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier¹⁰⁾, er det vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet. Når det er muligt, skal lipidanalysen foretages på samme ekstrakt som er benyttet til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte må fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi. Forskellen mellem fiskenes fedtindhold (i mg pr. kg våd vægt) ved begyndelsen af eksperimentet og ved slutningen må ikke være større end $\pm 25\%$. Også vævets tørstofindhold skal oplyses, så lipidkoncentrationen kan omregnes fra våd basis til tørstofbasis.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Teststoffets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på fiskene (eller bestemt væv) under optagelsesfasen mod tiden (lineære akser). Hvis kurven viser et plateau, dvs. at den er omtrent parallel med tidsaksen, beregnes ligevægtsværdien BCF_{SS} ved hjælp af udtrykket

$$\frac{C_f \text{ i ligevægt (gennemsnit)}}{C_w \text{ i ligevægt (gennemsnit)}}$$

Hvis der ikke opnås ligevægt, kan der beregnes en BCF_{SS} -værdi, der er tilstrækkelig nøjagtig til risikovurderingsformål, ud fra en "stationær tilstand" ved 80% ($1,6/k_2$) eller 95% ($3,0/k_2$) af ligevægt.

Også biokoncentreringsfaktoren BCF_k beregnes som forholdet k_1/k_2 , de to førsteordens hastighedskonstanter. Hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) bestemmes normalt ud fra udskillelseskurven (dvs. en afbildning af faldet i teststoffets koncentration i fiskene mod tiden). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse (k_1) på grundlag af k_2 og en værdi af C_f , som udledes af optagelseskurven (se også bilag 5). Til at finde BCF_k og hastighedskonstanterne k_1 og k_2 foretrækkes ikke-lineære parameterestimeringsmetoder på computer¹¹⁾. Ellers kan der benyttes grafiske metoder til beregning af k_1 og k_2 . Hvis udskillelseskurven tydeligvis ikke er af første orden, må der tages mere komplekse modeller i brug (se referencerne i bilag 3) og søges biostatistisk bistand.

2.2 FORTOLKNING AF RESULTATER

Hvis der i prøveopløsninger måles koncentrationer nær analysemetodens påvisningsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed.

Skarpe optagelses- og udskillelseskurver er tegn på biokoncentreringsdata af høj kvalitet. Forskellen mellem optagelses- og udskillelseskonstanterne ved to testkoncentrationer bør være mindre end 20%. Hvis der iagttages signifikante forskelle i optagelses- og udskillelseskonstanter mellem de to anvendte testkoncentrationer, skal dette noteres og forsøges forklaret. Normalt ligger konfidensgrænserne for BCF -værdier i vel tilrettelagte undersøgelser omkring $\pm 20\%$.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1 TESTSTOF

- dets fysiske tilstandsform og relevante fysiske og kemiske egenskaber
- data til kemisk identifikation (herunder et eventuelt indhold af organisk kulstof)
- hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder.

3.2 TESTART

- dens videnskabelige navn, stamme, kilde, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse, mv.

3.3 TESTBETINGELSER

- testprocedure (f.eks. gennemstrømning eller semistatisk)
- belyningskildens art og karakteristika og belyningsperiodernes varighed

- testens tilrettelægning (f.eks. testkamrenes antal og størrelse, vandudskiftningsrate, antal gentagelser, antal fisk pr. gentagelse, antal testkoncentrationer, optagelses- og udskillelsesfasens længde samt udtagningshyppighed for fiske- og vandprøver)
- metode til fremstilling af stamopløsninger og fornyelseshyppighed (hvis der er benyttet et opløsende stof, oplyses dets koncentration og dets bidrag til testvandets indhold af organisk kulstof)
- de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testkarrene samt, hvilken metode der er benyttet til bestemmelsen
- kilde til fortyndingsvand, beskrivelse af en eventuel forbehandling, resultater af forsøg til bekræftelse af, at fisk kan leve i vandet, samt vandets parametre: pH, hårdhed, temperatur, koncentration af opløst oxygen, restchlorindhold (hvis bestemt), organisk kulstof i alt, opslæmmet tørstof, testmediets saltholdighed (hvis relevant) samt alle andre foretagne målinger
- kvaliteten af vandet i testkarrene, pH, hårdhed, TOC, temperatur og koncentration af opløst oxygen
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type, kilde og sammensætning (i hvert fald fedt- og proteinindhold) samt fodermængde og fodringshyppighed)
- oplysninger om, hvordan fiske- og vandprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststof og fedtindhold (hvis bestemt).

3.4 RESULTATER

- resultater af eventuelle indledende undersøgelser
- dødelighed for kontrolfiskene og fiskene i de enkelte testkamre samt eventuelt iagttaget unormal adfærd
- fiskenes fedtindhold (hvis bestemt i forbindelse med testen)
- kurver (og alle måledata), der viser optagelse og udskillelse af teststoffet i fiskene, samt tiden til ligevægt
- C_f og C_w (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) for alle udtagne prøver (C_f anføres i μg pr. g våd vægt (ppm), enten legemsvægt eller vægt af et bestemt væv, f.eks. fedtvæv, og C_w i $\mu\text{g/ml}$ (ppm)); C_w -værdier for kontrolgruppen (også baggrundsværdier oplyses)
- ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{ss}) og/eller den kinetiske koncentreringsfaktor (BCF_k) og i relevante tilfælde 95% konfidensgrænser for hastighedskonstanter for optagelse og udskillelse (alle udtrykt i forhold til fiskenes legemsvægt eller fiskenes eller de specificerede vævs fedtindhold), konfidensgrænser og standardafvigelse (hvis de foreligger) samt beregnings- og dataanalysemetoder for hver koncentration af teststof
- hvis der er benyttet radioaktivt mærkede stoffer, kan en eventuel akkumulering af påviste metabolitter anføres, hvis det er påkrævet
- alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger.

Resultater som "ikke påvist ved påvisningsgrænsen" bør ved forudgående metodeudvikling og god tilrettelæggelse af forsøget være indskrænket til et minimum, da sådanne resultater ikke kan benyttes til beregning af hastighedskonstanter.

- 1) **Connell D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp 117-156.
- 2) **Bintein S., Devillers J. and Karcher W.** (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, 29-390.
- 3) **OECD**, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) **US EPA 822-R-94-002** (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA**, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan H.** (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.
- 9) **Gardner et al**, (1995) *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099-1105.
- 10) **Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J.** (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, pp 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84** (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs

BILAG 1

KEMISKE EGENSKABER AF ACCEPTABELT VAND TIL FORTYNDING

	STOF	KONCENTRATIONSGRÆNSE
1	Partikler	5 mg/l
2	Organisk kulstof i alt	2 mg/l
3	Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
4	Restchlor	10 µg/l
5	Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
6	Organochlorpesticider i alt plus polychlorede biphenyler	50 ng/l
7	Organisk chlor i alt	25 ng/l
8	Aluminium	1µg/l
9	Arsen	1µg/l
10	Chrom	1µg/l
11	Cobalt	1µg/l
12	Kobber	1µg/l
13	Jern	1µg/l
14	Bly	1µg/l
15	Nikkel	1µg/l
16	Zink	1µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Kviksølv	100 ng/l
19	Sølv	100 ng/l

BILAG 2

ANBEFALEDE TESTFISKEARTER

	Anbefalet art	Anbefalet testtemperaturinterval (°C)	Anbefalet størrelse af testfisk (længde i cm)
1	Danio rerio ¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpe	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Japansk risfisk	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque)	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbueørred	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Trepigget hundestejle	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

I forskellige lande benyttes der en række brakvands- og saltvandsarter, f.eks.

Trommefisk	<u><i>Leiostomus xanthurus</i></u>
"Sheepshead minnow"	<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u>
Stribefisk	<u><i>Menidia beryllina</i></u>
"Shiner perch"	<u><i>Cymatogaster aggregata</i></u>
"English sole"	<u><i>Parophrys vetulus</i></u>
"Staghorn sculpin"	<u><i>Leptocottus armatus</i></u>
Trepigget hundestejle	<u><i>Gasterosteus aculeatus</i></u>
Havaborre	<u><i>Dicentracus labrax</i></u>
Løje	<u><i>Alburnus alburnus</i></u>

SAMLING

De i ovenstående tabel opregnede ferskvandsfisk er lette at opdrætte og/eller fremskaffe hele året, mens saltvands- og brakvandsarterne til dels kun findes i bestemte lande. De kan opdrættes enten i fiskefarme eller i laboratoriet under kontrollerede forhold med hensyn til sygdomme og parasitter, så testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk kan fås over det meste af verden.

BILAG 3

FORUDSIGELSE AF LÆNGDEN AF OPTAGELSESFASEN OG UDSKILLELSESFASEN

1. Forudsigelse af optagelsesfasens længde

Før testen udføres, kan man ud fra en empirisk sammenhæng mellem k_2 og n-octanol/vand fordelingskoefficienten (P_{ow}) eller k_2 og opløseligheden i vand (s) foretage et skøn over k_2 og dermed en procentdel af den tid, der vil være påkrævet til at nå ligevægt.

Eksempelvis kan k_2 (dag^{-1}) skønnes ved hjælp af følgende empiriske udtryk¹⁾:

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2=0,95) \quad [\text{ligning 1}]$$

Andre udtryk, se ref. 2.

Hvis fordelingskoefficienten ikke er kendt, kan denne skønnes³⁾ ud fra stoffets opløselighed i vand (s) ifølge udtrykket:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad [\text{ligning 2}]$$

hvor s = opløseligheden (mol/l) : (n=36)

Disse sammenhænge gælder kun for stoffer med $\log P_{ow}$ -værdier mellem 2 og 6,5⁴⁾.

Den tid, der går til en bestemt procent af ligevægt, kan beregnes ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskilteskinetikken (førsteordenskinetik) ved at anvende k_2 -skønnet:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

eller hvis C_w er konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{ligning 3}]$$

Når der er næsten ligevægt ($t \rightarrow \infty$), kan ligning 3 reduceres til⁵⁾⁶⁾:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{eller} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

Da er $k_1 / k_2 \cdot C_w$ en tilnærmelse til koncentrationen i fiskene ved "ligevægt" ($C_{f,s}$).

Ligning 3 kan omskrives til:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{eller} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{ligning 4}]$$

Ved at anvende ligning 4 kan man forudsige, hvor lang tid der går indtil en vis procent af ligevægt er nået, når k_2 allerede er skønnet ved hjælp af ligning 1 eller 2.

Som rettesnor kan anføres, at den statistisk optimale længde af optagelsesfasen, når der ønskes statistisk acceptable data (BCF_k), er den tid, der går, indtil kurven over logaritmen til koncentrationen af teststoffet i fiskene mod tiden har nået sit midtpunkt, dvs. ved $1,6/k_2$ svarende til 80% ligevægt, men ikke over $3,0/k_2$ svarende til 95% ligevægt⁷⁾.

Den tid, der går indtil 80% ligevægt, er (ligning 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{eller} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{ligning 5}]$$

Tilsvarende for 95% ligevægt: $t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$ [ligning 6]

For eksempel vil optagelsesfasens længde (up) for et teststof med $\log P_{ow} = 4$ være (ligning 1, 5 og 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ dag}^{-1}$$

$$\text{up (80 pct)} = 1,6/0,652, \text{ dvs. 2,45 dage (59 timer)}$$

$$\text{eller up (95 pct)} = 3,0/0,652, \text{ dvs. 4,60 dage (110 timer)}$$

Tilsvarende vil optagelsestiden for et teststof med $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log s = -5,0$) være (ligning 1, 2, 5 og 6):

$$\log_{10} P_{ow} = -0,862 \cdot (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ dag}^{-1}$$

$$\text{up (80 pct)} = 1,6/0,246, \text{ dvs. 6,5 dage (156 timer)}$$

$$\text{eller up (95 pct)} = 3,0/0,246, \text{ dvs. 12,2 dage (293 timer)}$$

Alternativt kan udtrykket:

$$t_{eq} = 6,54 \cdot 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (timer)}$$

benyttes til beregning af, hvor lang tid der går til faktisk ligevægt⁴⁾.

2. Forudsigelse af udskillelsesfasens længde

Ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik), kan man ligeledes forudsige, hvor lang tid der kræves for, at legemsbelastningen falder til en vis procentdel af begyndelseskoncentrationen¹⁾⁸⁾.

I udskillelsesfasen antages C_w at være nul. Udtrykket kan da reduceres til:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{eller} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

hvor $C_{f,0}$ er koncentrationen ved udskillelsesperiodens begyndelse. 50% udskillelse vil da være nået til tidspunktet (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{eller} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Tilsvarende vil 95% udskillelse være nået ved:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Hvis der i den første periode benyttes 80% optagelse ($1,6/k_2$), og der i udskillelsesfasen benyttes 95% tab ($3,0/k_2$), bliver udskillelsesfasen omtrent dobbelt så lang som optagelsesfasen.

Det er vigtigt at bemærke, at skønnene er baseret på antagelsen om førsteordenskinetik for optagelse og udskillelse. Er denne forudsætning tydeligvis ikke opfyldt, må der tages mere komplekse modeller i brug (f.eks. ref. 1).

LITTERATUR (til bilag 3)

- 1) **Spacie** A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, pp 309-320.
- 2) **Kristensen** P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Vandkvalitetsinstituttet, Danmark.
- 3) **Chiou** C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), pp 4-10.
- 4) **Hawker** D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), pp 701-707.
- 5) **Branson** D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, **104** (4), pp 785-792.
- 6) **Ernst** W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. (red.) Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly** P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* **55**, pp 614-622.
- 8) **Könemann** H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, pp 3-19.

BILAG 4

TEORETISK EKSEMPEL PÅ PRØVEUDTAGNINGSPÅN FOR BIOKONCENTRERINGSTEST

AF STOFFER MED $\log P_{ow} = 4$

Fiskeprøve	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal vand-prøver	Antal fisk pr. prøve
	Mindste hyppighed (dage)	Supplerende prøve		
Optagelsesfasen	-1 0		2* 2	Tilførsel af 45-80 fisk
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Udskillelsesfasen				Fiskene overføres til vand uden teststof
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

* Der udtages vandprøve efter aftapning af mindst 3 kammerrumfang vand.

Tallene i parentes angiver, hvor mange prøver (vand, fisk) der skal udtages, hvis der foretages supplerende prøveudtagning.

Anmærkning: Forud for testen er k_2 for en $\log P_{ow}$ på 4,0 skønnet til $0,652 \text{ dag}^{-1}$. Forsøgets samlede varighed sættes til

$3 \times \text{up} = 3 \cdot 4,6 \text{ dage}$, dvs. 14 dage. For skøn af 'up' henvises der til bilag 3.

BILAG 5

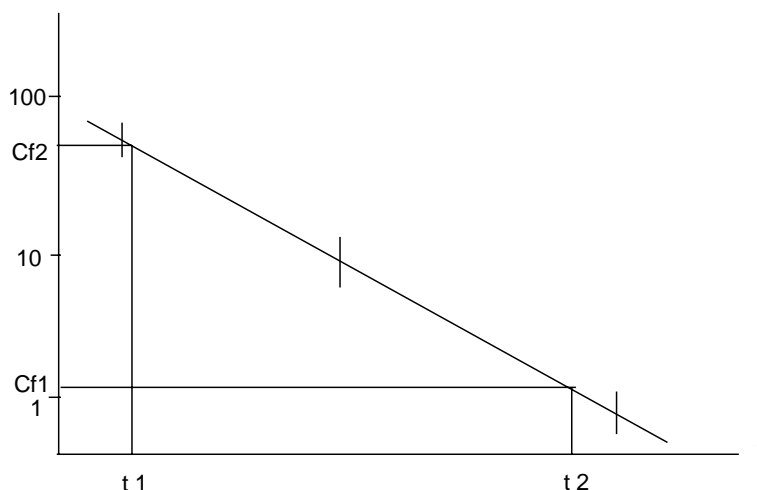
MODELVALG

De fleste biokoncentreringsdata antages at kunne beskrives "rimelig" godt ved en simpel model med to dele ("compartments") og to parametre, hvilket fremgår af den bedste retlignede kurve gennem punkterne for koncentrationen i fisk under udskillelsesfasen, når de afsættes på semilogaritmisk papir. (Hvis punkterne ikke kan beskrives ved en ret linje, må der benyttes mere komplekse modeller, se f.eks. Spacie og Hamelinck, ref. 1 til bilag 3).

GRAFISK METODE TIL BESTEMMELSE AF HASTIGHEDSKONSTANTEN FOR UDSKILLELSE, k_2

Koncentrationen af teststoffet i hver fiskeprøve afbildes mod tiden på semilogaritmisk papir. Linjen har hældningen k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Det skal bemærkes, at afvigelser fra en ret linje kan tyde på, at udskillelsens kinetik er mere kompleks end første orden. Der kan benyttes en grafisk metode til løsning af udskillelse, der ikke har af førsteordens kinetik.

GRAFISK METODE TIL BESTEMMELSE AF HASTIGHEDSKONSTANTEN FOR OPTAGELSE, k_1

På grundlag af K_2 beregnes k_1 efter udtrykket

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{ligning 1}]$$

Værdien af C_f aflæses ved midtpunktet af den glatte optagelseskurve fra afbildningen af logaritmen til koncentrationen mod tiden (lineært).

COMPUTERMETODE TIL BESTEMMELSE AF HASTIGHEDSKONSTANTERNE FOR OPTAGELSE OG UDSKILLELSE

Til bestemmelse af biokoncentreringsfaktoren og hastighedskonstanterne k_1 og k_2 foretrækkes det, at der benyttes ikke-lineære estimeringsmetoder på computer. Sådanne programmer finder værdier for k_1 og k_2 ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og følgende model:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ligning 2}]$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{ligning 3}]$$

hvor t_c er tidspunktet for afslutningen af optagelsesfasen.

Denne metode giver skøn over standardafvigelser for k_1 og k_2 .

Eftersom k_2 i de fleste tilfælde kan skønnes ud fra udskillelseskurven med forholdsvis stor præcision og der er en stærk korrelation mellem de to parametre k_1 og k_2 , hvis skønnet samtidigt, er det undertiden bedst først at beregne k_2 ud fra udskillelsesdataene alene og derefter at beregne k_1 ud fra optagelsesdataene ved hjælp af ikke-lineær regression.

C.14. VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL

1. METODE

Denne væksttoksicitets-testmetode svarer til OECD TG 215 (2000).

1.1 INTRODUKTION

Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på væksten hos fiskeyngel, som gennem længere tid eksponeres for kemikalier. Testen er baseret på en metode, som er udviklet og ring-testet (1)(2) inden for den Europæiske Union med henblik på at vurdere virkningerne af kemikalier på væksten hos yngel af regnbueørred (*Oncorhynchus mykiss*) under gennemstrømningsbetingelser. Andre veldokumenterede arter kan anvendes. For eksempel har man erfaring fra væksttests med zebrafisk (*Danio rerio*)¹ (3)(4) og riskarpe (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Der henvises også til den generelle indledning til del C.

1.2 DEFINITIONER

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant virkning ($p < 0,05$) i sammenligning med en kontrolgruppe. Dog skal alle testkoncentrationer over LOEC have en skadevirkning, som er lig med eller større end de virkninger, der er observeret ved LOEC.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

EC_x er ved denne testmetode den koncentration af testkemikaliet, som forårsager en variation i fiskenes tilvækst på x % i sammenligning med kontrolgrupperne.

Belastningsgraden er fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

Bestandtætheden er antallet af fisk pr. vandvolumen.

Enkeltfisk-specifik tilvækst er et udtryk for en enkelt fisks tilvækst på grundlag af fiskens startvægt.

Beholdergennemsnits-specifik tilvækst er et udtryk for den gennemsnitlige tilvækst for en beholderpopulation ved én koncentration.

Pseudo-specifik tilvækst er et udtryk for den enkelte fisks tilvækst i sammenligning med beholderpopulationens gennemsnitlige startvægt.

¹ Meyer, A., Bierman, C.H. og Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. **252**, 231-236.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Fiskeyngel i den eksponentielle væksthase vejes og anbringes derefter i testbeholdere og eksponeres for en række subletale koncentrationer af testkemikaliets opløst i vand, fortrinsvis ved gennemstrømning eller, hvis dette ikke er muligt, under passende semistatiske betingelser (statisk-udskiftning). Testens varighed er 28 dage. Fiskene fodres dagligt. Foderrationen baseres på fiskenes startvægt og kan genberegnes efter 14 dage. Ved testens afslutning vejes fiskene igen. Virkningerne på tilvæksten analyseres ved anvendelse af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en variation i tilvæksten på x %, dvs. EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{20} , or EC_{30}). Alternativt kan dataene sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og derudfra koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).

1.4 INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

Der bør foreligge resultater fra en akut-toksicitetstest (se testmetode C. 1.), fortrinsvis udført på den art, som er valgt til denne test. Dette indebærer, at testkemikaliets vandopløselighed og damptryk er kendt, og at der foreligger en pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliets i testopløsningerne med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.

Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a , P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C. 4).

1.5 TESTENS VALIDITET

Testens validitet forudsætter følgende:

- mortaliteten i kontrolgruppen/-erne må ikke overstige 10 % ved testens afslutning;
- den gennemsnitlige vægt af fiskene i kontrolgruppen/-erne skal være øget tilstrækkeligt til, at detektion af den minimale variation i tilvæksten kan betragtes som signifikant. En ring-test (2) har vist, at for regnbueørreders vedkommende skal gennemsnitsvægten for fiskene i kontrolgrupperne i løbet af 28 dage være øget med mindst det halve (dvs. 50 %) af deres gennemsnitlige startvægt; f.eks. startvægt: 1 g/fisk (= 100 %), slutvægt efter 28 dage: $\geq 1,5$ g/fisk (≥ 150 %);
- koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af værdien for luftmætning (ASV);
- vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i løbet af testen variere med mere end ± 1 °C mellem testbeholderne og skal holdes inden for 2 °C omkring de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (bilag 1).


1.6 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1 Apparatur

Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

- a) ilt- og pH-måleudstyr;
- b) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet;
- c) egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning;
- d) beholdere fremstillet af et kemisk inaktivt materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se afsnit 1.8.5 og bilag 1);
- e) vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0.5 %).

1.6.2 Vand

 testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende tidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5 men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på $\pm 0,5$ pH-enheder. En hårdhedsgrad på over 140 mg/l (som CaCO_3) anbefales. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikalien), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede tørstof skal foretages, f.eks. hver 3. måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant gennem mindst ét år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med længere intervaller (f.eks. hver 6. måned). I bilag 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

1.6.3 Testopløsninger

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikalien i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Mætningssøjler (opløselighedssøjler) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen.

Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløselighedsfremmere) kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid og triethylenglycol. Eksempler på egnede dispergeringsmidler er Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Man skal udvise forsigtighed ved anvendelse af stoffer, der er umiddelbart biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller meget flygtige, idet de ved gennemstrømningstests kan give anledning til problemer med bakteriebelægninger. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må dette ikke have nogen signifikant virkning på fiskenes vækst eller synlig negativ virkning på fiskekeyngelen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

Til gennemstrømningstests kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliets (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En ring-test (2) har vist, at en vandudskiftningshyppighed på 6 l pr. g fisk pr. døgn i løbet af testen er passende for regnbueørreds vedkommende (se afsnit 1.8.2.2).

Til semistatiske (udskiftnings-) tests vil medieudskiftningshyppigheden være afhængig af testkemikaliets stabilitet; men det anbefales at udskifte vandet hver dag. Hvis det på baggrund af præliminære stabilitetstests (se afsnit 1.4) har vist sig, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. ligger uden for området på 80-120 % af den nominelle værdi, eller under 80 % af den målte startkoncentration) i udskiftningsrumsrummet, bør man overveje at anvende en gennemstrømningstest.

1.6.4 **Valg af fiskeart**

Regnbueørred (*Oncorhynchus mykiss*) er den anbefalede art til denne test, idet man har mest erfaring fra ring-tests med denne art (1)(2). Andre veldokumenterede arter kan dog anvendes; men testproceduren må eventuelt tilpasses, så man opnår de bedst egnede testbetingelser. For eksempel har man også erfaring med zebrafisk (*Danio rerio*) (3)(4) og riskarpe (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7). En begrundelse for valget af art og testmetode skal i så fald anføres.

1.6.5 **Opbevaring af fiskene**

Testfiskene skal udvælges fra en population af en enkelt bestand, fortrinsvis fra samme gydning, som i mindst to uger forud for testen holdes under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Fiskene skal fodres med en minimumsration på 2 % af kropsvægten pr. dag, og fortrinsvis 4 % af kropsvægten pr. dag, gennem hele opbevaringsperioden og under testen.

Efter en akklimatiseringsperiode på 48 timer registreres mortaliteten, og følgende kriterier bringes i anvendelse:

- mortalitet på mere end 10 % af populationen på 7 dage: hele fiskegruppen kasseres;
- mortalitet på mellem 5 % og 10 % af populationen: akklimatisering i yderligere 7 dage, og hvis mortaliteten er over 5 % i løbet af de følgende 7 dage, kasseres hele fiskegruppen;
- mortalitet på mindre end 5 % af populationen på 7 dage: fiskegruppen godkendes.

I de to uger forud for testen eller under testen bør fiskene ikke behandles for sygdomme.

1.7 TESTDESIGN

“Testdesignet” vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal beholdere med hvert koncentrationsniveau samt antal fisk pr. beholder. Optimalt bør testedesignet vælges under hensyntagen til:

- a) undersøgelsens formål;
- b) den anvendte statistiske analysemetode;
- c) forsøgsressourcernes tilgængelighed og pris.

Beskrivelsen af formålet bør, om muligt, angive den statistiske opløsningsgrad, ved hvilken en given forskelsstørrelse (f.eks. i tilvækst) skal detekteres, eller alternativt den nøjagtighed, hvormed EC_x (f.eks. hvor $x = 10, 20$ eller 30 , og fortrinsvis ikke mindre end 10) skal beregnes. Dette er en forudsætning for, at undersøgelsens omfang kan fastlægges med sikkerhed.

Det er vigtigt at forstå, at et design, som er optimalt (giver den bedste udnyttelse af ressourcerne) til brug i forbindelse med én statistisk analysemetode, ikke nødvendigvis er optimalt ved en anden metode. Det design, der anbefales til vurdering af LOEC/NOEC, vil derfor ikke være det samme som det, der anbefales til brug ved regressionsanalyse.

I de fleste tilfælde foretrækkes regressionsanalyse frem for variansanalyse, af årsager, som Stephan og Rogers (8) har gjort rede for. Hvor der imidlertid ikke foreligger nogen egnet regressionsmodel, bør ($r^2 < 0,9$) NOEC/LOEC anvendes.

1.7.1 Design for regressionsanalyse

Følgende punkter er vigtige at tage i betragtning, når en test skal designes til regressionsanalyse:

- a) Testen må nødvendigvis omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{10,20,30}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer vil være mest nøjagtig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. En præliminær test til bestemmelse af dette område kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende.
- b) For at man skal kunne opstille en fyldestgørende statistisk model, skal testen omfatte mindst én kontrolbeholder og 5 yderligere beholdere med forskellige koncentrationer. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, og hvor det er aktuelt, bør der i tillæg til testrækken udføres en test på én kontrolbeholder indeholdende opløselighedsfremmeren i den højeste testkoncentration (se afsnit 1.8.3 og 1.8.4).
- c) En passende geometrisk eller logaritmisk progression (9) (se bilag 3) kan anvendes. Logaritmiske progressioner mellem testkoncentrationerne er at foretrække.
- d) Hvis man har mere end 6 beholdere til rådighed, bør de ekstra beholdere enten anvendes til replikation eller fordeles inden for koncentrationsområdet, så der bliver mulighed for mindre intervaller mellem niveauerne. Disse to muligheder er lige ønskelige.

1.7.2 **Design for vurdering af NOEC/LOEC ved anvendelse af variansanalyse (ANOVA)**

Fortrinsvis bør der være replikatbeholdere for hver enkelt koncentration, og statistiske analyser bør foretages på beholderniveau (10). Hvis man ikke har replikat-beholdere, kan man ikke tage højde for variabiliteten mellem beholdere ud over, hvad der må tilskrives enkeltfisk. Man har imidlertid erfaret (11), at variabiliteten mellem beholdere har været meget lille i sammenligning med variabiliteten inden for beholderen (dvs. mellem enkeltfisk) i det undersøgte tilfælde. Det er derfor et relativt acceptabelt alternativ at udføre statistisk analyse på enkeltfisk-niveau.

Normalt anvendes mindst 5 testkoncentrationer i en geometrisk progression med en faktor, som ikke overstiger 3,2.

Når testene udføres med replikat-beholdere, bør antallet af replikat-kontrolbeholdere, og dermed antallet af fisk, almindeligvis være det dobbelte for hver af testkoncentrationerne, som bør omfatte samme antal (12)(13)(14). Hvis man derimod ikke har replikat-beholdere, bør der være lige så mange fisk i kontrolgruppen som i hver af testkoncentrationerne.

Hvis ANOVA skal baseres på beholdere i stedet for enkeltfisk (hvilket vil indebære enten, at hver enkelt fisk skal mærkes, eller anvendelse af "pseudo"-specifik tilvækst (se afsnit 2.1.2)), vil det være nødvendigt med tilstrækkeligt mange replikat-beholdere til, at standardafvigelsen for "beholdere inden for koncentrationerne" kan bestemmes. Dette betyder, at fejlfrihedsgraden i variansanalysen bør være mindst 5 (10). Hvis kun kontrolgrupperne replikeres, vil der være en risiko for skævhed i fejlvariabiliteten, idet denne kan stige, når middelværdien for den pågældende tilvækst stiger. Eftersom det er sandsynligt, at tilvæksten vil falde, når koncentrationen øges, vil dette give en tilbøjelighed til overvurdering af variabiliteten.

1.8 **FREMGANGSMÅDE**

1.8.1 **Udvælgelse og vejning af testfisk**

Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved testens begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i bilag 1. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for individuel vægt ved testens begyndelse ideelt bør holdes inden for ± 10 % af gennemsnitsvægten og må under ingen omstændigheder overstige 25 %. Det anbefales at veje en delprøve af fisk inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Stampopulationen bør ikke fodres i 24 timer forud for testens begyndelse. Derpå bør fiskene vælges tilfældigt. Ved anvendelse af et totalbedøvende middel (f.eks. en vandig opløsning af 100 mg/l tricainmethansulfonat (MS 222) neutraliseret ved tilsætning af 2 dele natriumbicarbonat pr. del MS 222) bør fiskene vejes enkeltvis som vådvægt (duppes tørre) med den nøjagtighed, som er anført i bilag 1. De fisk, hvis vægt ligger inden for det ønskede område, tages fra og fordeles derpå tilfældigt mellem testbeholderne. Den samlede vådvægt af fisk i hver testbeholder registreres. Både anvendelsen af bedøvelsesmidlet og håndteringen af fiskene (herunder aftørring og vejning) kan give anledning til stress og beskadigelser af fiskeyngelen, i særdeleshed hvor det drejer sig om de arter, der er små af størrelse. Derfor skal håndteringen af fiskeyngelen foretages med den yderste forsigtighed for at undgå at stress og beskadige testfiskene.

Fiskene vejes igen på testens 28. dag (se afsnit 1.8.6). Hvis det imidlertid skønnes nødvendigt at genberegne foderrationen, kan fiskene vejes igen på testens 14. dag (se afsnit 1.8.2.3). Andre metoder, som f.eks. en fotografisk metode, vil kunne anvendes for at bestemme ændringer i fiskenes størrelse, og foderrationerne vil så kunne justeres ud fra dette.

1.8.2 **Eksponeringsbetingelser**

1.8.2.1 *Varighed*

Testens varighed er ≥ 28 dage.

1.8.2.2 *Belastningsgrad og bestandtæthed*

Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se bilag 1). Hvis bestandtætheden er for stor, vil der opstå stress på grund af trængsel, hvilket vil føre til reduceret tilvækst og øget risiko for sygdomme. Hvis bestandtætheden er for lav, kan det medføre territorialadfærd, hvilket også vil kunne indvirke på væksten. Under alle omstændigheder skal belastningsgraden være så lav, at der kan opretholdes en koncentration af opløst ilt på mindst 60 % ASV uden beluftning. For regnbueørreders vedkommende har man ved en ring-test (2) påvist, at en belastningsgrad på 16 ørreder à 3-5 g i et volumen på 40 liter er acceptabel. Den anbefalede hyppighed for udskiftning af vandet under testen er 6 l pr. g fisk pr. dag.

1.8.2.3 *Fodring*

Fiskene skal fodres med et passende foder (bilag 1) og tilstrækkeligt ofte til at frembringe en acceptabel tilvækst. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. For regnbueørreders vedkommende vil en fodertilførsel på 4% af kropsvægten pr. dag som regel opfylde disse betingelser (2)(15)(16)(17). Den daglige foderration kan deles i to lige store portioner, som gives fiskene ved to daglige fodringer med mindst 5 timers mellemrum. Rationen baseres på fiskenes samlede startvægt i hver enkelt testbeholder. Hvis fiskene vejes igen på testens 14. dag, genberegnes rationen ud fra denne vægt. Fiskene bør ikke fodres i 24 timer inden vejningen.

Foderrester og fækal materiale skal hver dag fjernes fra testbeholderne ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af opsugning.

1.8.2.4 *Lys og temperatur*

Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (bilag 1).

1.8.3 **Testkoncentrationer**

Normalt kræves, uanset testens design, 5 koncentrationer af testkemikaliet (se afsnit 1.7.2). Forudgående kendskab til testkemikaliets toksicitet (f.eks. fra akut-testning og/eller fra "range finding tests") vil være nyttigt ved udvælgelsen af passende testkoncentrationer. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end 5 koncentrationer. Den højeste testkoncentration må ikke overstige kemikaliets opløselighedsgrænse i vand.

Når der anvendes en opløselighedsfremmer som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, må dens slutkoncentration ikke være højere end 0,1 ml/l og bør fortrinsvis være den samme i alle testbeholdere (se afsnit 1.6.3). Anvendelse af sådanne stoffer skal imidlertid så vidt muligt undgås.

1.8.4 **Kontrolprøver**

Antallet af fortyndingsvand-kontrolprøver afhænger af testens design (se afsnit 1.7-1.7.2). Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer, skal der desuden foretages det samme antal opløselighedsfremmer-kontrolprøver som fortyndingsvand-kontrolprøver.

1.8.5 **Hypighed af analyser og målinger**

Under testen måles koncentrationerne af testkemikaliets med regelmæssige mellemrum (se nedenfor).

Ved gennemstrømningstests skal strømningshastighederne for fortyndingsmidlet og giftstof-stamopløsningen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og de må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Hvis testkemikaliets koncentrationer forventes at ligge inden for ± 20 % af de nominelle værdier (dvs. inden for området fra 80 til 120 % - se afsnit 1.6.2 og 1.6.3), anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres ved testens begyndelse og hver uge derefter. Ved tests, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier (baseret på oplysninger om testkemikaliets stabilitet), vil det være nødvendigt at analysere samtlige testkoncentrationer, men efter samme retningslinier.

Ved semistatistiske (udskiftnings-) tests, hvor testkemikaliets koncentration forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet, og umiddelbart inden udskiftning, ved undersøgelsens begyndelse og hver uge derefter. Ved tests, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, skal samtlige testkoncentrationer analyseres efter samme retningslinier som for mere stabile kemikalier.

Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan påvises, at testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier eller den målte startkoncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på de nominelle eller de målte værdier.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Det anbefales at centrifugere prøverne; men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.

Under testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i samtlige testbeholdere. Samlet hårdhedsgrad, alkalinitet og saltindhold (hvis dette er aktuelt) skal måles i kontrolbeholderne og i én beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis aktuelt) måles 3 gange (ved testens begyndelse, midte og afslutning). Ved semistatistiske tests anbefales, at opløst ilt måles hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst én gang om ugen. pH skal måles ved begyndelsen og afslutningen af hver vandudskiftning ved statiske udskiftnings-tests og mindst én gang ugentligt ved gennemstrømningstests. Hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles én gang i hver test. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst én testbeholder.

1.8.6 Observationer

Vægt: Ved testens afslutning skal samtlige overlevende fisk vejes som vådvægt (dubbes tørre), enten gruppevis pr. testbeholder eller enkeltvis. Vejning af fisk pr. testbeholder foretrækkes frem for individuel vejning, som kræver, at hver enkelt fisk skal mærkes. Hvis fiskene skal vejes enkeltvis med henblik på bestemmelse af enkeltfisk-specifik tilvækst, skal man vælge en mærkningsmåde, som undgår at stresse fiskene (der er egnede alternativer til frysemærkning, f.eks. anvendelse af tynd farvet fiskesnøre).

Fiskene skal i løbet af testperioden undersøges dagligt for eventuelle ydre abnormiteter (såsom blødninger eller misfarvning), og unormal adfærd registreres. Eventuelle mortaliteter skal registreres, og døde fisk skal fjernes hurtigst muligt. Døde fisk erstattes ikke, idet belastningsgraden og bestandtætheden er tilstrækkelige til, at indvirkninger på væksten som følge af ændringer i fiskeantallet pr. beholder undgås. Fodermængden skal imidlertid justeres.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AF RESULTATERNE

Det anbefales, at en statistiker inddrages i både design og analyse af testen, eftersom denne testmetode tillader betydelige variationer i forsøgets design, som f.eks. antal testbeholdere, antal testkoncentrationer, antal fisk osv. I betragtning af valgmulighederne med hensyn til testens design vil der ikke blive givet nogen vejledning i statistiske procedurer her.

Tilvæksten bør ikke beregnes for testbeholdere, hvor mortaliteten overstiger 10 %. Mortalitetsprocenten skal imidlertid anføres for samtlige testkoncentrationers vedkommende.

Uanset hvilken metode, der anvendes til dataanalysen, er det centrale koncept den specifikke tilvækst r mellem tidspunktet t_1 og tidspunktet t_2 . Denne kan defineres på flere måder afhængigt af, hvorvidt fiskene er mærket individuelt, eller hvorvidt der ønskes et beholdergennemsnit.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\overline{\log_e w_2 - \log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

hvor:

r_1 = enkeltfisk-specifik tilvækst

r_2 = beholdergennemsnits-specifik tilvækst

r_3 = “pseudo”-specifik tilvækst

w_1, w_2 = en bestemt fisks vægt på henholdsvis tidspunkt t_1 og t_2

$\log_e w_1$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens begyndelse

$\log_e w_2$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens afslutning

$\overline{\log_e w_1}$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_1 for fiskene i beholderen ved testperiodens begyndelse

$\overline{\log_e w_2}$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_2 for fiskene i beholderen ved testperiodens afslutning

t_1, t_2 = tidspunktet (dag) for testperiodens begyndelse og afslutning

r_1, r_2, r_3 kan udregnes for tidsrummet mellem 0 og 28 dage og, hvor det er aktuelt (dvs. når der er foretaget måling på dag 14), for tidsrummene mellem 0 og 14 samt mellem 14 og 28 dage.

2.1.1 Resultatanalyse ved regression (koncentrationsrespons-model)

Denne analysemetode fører frem til en passende matematisk sammenhæng mellem den specifikke tilvækst og koncentrationen og gør det således muligt at beregne “EC_x”, dvs. en hvilken som helst ønsket EC-værdi. Ved anvendelse af denne metode er udregningen af r for enkeltfisk (r_1) ikke nødvendig, og analysen kan i stedet baseres på r -beholdergennemsnitsværdien (r_2). Sidstnævnte metode foretrækkes. Den er også mest hensigtsmæssig, hvor den mindste fiskeart bruges.

Den beholdergennemsnits-specifikke tilvækst (r_2) bør plottes grafisk som funktion af koncentrationen, for at forholdet mellem koncentration og respons kan undersøges.

Når forholdet mellem r_2 og koncentration skal vises, bør man vælge en passende model, og valget skal begrundes på hensigtsmæssig vis.

Hvis der ikke er lige mange overlevende fisk i de enkelte beholdere, bør modeltilpasnings-metoden vægtes, hvad enten denne er simpel eller nonlineær, for at tage højde for grupper af uens størrelse.

Modeltilpasnings-metoden skal give mulighed for, at en beregning af f.eks. EC₂₀ og dennes fordeling (enten standardfejl eller konfidensinterval) kan udledes. Grafen for den tilpassede model bør vises i forhold til dataene, så modeltilpasningens tilstrækkelighed tydeligt fremgår (8)(18)(19)(20).

2.1.2 Analyse af resultaterne for beregningen af LOEC

Hvis testen har omfattet replikation af samtlige beholdere ved samtlige koncentrationsniveauer, vil beregningen af LOEC kunne baseres på en variansanalyse (ANOVA) af den beholdergennemsnits-specifikke tilvækst (se afsnit 2.1), efterfulgt af en egnet metode (f.eks. Dunnett's eller Williams' test (12)(13)(14)(21)) til sammenligning af det gennemsnitlige r for hver enkelt koncentration med det gennemsnitlige r for kontrolgrupperne, for at identificere den laveste koncentration, ved hvilken denne forskel er signifikant på et sandsynlighedsniveau på 0,05. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt - ikke-normal fordeling (f.eks. Shapiro-Wilk's test) eller heterogen varians (Bartlett's test) - bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA.

Hvis testen ikke har omfattet replikation af beholdere ved hver enkelt koncentration, vil en ANOVA, der baseres på beholdere, være ikke-udslagsgivende eller umulig. I denne situation vil det være et acceptabelt kompromis at basere ANOVA på den "pseudo"-specifikke tilvækst r_3 for enkeltfisk.

Det gennemsnitlige r_3 for hver enkelt testkoncentration kan så sammenlignes med det gennemsnitlige r_3 for kontrolgrupperne. Derpå kan LOEC identificeres som tidligere beskrevet. Man må forstå, at denne metode hverken tager hensyn til eller yder beskyttelse mod variabilitet mellem beholdere, udover hvad der kan tilskrives variabiliteten mellem enkeltfisk. Erfaringerne har imidlertid vist (8), at variabilitet mellem beholdere har været meget lille sammenlignet med variabiliteten inden for de enkelte beholdere (dvs. mellem fisk). Hvis analysen ikke omfatter enkeltfisk, skal det med begrundelse anføres, hvilken metode der er benyttet til identifikation af ekstreme værdier.

2.2 TOLKNING AF RESULTATERNE

Resultaterne skal tolkes med forsigtighed, hvor den målte koncentration af giftstof i testopløsningerne ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, eller ved semistatistiske tests, hvor testkemikaliets koncentration i den nyligt fremstillede opløsning falder inden udskiftningen.

2.3 TESTRAPPORTEN

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.3.1 Testkemikaliets:

- fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber;
- kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og eventuelt analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets.

2.3.2 **Fiskeart(er), der indgår i testen:**

- videnskabeligt navn og eventuelt
- stamme, størrelse, leverandør, evt. forudgående behandling osv.

2.3.3 **Testbetingelser:**

- anvendt testprocedure (f.eks. semistatisk/udskiftning, gennemstrømning, belastning, bestandtæthed, osv.);
- test-design (f.eks. antal testbeholdere, testkoncentrationer og replikater, antal fisk pr. beholder);
- metode til fremstilling af stamopløsninger samt udskiftningshyppighed (eventuelt anvendt opløselighedsfremmer og dennes koncentration skal anføres);
- de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning;
- fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis målt) og samtlige andre udførte målinger;
- vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt;
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

2.3.4 **Resultater:**

- dokumentation for, at kontrolgrupperne opfylder validitetskriteriet for overlevelse, samt data vedrørende mortaliteten ved de enkelte testkoncentrationer;
- anvendte statistiske analyseteknikker, statistikker baseret på replikater eller fisk, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker;
- data i tabelform vedrørende fiskenes individuelle og gennemsnitlige vægt på dag 0, 14 (hvis aktuelt) og 28, værdier for beholdergennemsnits- eller pseudo-specifik tilvækst (alt efter hvad der er aktuelt) i tidsrummet fra dag 0 til 28 eller eventuelt 0-14 og 14-28;
- resultater af den statistiske analyse (dvs. regressionsanalyse eller ANOVA), fortrinsvis i tabelform og grafisk form, og LOEC ($p = 0,05$) og NOEC eller EC_x , eventuelt med standardfejl, alt efter hvad der er aktuelt;
- forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliets.

REFERENCER

- (1) Solbe J.F. de L.G. (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. og Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, pp. 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. og Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, pp. 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. og Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, pp. 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. og Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota, USA.
- (8) Stephan C.E. og Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R.C. Bahner og D.J. Hansen, red., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10.-12. december 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, pp. 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, pp. 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L. og Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, pp. 123-133.

- (16) Quinton, J. C. og Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology **37**, pp. 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Kap. IX i: Textbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- (18) Bruce, R.D. og Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. **11**, pp. 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. og McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, no. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA, USA.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics **28**, pp. 510-531.

BILAG 1

FISKEARTER ANBEFALET TIL TESTNING, OG EGNEDE TESTBETINGELSER

Arter	Anbefalet område for testtemperatur (°C)	Lysperiode (timer)	Anbefalet område for fiskenes startvægt (g)	Påkrævet målings- nøjagtighed	Belastningsgrad (g/l)	Bestandtæthed (pr. liter)	Foder	Testens varighed (dage)
Anbefalet art:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> regnbueørred	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	til nærmeste 100 mg	1,2 – 2,0	4	Mærkevare- tørfoder til laksefiskeyngel	≥ 28
Andre vel- dokumenterede arter:								
<i>Danio rerio</i> zebrafisk	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	til nærmeste 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Levende foder (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> riskarpe (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	til nærmeste 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Levende foder (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28

BILAG 2

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

STOF	KON- CENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Total organisk kulstof	< 2 mg/l
Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Total phosphorholdige organiske pesticider	< 50 ng/l
Total chlorholdige organiske pesticider plus polychlorede biphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

BILAG 3

LOGARITMISKE RÆKKER AF KONCENTRATIONER, DER ER EGNEDE TIL TOKSICITETSTESTS (9)

Søjle (antal koncentrationer mellem 100 og 10, eller mellem 10 og 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* En række bestående af 5 (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en søjle. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i søjle (x) findes i søjle (2x + 1). De anførte værdier kan repræsentere koncentrationer udtrykt i procent pr. volumen eller vægt (mg/l eller µg/l). Værdierne kan multipliceres eller divideres med en hvilken som helst potens af 10, alt efter hvad der er aktuelt. Søjle 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

C.15. FISK, KORTTIDS TOKSICITETS-TEST UDFØRT PÅ FISKE-EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL

1. METODE

Denne korttids toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 212 (1998)

1.1 INTRODUKTION

Denne korttids toksicitets-test udført på fiske-embryoner og blommesækkyngel er en korttids test, i hvilken det nybefrugtede æg er udsat for giftstof indtil slutningen af blommesæk-stadiet. Der skal ikke fodres i denne test og testen skal således afsluttes, medens yngelen stadig får sin næring fra blommesækken.

Testens formål er at finde letale og til en vis grad subletale virkninger af kemikalier på specielle stadier og arter. Denne test kunne skaffe nyttig viden, idet den kunne (a) danne en bro mellem letale og subletale tests, (b) blive anvendt som en screening-test enten for en test på alle tidlige livsstadier eller for en test for kronisk toksicitet og (c) bruges til at teste arter, hvor dyrkningsteknikkerne ikke er tilstrækkeligt gode til at dække overgangsperioden mellem endogen og eksogen fodring.

Man bør erindre sig, at kun tests, der omfatter alle stadier i fisks livscyklus, kan påregnes at give en præcis vurdering af kemikaliers kroniske toksicitet overfor fisk, og at enhver begrænsning i påvirkning inden for livsstadierne kan reducere følsomheden og således undervurdere den kroniske toksicitet. Man må derfor forvente, at testen på fiske-embryoner og blommesækkyngel har mindre følsomhed end en test, der omfatter alle tidlige livsstadier, specielt med hensyn til meget lipofile kemikalier ($\log P_{ow} > 4$) og til kemikalier med en særlig type toksisk virkning. Imidlertid må man forvente mindre forskelle i følsomhed mellem de to tests med hensyn til kemikalier, der har en ikke-specifik, narkotisk virkningsmåde (1).

Forud for offentliggørelsen af denne test udført på fiske-embryoner og blommesækkyngel havde man størst erfaring med anvendelsen af ferskvandsfisken *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae - almindeligt navn: zebrafisk). Mere detaljerede retningslinier for resultater med denne art er derfor anført i Bilag 1. Dette udelukker ikke brugen af andre arter, for hvilke der ligeledes foreligger erfaringer (1).

1.2 DEFINITIONER

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste kemikalie-koncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$), sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal forårsage skadelige virkninger på samme eller højere niveau end observeret ved LOEC.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er test-koncentrationen lige under LOEC.

1.3 TEST-PRINCIPPET

Fiske-embryoner og blommesækkyngel udsættes for en række koncentrationer af test-kemikaliet opløst i vand. Protokollen tillader valg mellem en semistatisk og en gennemstrømnings-procedure. Valget afhænger af test-kemikaliet natur. Testen begynder med, at man anbringer befrugtede æg i forsøgsbeholderne, og den slutter lige før blommesækken er blevet fuldstændig resorberet af en hvilkensomhelst af fiskelarverne i en hvilkensomhelst forsøgsbeholder eller før dødsfald indtræffer i kontrolbeholderne på grund af sult. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at fastslå den laveste koncentration med observeret effekt og ud derfra den koncentration, der ikke giver nogen virkning. Alternativt kan man analysere resultaterne ved hjælp af en regressionsmodel for at finde frem til den koncentration, der ville give en bestemt procentisk effekt (dvs. LC/EC_x, hvor x er en defineret procentisk virkning).

1.4 KENDSKAB TIL TEST-KEMIKALIET

Resultater fra en akut toksicitets-test (se Metode C.1), fortrinsvis udført på arten valgt til denne test, bør foreligge. De kan være nyttige med henblik på valg af passende område af test-koncentrationer i testen udført på tidlige livsstadier. Vandopløselighed, (inklusive opløseligheden i test-vandet) og test-kemikaliet damptryk bør kendes. En pålidelig analyse til kvantitering af kemikaliet i test-opløsningerne med kendt og publiceret *accuracy* og nederste målegrænse bør foreligge.

Informationer om test-kemikaliet, nyttige for test-betingelserne, inkluderer strukturformel, renhedsgrad, lysstabilitet, stabilitet under testens betingelser, pK_a, P_{ow} og resultater fra en test for spontan biologisk nedbrydelighed (Se Metode C.4).

1.5 TESTENS VALIDITET

En tests validitet forudsætter:

- den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og hvor relevant, i kar med rent opløsningsmiddel, skal være større end eller lig med grænserne definerede i Bilag 2 og 3;
- koncentrationen af opløst ilt skal være mellem 60 og 100 % af værdien for mætning med luft (ASV) i hele test-perioden;
- vandtemperaturen må ikke variere mere end $\pm 1,5$ °C imellem forsøgs- beholderne eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art. (Bilag 2 og 3).

1.6 BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.6.1 Forsøgsbeholderne

Enhver type glas eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Forsøgsbeholderne dimensioner skal være store nok til at klare kravene til belastningsraten (se sektion 1.7.1.2) Det anbefales at anbringe forsøgsbeholderne randomiseret. Et randomiseret design med grupper af forsøgsbeholdere, hvor samme behandling forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system, når der er systematiske virkninger i laboratoriet, som kan kontrolleres ved gruppering. I den påfølgende dataanalyse bør der tages hensyn til en eventuel gruppering. Forsøgsbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

1.6.2 **Valg af fiskeart**

Anbefalede fiskearter ses i tabel 1A. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre arter (eksempler ses i tabel 1 B), men test-proceduren må muligvis ændres for at opnå passende test-betingelser. Brug af andre arter og undersøgelsesmetode skal i så fald begrundes.

1.6.3 **Opbevaring af fisk til yngel**

Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210¹ og i referencerne (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4 **Håndtering af embryoner og fiskelarver**

Embryoner og fiskelarver kan, mens de udsættes for test-kemikaliet, opholde sig i mindre kar med netvægge eller i rør med net for enderne med disse mindre kar placerede i forsøgskarret, således at test-opløsningen kan flyde igennem. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karrene op og ned, dog altid med organismerne under overfladen; man kan også anvende et system med gennemskylning ved hjælp af overtryk. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning. Pasteurpipetter er anvendelige til at flytte embryoner og larver i de semistatiske tests i forbindelse med den daglige totale udskiftning af test-opløsningen (se paragraf 1.6.6).

I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i forsøgskarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes¹, idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne fisk fra beholdere (fra en sådan advarsel kan nok undtages mindre sarte arter, som fx karpen). Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde. Ved brug af den semistatiske teknik kan man anvende bægerglas eller lave beholdere, eventuelt, hvis nødvendigt, forsynet med et netværk løftet en smule op over bægerglassets bund. Hvis beholderne er store nok til at opfylde kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) kan overflytning af embryoner eller larver eventuelt undgås.

1.6.5 **Vand**

Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i bilag 4 og i hvilket fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse mindst lige så god som beskrevet i bilag 2 og 3. Kvaliteten må ikke ændre sig i løbet af test-perioden. pH skal holde sig inden for $\pm 0,5$ pH-enheder. For at sikre at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på test-resultaterne (fx ved at danne kompleks med test-kemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (fx Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), væsentlige kationer og anioner (fx Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), pesticider (fx totale organofosfor- og totale organochlorinopesticider) totalt organisk kulstof og opslemmede faste stoffer bør fx foretages hver 3. måned, hvis man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (fx hver 6. måned).

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

Test-opløsning

Test-opløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved opblanding eller oprystning af test-kemikaliet i opløsningsvandet ad mekanisk vej (fx omrøring og ultralydbehandling). *Saturation colums (solubility columns)* kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Videst muligt bør brugen af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler undgås; imidlertid kan den type stoffer være nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Som eksempler på anvendelige opløsningsmidler kan nævnes acetone, ethanol, methanol, dimethylformamide og triethyleneglycol. Som eksempel på en anvendelige dispergenser kan nævnes Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0.01 % og HCO-40. Stor omhu bør udvises, når man anvender stoffer, der er let biologisk nedbrydelige (fx acetone) og/eller let fordampelige, da de kan medføre problemer med bakterielle belægnings i gennemstrømnings-testene. Når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig uheldig virkning på de tidlige livsstadier, som det kan kontrolleres i en test med kun opløsningsmiddel. Alle anstrengelser bør imidlertid gøres for at undgå brugen af sådanne stoffer.

I den semistatistiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen; enten (i) fremstilles nye test-opløsninger i rene forsøgsbeholdere og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt inde i små volumina af den gamle opløsning til det nye forsøgsbeholdere, idet man undgår at udsætte dem for luft, eller (ii) test-organismerne bibeholdes i forsøgsbeholderne medens mindst tre fjerdedele af test-vandet udskiftes. Hvor hyppigt det skal gøres, afhænger af test-kemikaliet's stabilitet, men en daglig udskiftning anbefales. Hvis tidligere stabilitetsforsøg (se sektion 1.4) har vist at test-kemikaliet's koncentration ikke er stabil (dvs. falder udenfor 80 - 120% af de nominelle grænser eller under 80 % af den målte begyndelseskonzentration) i løbet af udskiftningsperioden, bør man overveje at anvende en test med gennemstrømning. Under alle omstændigheder skal man være omhyggelig med ikke at stresse larverne, når vandet fornyes.

Til gennemstrømnings-testene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med test-kemikaliet (fx peristaltpumper, *proportional diluter*, *saturator system*) for at yde en række forskellige koncentrationer til forsøgsbeholderne. Med mellemrum, fortrinsvis dagligt, kontrolleres flow-hastigheden fra stamopløsningen og vandfortyndingen, og de bør ikke variere mere end 10% i test-forløbet. En flow-hastighed svarende til voluminet af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (2).

FREMGANGSMÅDE

Nyttig viden om, hvad testen med fiske-embryoner og blommesækkyngel kan præstere, kan findes i litteraturen, og eksempler herpå kan findes i litteraturlisten (7)(8)(9).

Omstændigheder ved belastningen*Varighed*

Helst skal testen begynde mindre end 30 minutter efter befrugtningen. Embryonerne sænkes ned i test-opløsningen, før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig og i hvert fald før begyndelsen af gastrula-stadiet. Med æg, der leveres udefra, kan man ikke altid begynde testen umiddelbart efter befrugtningen. Da testens følsomhed kan blive alvorligt påvirket af en forsinket test-start, bør testen påbegyndes senest 8 timer efter befrugtningen. Da fiskelarverne ikke fodres i test-perioden, afsluttes testen lige før blommesækken er resorberet fuldstændigt i en hvilkensomhelst larve i en hvilketsomhelst forsøgsbeholder, og før sultedøden indtræffer i kontrollerne. Varigheden afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i bilag 2 og 3.

1.7.1.2 *Belastning*

Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene skal fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger og mindst 30 befrugtede æg, ligeligt fordelt, til mindst 3 replikate testbeholdere pr. koncentration af test-kemikalium (så vidt muligt, det kan være vanskeligt med nogle arter at opnå lige stor mængde). Belastningsraten (biomasse per volumen af test-opløsningen) bør være så lav, så den opløste iltkoncentration på mindst 60 % ASV kan vedligeholdes uden beluftning. Til gennemstrømnings-test anbefales en belastningsrate på ikke over 0,5 g/l per døgn og ikke over 5 g/l opløsning på noget tidspunkt (2).

1.7.1.3 *Lys og temperatur*

Perioderne med lys og test-vandets temperatur skal passe til den valgte art (Bilag 2 og 3). For at holde temperaturen konstant kan det være nødvendigt med endnu et forsøgskar.

1.7.2 **Test-koncentrationer**

Normalt kræves fem koncentrationer af test-kemikallet med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Kurven fra de akutte toksicitets-test, som knytter LC_{50} til test-perioden, bør tages i betragtning, når man vælger området for test-koncentrationerne. Brug af færre end fem koncentrationer, for eksempel i en grænse-test, og et snævrere interval mellem koncentrationerne kan være rimeligt under nogle omstændigheder. Begrundelse skal anføres, hvis færre end fem koncentrationer anvendes. Det er ikke nødvendigt at teste koncentrationer højere end svarende til 96 timer LC_{50} eller 100 mg/l, afhængigt af hvilken af disse, der er lavest. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger deres opløselighed i test-vandet.

Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælp ved fremstillingen af test-opløsninger (se sektion 1.6.6), bør dets endelige koncentration i forsøgsbeholderen ikke overstige 0,1 ml/l og den skal være den samme i alle forsøgsbeholdere.

1.7.3 **Kontroller**

Sammen med test-serien skal udføres en kontrol af fortyndingsvandet (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt) og ligeledes, hvis relevant, en kontrol, som indeholder opløsningsmiddel (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt).

1.7.4 **Hyppighed af analyser og målinger**

I test-perioden måles koncentrationen af test-kemikallet med regelmæssige mellemrum.

I semistatiske tests, hvor koncentrationen af test-kemikallet forventes at holdes inden for 20 % af det nominelle (dvs. inden for 80 - 120 %; se sektion 1.4 og 1.6.6), anbefales det, som et minimum, at den højeste og laveste test-koncentration måles, når den er frisk fremstillet og umiddelbart før udskiftning ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden (dvs. analyserne skal udføres på en prøve fra den samme opløsning, når den er frisk fremstillet og ved dens anvendelse ved udskiftning).

I tests, hvor koncentrationen af test-kemikallet ikke forventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle (baseret på kemikaliet's stabilitets-data), er det nødvendigt at analysere alle test-koncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning, efter samme system, (dvs. ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden). Målingen af koncentrationen af test-kemikallet før udskiftning er kun nødvendigt på en af beholderne i replikate bestemmelser for hver test-koncentration. Målingerne skal foretages mindst hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan vises, at test-kemikaliet's koncentration testen igennem i tilstrækkelig grad har været holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte begyndelsesværdier.

Hvad angår gennemstrømnings-tests er det passende med et prøvetagningsregime som for de semistatiske tests (men måling af udskiftede opløsninger er ikke mulig i disse tilfælde). Hvis imidlertid testen varer mere end en uge, er det tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger i den første uge (fx til tre) for at sikre, at test-koncentrationerne holder sig stabile.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere (fx med et filter med 0,45 µm porestørrelse). Da imidlertid hverken centrifugering eller filtrering altid synes at skille den biotilgængelige fra den ikke-biotilgængelige del af test-kemikaliet, behøver prøver ikke at gennemgå disse behandlinger.

I løbet af testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i alle test-beholdere. Hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis relevant) måles tre gange (i begyndelsen, midt i og ved afslutningen af testen). I de semistatiske tests anbefales det at måle ilt hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst en gang om ugen. pH skal måles før og efter vandudskiftning i de semistatiske tests og mindst en gang ugentlig i gennemstrømnings-testene. I hver test skal hårdhedsgraden måles en gang. Temperaturen skal måles daglig og helst være monitoreret kontinuerligt i mindst en test-beholder.

1.7.5 **Observationer**

1.7.5.1 *Fosterets udviklingstrin*

Fosterstadiet (dvs. gastrula-stadiet) bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelsen, hvor fosteret udsættes for test-kemikaliet. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og godkendes. I litteraturen kan man finde beskrivelser og illustrationer af fosterstadier (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2 *Udklækning og overlevelse*

og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. I begyndelsen af testen kan det være ønskeligt at foretage hyppigere observationer (fx hver halve time i løbet af de første tre timer), da overlevelsestid i nogle tilfælde kan være mere relevant end antallet af dødsfald alene (fx når der er akutte toksiske virkninger). Døde embryoner og larver skal fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke bliver ramt eller fysisk beskadigede, da de er meget sarte og følsomme. Kriterier for død varierer efter stadium:

- **for æg:** særligt i de tidlige stadier se tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed;
- **for embryoner:** manglende bevægelighed og/eller hjerteslag og/eller uklar misfarvning i arter, hvor embryonerne almindeligvis er gennemskelelige;
- **for larver:** manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

1.7.5.3 *Abnormt udseende*

Antallet af larver, der udviser abnorm kropsform og/eller pigmentering og tidspunkt for resorption af blommesækken, skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme embryoner og larver optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Abnorme dyr skal kun fjernes fra beholderne, når de er døde.

1.7.5.4 *Abnorm opførsel*

Abnorm opførsel, fx hyperventilation, ukoordineret svømning og atypisk ubevægelighed skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed. Disse virkninger kan, når de opdages, selvom de er vanskelige at kvantitere, hjælpe med til at tolke mortalitets-data, dvs. skaffe viden om hvorledes kemikaliets toksiske virkning udspiller sig.

1.7.5.5 *Længde*

Ved testens afslutning anbefales måling af individernes forskellige længde; standard, fork eller totallængden kan anvendes. Hvis imidlertid der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, anvendes standardlængden. Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten for længden i replikate bestemmelser almindeligvis ligge på $\leq 20\%$.

1.7.5.6 *Vægt*

Ved testens afslutning kan foretages vejning af dyrene; tørvægt (24 timer ved 60 °C) bør foretrækkes frem for vådvægt (aftørret). Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten på vægten i replikate bestemmelser ligge på $\leq 20\%$.

Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan gøres til genstand for statistisk analyse:

- kumulativ mortalitet;
- antal sunde larver ved afslutning af testen;
- begyndelses- og sluttidspunkt for klækning (dvs. 90 % klækning i hvert replikat);
- det daglige antal larver, der klækkes;
- længde (og vægt) af overlevende dyr ved testens afslutning;
- antal larver, der er deforme eller har abnormt udseende;
- antal larver, der opfører sig abnormt.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Det anbefales, at en statistiker involveres både i design og i analyse af testen, eftersom metoden tillader betragtelige variationer i tilrettelæggelse af eksperimentet, som fx antallet af forsøgsbeholdere, antal test-koncentrationer, begyndelsesantal af befrugtede æg og de målte parametre. I betragtning af valgmulighederne i test-design, vil her ikke blive vejledt i statistiske procedurer.

Hvis LOEC/NOECs skal beregnes, er det, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse (ANOVA) eller at anvende kontingenstabeller. Dunnets metode kan være nyttig til at foretage multiple sammenligninger mellem resultater fra individuelle koncentrationer og kontrollerne (12)(13). Andre nyttige eksempler kan også findes (14)(15). Størrelsen af den målbare effekt ved anvendelse af ANOVA eller andre procedurer (dvs. styrken af testet) bør udregnes og angives. Det bør bemærkes, at ikke alle observationer listet i sektion 1.7.5.6 kan analyseres ved hjælp af ANOVA. Fx. bør kumuleret død og antallet af sunde larver analyseres ved hjælp af probit-metoder.

Hvis LC/ECxs skal beregnes, bør (en) passende kurve(r), fx den logistiske kurve, fittes til de ønskede data ved hjælp af en statistisk metode som fx mindste kvadraters metode eller ikke lineære mindste kvadraters metode. Kurverne bør parametriseres, så den ønskede LC/ECx og dens standard error kan udregnes direkte. Dette vil gøre beregningen af sikkerhedsgrænserne for LC/ECx meget nemmere. Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, bør to-sidede 95 % sikkerhedsgrænser angives. Fitningsmetoden skulle helst give mulighed for beregning af en signifikans for mangel på fit. Grafiske metoder for fitning af kurver kan anvendes. Regressionsanalyse kan anvendes på alle observationer listet i sektion 1.7.5.6.

2.2 TOLKNING AF RESULTATER

Hvor den målte koncentration af giftstoffet i test-opløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtighed. Tolkning af resultater, hvor koncentrationerne ligger over stoffets vandopløselighed skal også gøres med forsigtighed.

2.3 TEST-RAPPORTEN

Test-rapporten bør indeholde følgende information:

2.3.1 Test-kemikaliet:

- dets fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber;
- kemiske identitets-data, heri renhedsgrad og, hvor nødvendigt, den analytiske metode til kvantificering af stoffet.

2.3.2 Arten, anvendt i testen:

- dets videnskabelige navn, herkomst, antal forældre-fisk (dvs. hvor mange hundyr blev brugt for at fremskaffe det ønskede antal æg til testen) kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

2.3.3

Forsøgsbetingelser

- anvendte fremgangsmåde (fx. semistatisk eller gennemstrømsforsøg, tidsforløb fra befrugtning til begyndelsen af testen, belastning, osv.);
- lysperiode(r);
- test-design (fx antal forsøgsbeholdere og replikater, antal embryoner pr. replikat;
- fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel skal dets koncentration anføres);
- den nominelle test-koncentration, de målte værdier, gennemsnit og standarddeviationer for forsøgsskarrene og metoden hvorved de er opnået, og, hvis test-kemikaliets opløselighed i vand i koncentrationer, der ligger under de undersøgte, skal der skaffes bevis for, at målingerne refererer til test-kemikaliets opløsning;
- karakteristik af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof, opslømmede substanser, saltindhold i test-mediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt;
- vandkvalitet i forsøgsskarrene: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt.

2.3.4

Resultater:

- resultater fra ethvert præliminært forsøg med test-kemikaliets stabilitet;
- bevis på at test-dyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard;
- data vedrørende mortalitet/overlevelse på embryon- og larvestadierne og den totale mortalitet/overlevelse;
- antal dage til klækningen og antal klækninger;
- data vedrørende længde (og vægt);
- morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer;
- abnorm opførsel beskrives, hvis den forekommer;
- statistisk analyse og behandling af data;
- vedrørende tests, hvor ANOVA er anvendt, anføres laveste observerede effekt-koncentration (LOEC) ved $p = 0,05$ og den koncentration, der var uden effekt (NOEC) ved hver måling, inklusive de statistiske procedurer og en angivelse af hvilken størrelse effekt der kunne påvises;
- i forbindelse med tests, hvor regressionsteknik er anvendt, anføres LC/ECx og sikkerhedsgrænser og en graf med den fitningsmetode, der blev brugt til beregningen;
- redegørelse for enhver afvigelse fra denne test-metode.

3. **REFERENCER**

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60.June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Biol.* 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *Copeia*, 4, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Aquatic Toxicology*, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. *Carolina Tips* 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

TABEL 1 A: FISKEARTER, SOM ER ANBEFALET TIL TESTNING

FERSKVAND
<i>Onchorynchus mykiss</i> Regnbueørred (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Zebrafisk (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Alm. karpe (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka (20)(21)
<i>Pimphales promelas</i> Fathead minnow (8)(22)

TABEL 1 B: EKSEMPLER PÅ ANDRE VELDOKUMENTEREDE ARTER, SOM OGSÅ HAR VÆRET ANVENDT

FERSKVAND	SALTVAND
<i>Carassius auratus</i> Guldfisk (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill(8)	<i>Clupea harengus</i> Sild (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Torsk (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (23)(24)(25)

BILAG 1

VEJLEDNING I UDFØRELSE AF TOKSICITETS-TEST PÅ EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL FRA ZEBRAFISK (*Brachdanio rerio*)

INTRODUKTION

Zebrafisken kommer oprindeligt fra Coromandelkysten på Indien, hvor den opholder sig i hurtigtrindende strømme. Den er en almindelig akvariefisk af karpefamilien, og oplysninger om fremgangsmåde i behandlingen og dyrkningen af den kan findes i standard referenceværker om tropiske fisk. Dens biologi og anvendelse i fiskeriundersøgelser findes i et review af Laale (1).

Fisken bliver sjældent længere end 45 cm. Kroppen er cylindrisk med 7 – 9 mørkeblå horisontale striber. Disse striber løber ud i de caudale og anale finner. Ryggen er olivengrøn. Hannerne er slankere end hunnerne. Hunnerne er mere sølvskinnende og abdomen er udspilet, særligt lige før æglægning.

Voksne fisk tåler store svingninger i temperatur, pH og vandhårdhed. For at sikre sig sunde fisk, som lægger æg af god kvalitet, bør man sørge for optimale betingelser.

Under æglægningen forfølger hannen hunnen og skubber til hende med snuden, og når æggene er kommet ud, bliver de befrugtede. Æggene, som er gennemsigtige og ikke-klæbende, synker til bunds, hvor de kan ædes af forældrene. Lys har indflydelse på æglægningen. Hvis lyset om morgenen er tilstrækkeligt, vil fiskene almindeligvis lægge æg i de tidlige timer efter morgengry.

En hun kan producere adskillige hundreder af æg ad gangen med ugers mellemrum.

FORÆLDREFISK, REPRODUKTION OG TIDLIGE LIVSSTADIER

Udvælg et passende antal sunde fisk og hold dem i passende vand (fx bilag 4) i mindst 2 uger før den ønskede æglægning. Fiskene bør formere sig mindst en gang, før de producerer den samling æg, der skal bruges i testen. Fisketætheden bør ikke overstige 1 gram fisk pr liter. Regelmæssig fornyelse af vand eller anvendelse af rensningsanlæg kan tillade større fisketæthed. Temperaturen i tankene bør holdes på 25 ± 2 °C. Fiskene bør fodres med en varieret kost fx af passende kommercielt tørfoder, levende nyklækkede *Artemia*, chironomider, dafnier, hvide orm (*Enchytraeidae*).

Nedenfor er skitseret to fremgangsmåder, der i praksis har ydet en tilstrækkelig mængde sunde, befrugtede æg til brug i en test:

- i Otte hunner og 16 hanner placeres i et akvarium med 50 liter fortyndingsvand, skærmet mod direkte lys og holdt så uforstyrret som muligt i mindst 48 timer. En bakke til ægopsamling anbringes i bunden af akvariet om eftermiddagen, dagen før testen begynder. ægopsamlingsbakken består af en ramme (plexiglas eller andet passende materiale), 5 – 7 cm høj med et groft 2 – 5 mm net fæstnet til kanten og et 10 – 30µm fint net på bunden. Et passende antal 'æglægnings-træer', lavet af optrevlet nylonreb, sættes fast på det grove net. Fiskene efterlades i mørke i 12 timer, hvorefter et svagt lys tændes, hvilket vil føre til æglægning. To til fire timer efter æglægningen fjernes bakken og æggene samles. Bakken vil hindre fiskene i at æde æggene og letter samtidig indsamlingen af æggene. Disse fisk skal have lagt æg mindst en gang før den, hvorfra æggene anvendes til testning.

- ii. Fra fem til ti han- og hunfisk holdes adskilt hver for sig i mindst 2 uger før den planlagte æglægning. Efter 5 – 10 dage vil hunnernes abdomen være udspilet og deres papillae genitales synlige. Sådanne har hanfisk ikke. Æglægning foregår i et æglægningsakvarium, forsynet med en falsk netværksbund (som ovenfor). Akvariet fyldes med fortyndingsvand, så der står 5 – 10 cm vand over nettet. En hun og to hanner anbringes i akvariet dagen før den planlagte æglægning. Vandtemperaturen øges gradvist til en grad over akklimatiseringstemperaturen. Lyset slukkes og akvariet holdes så uforstyrret som muligt. Næste morgen tændes et svagt lys, som får æglægningen til at gå i gang. 2 – 4 timer efter fjernes fiskene og æggene indsamles. Hvis man har brug for flere æg end en enkelt hun kan levere, opstilles flere akvarier parallelt. Ved at noteres sig formeringens størrelse og kvalitet for hver hun før testen, kan man udvælge sig de bedste hunner til formering.

Æggene flyttes til forsøgsakvariet ved hjælp af glasrør med en indre diameter ikke mindre end 4 mm og forsynede med en sugeballon. Mængden af vand, der flyttes med æggene ved flytningen skal være så ringe som muligt. Æggene er tungere end vand og synker selv ud af røret. Omhu skal udvises, så æg (og larver) ikke kommer i kontakt med luften. Ved hjælp af mikroskopiske undersøgelser af prøver fra æggene sikrer man sig, at de første stadier ikke udviser irregulære former. Det er ikke tilladt at desinficere æggene.

Mortaliteten blandt æggene er størst inden for de første 24 timer efter befrugtningen. Ofte ses en mortalitet på fra 5 – 40 %. Æg degenerer på grund af befrugtning, der ikke lykkes, eller udviklingsfejl. Æggenes kvalitet synes at bero på hunfisken, da nogle hunner hele tiden producerer gode ægkvaliteter, mens andre aldrig gør det. Udviklingshastigheden og klækningshastigheden varierer fra et kuld til et andet. Hvor befrugtningen lykkes og hvor blommesækkynglen klarer sig godt, overlever normalt over 90 %. Ved 25 °C klækkes æggene 3 – 5 dage efter befrugtningen og blommesækken resorberes ca. 13 dage efter befrugtningen.

Fosterudviklingen er vel beskrevet af Hisaoka og Battle (2). På grund af æggenes og de udklækkede larvers gennemsigtighed kan fiskenes udvikling følges og tilstedeværelsen af malformationer observeres. Omkring 4 timer efter æglægningen kan de ikke-befrugtede æg skelnes fra de befrugtede (3). Til denne undersøgelse bliver æg og larver anbragt i små undersøgelseskar og set på under mikroskop.

Testbetingelserne, som vedrører de tidlige livsstadier, findes i bilag 2. De optimale værdier for pH og vandhårdhed er 7,8 og 250 mg CaCO₃/l, respektive.

BEREGNINGER OG STATISTIK

Der foreslås beregninger i to tempi. Først foretages statistisk analyse af data vedrørende mortalitet, unormal udvikling og klækningstidspunkt. Derefter evalueres kropslængden statistisk for de koncentrationer, hvor ingen af ovennævnte negative virkninger kunne ses. Denne fremgangsmåde tilrådes, eftersom giftstoffet kan tænkes selektivt at dræbe mindre fisk, forsinke klækningstidspunktet og forårsage grove malformationer og på den måde føre til længdemålinger med bias. Ydermere vil der være stort set samme antal fisk at måle pr. undersøgelse, hvilket sikrer test-statistikens validitet.

LC₅₀ OG EC₅₀-BESTEMMELSER

Procentdelen af overlevende æg og larver beregnes og korrigeres for mortalitet i kontrollerne efter Abbotts formel (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P}{C}\times 100\right)$$

hvor

P = korrigeret % overlevelse

P' = % observeret overlevelse i test-koncentrationen

C = % overlevelse i kontrollen

Hvis man ønsker at inkludere morfologiske abnormiteter i EC₅₀-statistikken, kan man finde vejledning i Stephan (5).

REFERENCER

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

BILAG 2

TEST-BETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER

ART	TEMP. (°C)	SALTINDHOLD (0/00)	LYS-PERIODE (timer)	VARIGHED AF STADIER (dage)		TYPISK TESTVARIGHED	OVERLEVELSE KONTROL (MINIMUM %)	
				Embryoner	Blommesækkyngel		Klæknings succes	Efter klækning
FERSKVAND								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebrafisk	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (8-10 dage)	80	90
<i>Onchyrhynchus mykiss</i> Regnbueørred	10 ± 1 ² 12 ± 1 ³	–	0 ^a	30 – 35	25 – 30	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 20 dage efter klækning (50-55 dage)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> alm. karpe	21 – 25	–	12 – 16	5	>4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 ⁴ 23 ± 1 ⁵	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (13-16 dage)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	60	70

² gældende for embryoner

³ gældende for larver

^a mørke for embryoner og larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion. Siden svagt lys i resten af testen

⁴ gældende for embryoner

⁵ gældende for larver

BILAG 3
VELDOKUMENTEREDE TEST-BETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR ANDRE BRUGBARE ARTER

ART	TEMP. (°C)	SALTINDHOLD (0/00)	LYS-PERIODE (timer)	VARIGHED AF STADIER (dage)		TYPISK TESTVARIGHED FØR EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL	OVERLEVELSE KONTROL (MINIMUM %)	
				Embryoner	Blommeseækynge		Klæknings succes	Efter klækning
FERSKVAND								
<i>Carassius auratus</i> Guldfisk	24±1	–	–	3 – 4	>4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	–	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Bluegill sunfish	21±1	–	16	3	>4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	–	75
SALTVAND								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (6-7 dage)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Sild	10±1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (23-27 dage)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Torsk	5±1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (18 dage)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow	25±1	15 – 30	12	–	–	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4-7 dage efter klækning (28 dage)	>75	80

BILAG 4

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

SUBSTANS	KONCENTRATION
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
ikke-ioniseret ammonium	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10µg/l
Total organophosphor-pesticider	<50 ng/l
Total organochlorino-pesticider +polychlor-biphenyler	<50 ng/l
Total organisk chlor	<25 ng/l

C.16. HONNINGBIER - AKUT ORAL TOKSICITETS-TEST

1. METODE

Denne korttids toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 213 (1998).

1.1 INTRODUKTION

Denne toksicitets-test er en laboratoriemetode beregnet til at fastlægge den orale akutte toksicitet af plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier på voksne arbejdsbier.

I forbindelse med fastlæggelse og evaluering af stoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at fastslå den akutte orale toksicitet over for honningbier, fx når det er sandsynligt, at bier bliver udsat for stoffet. Den akutte orale toksicitets-test udføres for at fastslå den iboende toksicitet af pesticider og andre kemikalier over for bier. Resultaterne af testen bør anvendes for at fastslå en eventuel nødvendighed af yderligere undersøgelser. Særligt kan metoden anvendes i programmer med henblik på at vurdere de risici pesticider udgør for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitets-tests til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg.(1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og test-procedurens præcision.

1.2 DEFINITIONER

Akut oral toksicitet: Er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en oral indtagelse af en enkelt dosis af test-kemikaliet.

Dosis: er den mængde af test-kemikaliet, som er indtaget. Dosis udtrykkes som masse (mg) af test-kemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD₅₀ (Mediane letale dosis) oral: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50% af dyrene, indtaget oralt. LD₅₀-værdien udtrykkes i mg test-kemikalium per bi. Hvad pesticider angår, kan test-kemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: Et dyre regnes for dødt, når det er totalt immobil.

1.3 TEST-METODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (*Apis mellifera*) udsættes for en række doser af test-kemikaliet i en rørsukkeropløsning. Derefter får bierne samme føde men uden test-kemikaliet. Mortaliteten noteres daglig i mindst 48 timer og sammenlignes med kontrolværdierne. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. $\leq 10\%$, bør man forlænge test-perioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD₅₀ ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

1.4 TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

- at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning;
- LD₅₀ for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5 BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.5.1 Indsamling af bier

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles om morgenen eller om aftenen før, brugen og holdes under test-betingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med 'bi-brød' (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter, osv. bør ikke bruges til toksicitets-undersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2 Opbevaring og fodringsbetingelser

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangs træbure, osv. Det er bedst med ti bier pr bur. Størrelsen af test-burene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være for tilstrækkelig plads.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70%, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50% v/v). Efter at test-dosis er givet, forsynes bierne med føde *ad libitum*. Fordringssystemet bør tillade registrering af fødeindtagelse for hvert bur (se sektion 1.6.3.1). Et glastrør, ca. 50 mm langt med 10 mm lysning, med den åbne ende indsnævret til 2 mm, kan anvendes.

1.5.3 Forberedelse af bierne

De indsamlede bier fordeles tilfældigt i burene, som placeres tilfældigt i forsøgsrummet.

Bierne må sulte op til 2 timer før forsøgets begyndelse. Det anbefales, at bierne sulter før behandlingen, så at alle bier står lige med hensyn til tarmindehold ved forsøgets begyndelse. Moribunde bier skal kasseres og erstattes med sunde bier før forsøget indledes.

1.5.4 Fremstilling af doser

Hvor test-kemikaliet kan blandes i vand, kan det dispenseres direkte i en 50 % rørsukkeropløsning. Der kan i forbindelse med tekniske produkter og stoffer med lav vandopløselighed anvendes hjælpestoffer såsom organiske opløsningsmidler, blødgøringsmidler eller dispergenser med lav toksicitet over for bier, (fx acetone, dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Hjælpestoffets koncentration afhænger af test-stoffets opløselighed og bør være den samme i alle koncentrationer, der undersøges. Imidlertid er en koncentration af hjælpestoffet på 1% normalt passende og bør ikke overskrides.

Tilsvarende kontrolopløsninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper: en til opløsning i vand og en til rørsukkeropløsning med opløsningsmiddel/hjælpestof med samme koncentration som i forsøgsopløsningerne.

1.6 FREMGANGSMÅDE

1.6.1 Test- og kontrolgrupper

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD₅₀ med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD₅₀. Fortyndingsfaktor og antal dosis-koncentrationer bør imidlertid beregnes ud fra toksicitetskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosis-området kan være til hjælp for fastlæggelse af dosis-koncentrationerne.

Mindst tre test-grupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver test-koncentration. Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med test-serien. Kontrolgrupper skal også inkluderes til belysning af de opløsningsmidler og hjælpeoffer, der anvendes. (se sektion 1.5.4).

1.6.2 Toksisk standard

En toksisk standard (dvs. et kendt toksisk stof) skal inkluderes i test-serien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD₅₀-værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver test-dosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoate, for hvilket det angives, at den orale LD₅₀ - 24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,35 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (fx parathion).

1.6.3 Belastning

1.6.3.1 Administration af doser

Hver test-gruppe bier skal forsynes med 100-200 ml 50 % vandig rørsukkeropløsning, indeholdende test-kemikaliet i den rigtige koncentration. Større volumen kræves til kemikalier, der er tungt opløselige, har lav toksicitet eller lav koncentration i præparatet, da der skal bruges større mængder i rørsukkeropløsningen. Mængden af behandlet føde, der indtages, skal monitoreres. Når den er indtaget (almindeligvis efter 3-4 timer) skal fordringssystemet fjernes fra buret, og udskiftes med et nyt, som kun indeholder rørsukkeropløsning, og som tilføres *ad libitum*. Nogle stoffer kan i højere doser medføre, at der indtages kun lidt eller ingen føde. Efter højst 6 timer skal resten af den behandlede føde fjernes og erstattes med ren rørsukkeropløsning. Mængden af behandlet føde, der er indtaget, skal beregnes (fx via måling af volumen/vægt af resterende behandlet føde).

1.6.3.2 Varighed

Testen varer fortrinsvis til 48 timer efter at test-opløsningen er blevet erstattet med ren rørsukkeropløsning. Hvis mortaliteten fortsætter med at stige med mere end 10 % efter de første 24 timer, bør test-varigheden udvides til maksimalt 96 timer, under forudsætning af at mortaliteten blandt kontroldyrerne ikke overstiger 10 %.

1.6.4 Observationer

Mortaliteten registreres 4 timer efter testens start og derefter 24 og 48 timer efter (dvs. efter givet dosis). Hvis en længere observationsperiode er nødvendig, registreres yderligere hver 24. time op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrerne ikke overstiger 10 %.

Den mængde føde, der indtages af hver gruppe skal vurderes. Sammenligning af den hastighed, hvormed den behandlede og den ikke behandlede føde indtages indenfor 6 timer, kan skaffe viden om den behandlede fødes smagskvalitet.

Enhver unormal opførsel observeret blandt bierne i forsøgsperioden skal registreres.

1.6.5 Grænse-test

I visse tilfælde (fx hvis et test-kemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænse-test, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD_{50} er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate test-grupper til test-dosis, de relevante kontroller, vurderingen af indtaget behandlet føde og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se sektion 1.6.4) skal de registreres.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1 DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (fx probit-analyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3) (4). Plot dosis-respons-kurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{50} med 95 % sikkerhedsgrenser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.hj. af Abbotts korrektion (4) (5). Hvis den behandlede føde ikke er totalt indtaget, skal dosis af test-kemikalium indtaget pr. gruppe bestemmes. LD_{50} skal udtrykkes som mg test-kemikalium pr. bi.

2.2 TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1 Test-kemikalium:

- fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (fx stabilitet i vand, damptryk);
- data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2 Test-dyr

- videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling;
- informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af test-bier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3 Test-omstændigheder

- temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad;
- opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale;
- fremgangsmåde ved fremstilling af stamopløsning og test-opløsning (eventuelt opløsningsmiddel og dets koncentration skal angives);
- test-design, dvs. antal teste-koncentrationer og deres størrelse, antal kontroller; for hver test-koncentration og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. Bur.

Resultater:

- resultater af eventuelle forsøg med koncentrations-områder;
- rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt;
- graf af dosis-responskurve ved forsøgets slutning;
- LD₅₀ -værdier med 95 % sikkerhedsgrenser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for test-kemikalium og toksisk standard;
- statistisk procedure for fastlæggelse af LD₅₀ ;
- mortaliteten blandt kontroldyrene;
- andre biologiske effekter observerede eller målte, fx abnorm opførsel blandt bierne (inklusive manglende indtagelse af test-dosis), konsumtionshastighed både hvad angår den behandlede og den ubehandlede gruppe;
- enhver fravigelse af test-fremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

REFERENCER

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research ,22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

C.17 HONNINGBIER - AKUT KONTAKT TOKSICITETS-TEST

1. METODE

Denne akut toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 214 (1998).

1.1 INTRODUKTION

Denne toksicitets-testmetode er en laboratoriemetode, beregnet til at vurdere den akutte toksicitet over for voksne arbejdshonningbier ved kontakt med plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier.

Ved vurderingen og evalueringen af kemikaliers toksiske karakteristika kan det være ønskværdigt at bestemme den akutte kontakttoksicitet over for honningbier, fx når det er sandsynligt, at bier kan blive udsat for de pågældende kemikalier. Den akutte toksicitets-test udføres for at bestemme pesticiders og andre kemikaliers naturlige toksicitet over for bier. Resultaterne af denne test er tænkt anvendt til at fastslå behovet for yderligere evaluering. Specielt kan metoden bruges i programmer, der evaluerer den fare, som pesticider betyder for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitets-tests til tilnærmede felt-forsøg og rene feltforsøg (1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og test-procedurens præcision.

1.2 DEFINITIONER

Akut kontakt toksicitet: Er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en lokal applikation af en enkelt dosis af et kemikalium.

Dosis: Er den mængde af test-kemikaliet, som er påført. Dosis udtrykkes som masse (mg) af test-kemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD₅₀ (Mediane letale dosis) kontakt: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, når det administreres via kontakt. LD₅₀-værdien udtrykkes i mg test-kemikalium per bi. Hvad pesticider angår, kan test-kemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: Et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3 TEST-METODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (*Apis mellifera*) udsættes for en serie forskellige doser af test-kemikaliet, opløst i et passende medie, gennem en direkte applikation på thorax (små dråber). Forsøget varer 48 timer. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. ≤ 10 %, bør man forlænge test-perioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD₅₀ ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

1.4 TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

- at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning;
- LD₅₀ for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5 BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.5.1 Indsamling af bier

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand, race osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles aftenen før brugen og holdes under test-betingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med 'bi-brød' (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter, osv. bør ikke bruges til toksicitets-undersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2 Opbevaring og fodringsbetingelser

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangs træbure, osv. Størrelsen af test-burene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være tilstrækkelig plads. Det er bedst med ti bier pr. bur.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70%, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50% v/v) og tilbydes *ad libitum* under forsøget, idet man anvender et fodringssystem, der kan være et glasrør (ca. 50 mm langt og med en lysning på 10 mm og med den åbne ende indsnævret til 2 mm i diameter).

1.5.3 Forberedelse af bierne

De indsamlede bier kan bedøves med carbon dioxide eller nitrogen, når test-kemikaliet skal appliceres. Mængden af anæstetikum og bedøvelsestiden bør være mindst mulig. Moribunde bier skal kasseres og erstattes af sunde bier, før testen påbegyndes.

1.5.4 Fremstilling af doser

Test-kemikaliet skal appliceres som en opløsning i et medium, dvs. et organisk opløsningsmiddel eller en vandig opløsning med overfladeaktive stoffer. Som organisk opløsningsmiddel foretrækkes acetone, men andre organiske opløsningsmidler med lav toksicitet over for bier kan bruges, (fx dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Vandopløselige færdiggjorte produkter og højpolare organiske substanser, som ikke er opløselige i organiske opløsningsmidler, kan være lettere at påføre, hvis de tilberedes i en svag opløsning af kommercielle overfladeaktive stoffer (fx. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

Tilsvarende kontrolopløsninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper, en behandlet med vand og en med opløsningsmiddel/dispergent.

1.6 FREMGANGSMÅDE

1.6.1 Test- og kontrolgrupper

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD₅₀ med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD₅₀. Antallet af doser bør imidlertid beregnes ud fra toksicitetskurvens hældning (dosis over for mortalitet) idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosis-området kan være til hjælp for fastlæggelse af dosis-koncentrationerne.

Mindst tre test-grupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver test-koncentration.

Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med test-serien. Hvis der er anvendt et organisk opløsningsmiddel eller et overfladeaktivt stof, skal der inkluderes yderligere tre kontrolgrupper på ti bier hver for opløsningsmidlet eller det overfladeaktive stof.

1.6.2 Toksisk standard

En toksisk standard skal inkluderes i test-serien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD₅₀ -værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver test-dosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoate, for hvilket det angives, at kontakt-LD₅₀ - 24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,30 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (fx parathion).

1.6.3 Belastning

1.6.3.1 Administration af doser

Bedøvede bier behandles individuelt med lokal applikation. Bierne randomiseres til de forskellige test-doser og kontroller. 1 ml af opløsningen, der indeholder test-kemikaliet i den passende koncentration, anbringes med en mikroapplikator på dorsalsiden af thoraks af bien. Andre volumina kan anvendes, hvis der er grund til det. Efter applikationen anbringes bierne i test-burene og forsynes med rørsukkeropløsning.

1.6.3.2 Varighed

Forsøgets varighed er almindeligvis 48 timer. Hvis mortaliteten øger mere end 10 % mellem 24 og 48 timer, skal forsøgsvarigheden forøges til op til 96 timer, under forudsætning af at mortaliteten blandt kontrollerne ikke overstiger 10 %.

1.6.4 Observationer

Mortaliteten registreres 4, 24 og 48 timer efter applikationen. Hvis det er nødvendigt med en forlænget observationsperiode, skal observationerne foretages med 24-timers intervaller, op til 96 timer, under forudsætning af, at kontrolmortaliteten ikke overstiger 10 %.

Enhver unormal opførsel som observeres i testperioden skal registreres.

1.6.5 Grænse-test

I visse tilfælde (fx hvis et test-kemikalie forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænse-test, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD₅₀ er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate test-grupper til test-dosis, de relevante kontroller og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se sektion 1.6.4) skal de rapporteres.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1 DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (fx probit-analyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3) (4). Plot dosis-respons-kurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, (dvs. efter 24, 48 og, hvis relevant, 72 og 96 timer) og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{50} , med 95 % sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.hj. af Abbotts korrektion (4)(5). LD_{50} skal udtrykkes som mg test-kemikalium pr. bi.

2.2 TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1 Test-kemikalium:

- fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (fx stabilitet i vand, damptryk);
- data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2 Test-dyr

- videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling;
- informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af test-bier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3 Test-omstændigheder

- temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad;
- opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale;
- fremgangsmåde ved administration af test-kemikalium (det anvendte opløsningsmedium, volumen af test-opløsning, det anvendte anæstetikum);
- test-design, fx antal og størrelse af test-doser, antal kontroller; for hver test-dosis og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. Bur.

2.2.4 Resultater:

- resultater af eventuelle forsøg med koncentrations-områder;
- rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt;
- graf af dosis-responskurve ved forsøgets slutning;
- LD_{50} -værdier med 95 % sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for test-kemikalium og toksisk standard;
- statistisk procedure for fastlæggelse af LD_{50} ;
- mortaliteten blandt kontroldyrne;
- andre biologiske effekter observerede eller målte, fx abnorm opførsel blandt bierne (inklusive manglende indtagelse af test-dosis), konsumtionshastighed både hvad angår den behandlede og den ubehandlede gruppe;
- enhver fravigelse af test-fremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3.

REFERENCER

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

C.18. ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGTSMETODE

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 106: "Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method" (2000).

1.1 INDLEDNING

I metoden er taget hensyn til en ringtest og en workshop om udvælgelse af jord med henblik på udvikling af en adsorptionstest (1)(2)(3)(4) samt eksisterende guidelines på nationalt plan (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Adsorptions-/desorptionsundersøgelser kan skaffe vigtige oplysninger om kemiske stoffers mobilitet og fordeling i biosfærens jord-, vand- og luftcompartments (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Sådanne oplysninger kan anvendes til opstilling af prognoser eller overslagsberegninger f.eks. vedrørende muligheden for kemisk nedbrydning (22)(23), omdannelse og optagelse i organismer (24), udvaskning gennem jordbundsprofilen (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), fordampning fra jorden (21)(29)(30) og afstrømning fra jordoverfladen til naturlige vande (18)(31)(32). Adsorptionsdata kan anvendes til at drage sammenligninger og opstille modeller (19)(33)(34)(35).

Et kemisk stofs fordeling mellem jord- og vandfase er en kompleks proces, som bestemmes af en række forskellige faktorer: stoffets kemiske egenskaber (12)(36)(37)(38)(39)(40), jordens karakteristika (4)(12)(13), (14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) samt klimatiske faktorer som nedbør, temperatur, sollys og vind. De mange fænomener og mekanismer, som medvirker ved adsorption af et kemisk stof til jord, kan således ikke fastlægges fuldt ud ved en forenklet laboratoriemodel som nærværende metode. Men uanset at denne tentativt opstillede metode ikke kan dække alle tilfælde, der kan forekomme i miljøet, giver den tilstrækkelige oplysninger om den miljømæssige relevans af adsorptionen af et kemisk stof.

Se også den generelle indledning.

1.2 OMRÅDE

Metodens formål er at gøre det muligt at foretage en skønsmæssig beregning af et stofs adsorptions-/desorption i jord. Målet er at nå frem til en sorptionsværdi, med hvilken fordelingen under forskellige miljøforhold kan forudsiges; til dette formål bestemmes ligevægtsadsorptionskoefficienter for et kemisk stof på forskellige jordtyper som funktion af jordens egenskaber (f.eks. dens indhold af organisk kulstof, lerindholdet samt jordens struktur og pH). Det er nødvendigt at anvende forskellige jordtyper for at få så bred dækning som muligt af vekselvirkningen mellem et givet stof og naturligt forekommende jordtyper.

I denne metode forstås ved adsorption den proces, hvorved et kemisk stof bindes til overfladen af forskellige jordtyper; der skelnes her ikke mellem forskellige adsorptionsprocesser (fysisk og kemisk adsorption) og processer som overfladekatalyseret nedbrydning, masseadsorption og kemiske reaktioner. Den adsorption, som finder sted på kolloide partikler (diameter $< 0.2 \mu\text{m}$) dannet af jordarterne, tages ikke i betragtning.

De jordparametre, som anses for at have størst betydning for adsorptionen, er : organisk kulstofindhold (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), lerindhold og jordstruktur (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) samt for ioniserbare forbindelser pH-værdien (3)(4)(42). Andre jordparametre der kan have indflydelse på adsorptionen/desorptionen af nogle stof er effektiv kationudvekslingskapacitet (ECEC), indhold af amorfe jern- og aluminiumoxider, specielt for vulkanske og tropiske jordarter (4), samt virksom overflade (49).

Testen er udviklet med henblik på vurdering af et kemisk stofs adsorption på forskellige jordtyper med varierende organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur samt pH. Testen omfatter tre trin:

Trin 1: Indledende undersøgelse til bestemmelse af:

- forholdet jord/opløsning;
- ligevægtstid for adsorptionsprocessen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt;
- prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt prøvestoffets stabilitet inden for prøveperioden.

Trin 2: Screeningtest: adsorptionen i fem forskellige jordtyper undersøges adsorptionskinetisk ved én enkelt koncentration og bestemmelse af fordelingskoefficienterne K_d og K_{oc} .

Trin 3: Bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer til fastlæggelse af koncentrationens indflydelse på adsorptionen på jord.

Undersøgelse af desorption ved hjælp af desorptionskinetik/Freundlich desorptionsisotermer (bilag 1).

1.3

DEFINITIONER OG ENHEDER

Simbolo	Definizione	Unità
A_{t_i}	adsorptionsprocent til tiden t_i	%
A_{eq}	adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse prøvestof adsorberet på jorden i løbet af tidsintervallet Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	masse prøvestof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt	μg
m_0	masse prøvestof i prøveglasset ved adsorptionstestens begyndelse	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	masse prøvestof målt i en prøve (v_a^A) til tidspunktet t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse af stoffet i opløsningen ved adsorptionsligevægt	μg
m_{soil}	mængde jordfase, angivet som tør masse jord	g
C_{st}	massekonzentration af stamopløsningen af stoffet	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	initial massekonzentration af prøveopløsning i berøring med jorden	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massekonzentration af stoffet i den vandige fase til tidspunktet t_i for analysens udførelse	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt	$\mu g\ g^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massekonzentration af stoffet i vandig fase ved adsorptionsligevægt	$\mu g\ cm^{-3}$
V_0	initialt volumen af vandig fase i kontakt med jorden under adsorptionstesten	cm^3
v_a^A	volumen af den prøve, hvori prøvestoffet måles	cm^3
K_d	fordelingskoefficient for adsorption	$cm^3\ g^{-1}$
K_{oc}	normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof	$cm^3\ g^{-1}$
K_{om}	normaliseret fordelingskoefficient for organisk stof	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich adsorptionskoefficient	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
$1/n$	Freundlich-eksponent	
D_{t_i}	desorptionsprocent til tidspunktet t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptionsprocent til tidsintervallet Δt_i	%
K_{des}	tilsyneladende desorptionskoefficient	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich desorptionskoefficient	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse af prøvestoffet desorberet fra jorden i løbet af tiden t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestof desorberet fra jorden i løbet af tidsintervallet Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	samlet masse af prøvestof desorberet ved desorptionsligevægt	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestof, som stadig er adsorberet på jorden efter tidsintervallet Δt_i	μg
m_{aq}^A	masse af stof, som er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning	μg
$C_s^{des}(eq)$	indhold af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt	$\mu g\ g^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	massekonzentration af prøvestof i vandig fase ved desorptionsligevægt	$\mu g\ cm^{-3}$
V_T	samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode	cm^3
V_R	rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ -opløsning	cm^3
v_a^D	rumfang af prøve udtaget til analyse fra tidspunktet (i) under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode	cm^3
V_r^i	rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget (parallele metode)	cm^3

V_r^F	rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof, ved desorptionslignevægt	cm ³
MB	massebalance	%
m_E	samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglaset i to trin	µg
V_{rec}	rumfang supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionslignevægt	cm ³
P_{ow}	oktanol/vand fordelingskoefficient	
pKa	dissociationskonstant	
S_w	vandopløselighed	g l ⁻¹

1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Kendte rumfang af en opløsning af umærket eller radioaktivt mærket prøvestof med kendt koncentration i 0,01 M CaCl₂ tilsættes til jordprøver, hvis tørre vægt kendes, og som i forvejen er ekvibreret i 0,01 M CaCl₂. Blandingen omrystes et passende stykke tid. Jordsuspensionerne adskilles derefter ved centrifugering og om ønsket filtrering, og den vandige fase analyseres. Den mængde prøvestof, som er adsorberet på jordprøven, beregnes som forskellen mellem den mængde prøvestof, som i begyndelsen er til stede i opløsningen og den mængde, der er tilbage ved forsøgets slutning (indirekte metode).

Om ønsket kan man vælge at bestemme den adsorberede mængde prøvestof direkte ved analyse af jorden (direkte metode). Denne metode, som indebærer trinvis ekstraktion af jorden med passende opløsningsmiddel, anbefales i tilfælde, hvor koncentrationsforskellen af stoffet i opløsningen ikke kan bestemmes nøjagtigt. Som eksempel på sådanne tilfælde kan nævnes: prøvestoffet adsorberes på overfladen af prøveglaset, prøvestoffet er ustabil indtænkt for forsøgets tidsramme, adsorptionen er enten så svag, at der kun fås lille koncentrationsændring i stoffet, eller så stærk, at koncentrationen bliver for lille til at kunne bestemmes nøjagtigt. Anvendes radiomærket stof, kan ekstraktion af jorden undgås ved analyse af jordfasen ved forbrænding og væskescintillationstælling. Væskescintillationstælling er imidlertid en uspecifik teknik, som ikke gør det muligt at skelne mellem moderstof og omdannelsesprodukter; den bør derfor kun anvendes, hvis prøvestoffet er stabilt i hele undersøgelsens varighed.

1.5 OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet. Det anbefales at anvende umærket prøvestof med kendt sammensætning og helst mindst 95 % renhed, eller radioaktivt mærket prøvestof af kendt sammensætning og radioaktiv renhed. Anvendes radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald.

Før man udfører en test for adsorption-desorption, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

- Vandopløselighed (A.6.);
- Damptryk (A.4.) og/eller Henry's lov konstant;
- Abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH (C.7.);
- Forordningskoefficient (A.8.);
- Umiddelbar biologisk nedbrydelighed (C.4.) eller aerob og anaerob omdannelse i jord;
- pKa for ioniserbare stoffer;
- Direkte fotolyse i vand (dvs. UV-Vis absorptionsspektrum i vand, kvanteudbytte) og fotonedbrydning på jord.

1.6 PRØVENS ANVENDELIGHED

Prøven kan anvendes på kemiske stoffer, for hvilke en analysemetode med tilstrækkelig nøjagtighed er til rådighed. En vigtig parameter, som kan have betydning for resultaternes pålidelighed, navnlig ved anvendelse af den indirekte metode, er prøvestoffets stabilitet inden for det tidsrum, testen strækker sig over. Det er således en forudsætning, at stabiliteten efterprøves i en indledende undersøgelse; iagttages der en omdannelse i løbet af den tid, testen strækker sig over, anbefales hovedundersøgelsen udført med analyse af både jord- og vandfase.

Man kan komme ud for vanskeligheder med at udføre testen for prøvestoffer med ringe vandopløselighed ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), såvel som for stærkt ladede stoffer som følge af, at koncentrationen i den vandige fase ikke kan bestemmes analytisk med tilstrækkelig nøjagtighed. I sådanne tilfælde må der træffes supplerende foranstaltninger. Vejledning i, hvordan sådanne problemer gribes an, er givet i de pågældende afsnit i denne metode.

Ved testning af flygtige stoffer må der drages omsorg for at undgå tab under behandlingen.

1.7 BESKRIVELSE AF METODEN

1.7.1 Apparatur og kemiske reagenser

Standardlaboratorieudstyr, navnlig følgende:

- a) Glas eller beholdere til udførelse af forsøgene. Det er vigtigt, at disse glas eller beholdere:
 - passer direkte i centrifugen, for at fejl ved håndtering og overførsel kan begrænses til det mindst mulige;
 - er fremstillet af ikke-reaktive materialer, således at adsorptionen af prøvestoffet på overfladen nedsættes til det mindst mulige.
- b) Til omrystning anvendes overhead-rystebord eller tilsvarende; rystebordet skal holde jorden opslåmmet under omrystningen.
- c) Centrifuge: helst af højhastighedstypen, f.eks. centrifugalkraft $> 3000 \text{ g}$, temperaturkontrolleret, skal kunne fjerne partikler med diameter over $0,2 \mu\text{m}$ fra vandige opløsninger. Beholderne skal være tilproppet under omrystning og centrifugering for at undgå tab ved fordampning og væskespild; for at mindske adsorptionen på propperne bør deaktiverede propper anvendes, f.eks. teflonbelagte skruepropper.
- d) Valgfrit: filtreringsapparat, sterile engangsfiltre med $0,2 \mu\text{m}$ porestørrelse. Filtermaterialet bør udvælges særligt nøje med henblik på at undgå ethvert tab af prøvestof på filtrene; til tungtopløselige prøvestoffer kan filtre af organisk materiale ikke anbefales.
- e) Analyseudstyr, som er velegnet til måling af prøvestoffets koncentration.
- f) Laboratorievarmeskab, som kan holde temperaturer fra 103°C til 110°C .

1.7.2 Karakterisering og udvælgelse af jord

Jorden bør være karakteriseret ved tre parametre, som i hovedsagen anses for bestemmende for adsorptionskapaciteten: organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur, samt pH. Som allerede nævnt (jf. "Område") kan andre fysisk-kemiske jordegenskaber have betydning for et givet stofs adsorption/desorption og bør i så fald tages i betragtning.

Det har meget stor betydning, hvilke metoder, der anvendes til karakterisering af jorden, og disse kan have stor indflydelse på resultaterne. Det anbefales derfor, at jordens pH måles i en opløsning af 0,01 M CaCl₂ (dvs. den opløsning, der benyttes ved undersøgelse af adsorption/desorption) i henhold til den pågældende ISO-metode (ISO-10390-1). Ligeledes anbefales, at de øvrige relevante jordegenskaber bestemmes efter standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis); derved kan analysen af sorptionsdata baseres på globalt standardiserede jordparametre. Nogen vejledning vedrørende foreliggende standardmetoder til jordanalyse og -karakterisering er givet i reference (50-52). Til kalibrering af metoderne til jordbundsanalyse anbefales brug af referencejordtyper.

Vejledning i udvælgelse af jord til adsorptions-/desorptionsforsøgene er givet i tabel 1. De syv udvalgte jordtyper er dem, man finder i tempererede geografiske områder. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af adsorptionen af stoffet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Vejledning i, hvor mange forskellige jordtyper der skal undersøges i de forskellige trin af testen, findes under "Testens præstationer" 1.9.

Foretrækker man andre jordtyper, bør de være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variation i egenskaber som de, der er beskrevet i tabel 1, også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.

Tabel 1: Vejledning i valg af jordprøver til adsorption-desorption

Jordtype	pH-område (i 0,01 M CaCl ₂)	Organisk kulstofindhold (%)	Lerindhold (%)	Jordstruktur*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	clay
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	clay loam
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	silt loam
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	loam
5	< 4,0 - 6,0 [§]	< 0,5 - 1,5 [‡]	< 10 - 15 [§]	loamy sand
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 [‡]	40 - 65	clay loam/clay
7	< 4,5	> 10	< 10	sand/ loamy sand

* I henhold til FAO og US-systemet (85).

§ Værdierne af de respektive variable bør fortrinsvis ligge i det anførte område. Hvis det imidlertid er vanskeligt at finde passende jordmateriale, kan værdier under den anførte mindsteværdi godtages.

‡ For jordtyper med mindre end 0,3 % organisk kulstof kan sammenhængen mellem organisk kulstofindhold og adsorption være forstyrret. Det anbefales således at anvende jord med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.

1.7.3 Indsamling og opbevaring af jordprøver

1.7.3.1 Indsamling

Der anbefales ikke bestemte prøveudtagningsmetoder eller -redskaber; prøveudtagningsmetoden afhænger af undersøgelsens formål (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Følgende bør tages i betragtning:

- udførlige oplysninger om områdets historie er nødvendige, herunder beliggenhed, plantedække, behandling med pesticider og/eller gødning, biologisk tilvækst eller tilfældig forurening. Anbefalingerne i ISO standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6) bør følges med hensyn til beskrivelse af prøvetagningsstedet;

- b) prøvetagningsstedet skal være fastlagt ved UTM (universel transversal Mercator-projektion/europæisk horisontal datum) eller geografiske koordinater; dette skulle gøre det muligt at genfinde en bestemt jordtype i fremtiden og kan være en hjælp ved bestemmelse af jorden efter forskellige klassifikationssystemer, som anvendes i andre lande. Endvidere må kun indsamles A-horisont til en maksimal dybde af 20 cm. Specielt gælder for jordtype n.7, at hvis en O_h horisont indgår i jorden, bør den medtages ved prøveindsamlingen.

Jordprøverne bør transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at der med sikkerhed ikke sker nævneværdige ændringer i jordens oprindelige egenskaber.

1.7.3.2 *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Kun når dette ikke er muligt, bør jorden opbevares ved rumtemperatur i lufttørret tilstand. Der anbefales ingen grænse for opbevaringstiden, men har jorden været opbevaret i over tre år, bør den før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold, pH og kationbytningskapacitet.

1.7.3.3 *Håndtering og klargøring af jordprøver til testen*

Jordprøverne lufttørres ved rumtemperatur (fortrinsvis ved 20-25 °C). Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordens sigtes til en partikelstørrelse ≤ 2 mm; ved sigtningen følges anbefalingerne i ISO standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6). Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Fugtindholdet i hver jordtype bestemmes på tre prøver ved opvarmning til 105 °C, indtil vægten ikke længere ændrer sig væsentligt (ca. 12 h). I alle beregninger forstås ved masse af jord den ovntørrede masse, dvs. jordens vægt korregeret for fugtindhold.

1.7.4 **Klargøring af prøvestof, som skal tilføres jorden**

Prøvestoffet opløses i 0,01 M CaCl_2 i destilleret eller deioniseret vand; CaCl_2 -opløsningen anvendes som vandig fase for at forbedre centrifugeringen og nedsætte kationbytningen til det mindst mulige. Stamopløsningens koncentration bør fortrinsvis være tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for den anvendte analysemetode. Denne grænse garanterer nøjagtige målinger med hensyn til de her anviste metoder; endvidere bør stamopløsningens koncentration være lavere end prøvestoffets opløselighed i vand.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles umiddelbart før stoffet tilføres jordprøverne og bør opbevares tillukket og mørkt ved 4 °C. Opbevaringstiden afhænger af prøvestoffets stabilitet og dets koncentration i opløsningen.

Kun ved tungtopløselige stoffer ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹) kan det være nødvendigt at anvende et passende opløsningsmiddel, når prøvestoffet er vanskeligt at bringe i opløsning. For dette opløsningsmiddel gælder: (a) det bør være blandbart med vand, som f.eks. methanol eller acetonitril; (b) dets koncentration bør ikke være større end svarende til 1 % af stamopløsningens samlede rumfang og bør være mindre i den opløsning af prøvestof, som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %), og (c) det bør ikke være overfladeaktivt eller indgå i lyolytiske reaktioner med prøvestoffet. Brug af opløsningsmiddel bør være angivet og begrundet i rapporteringen af data.

Et andet alternativ ved tungtopløselige stoffer er at tilsætte prøvestoffet til prøvesystemet ved spiking: prøvestoffet opløses i et organisk opløsningsmiddel, og en lille del heraf tilsættes systemet bestående af jord og 0,01 molær opløsning af CaCl_2 i destilleret eller deioniseret vand. Indholdet af organisk opløsningsmiddel i den vandige fase skal holdes så lavt som muligt, normalt ikke over 0,1 %. Spiking fra en organisk opløsning kan være behæftet med manglende reproducerbarhed af volumen. Derved kan der indføres en ekstra fejlkilde i forsøget, da koncentrationen af prøvestof og hjælpeopløsningsmiddel ikke vil være den samme i alle tests.

1.8 BETINGELSER FOR UDFØRELSE AF ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTEN

1.8.1 Analysemetode

De vigtigste parametre, som kan påvirke nøjagtigheden af sorptionsmålingerne, er nøjagtigheden af analysemetoden anvendt til både opløsningsfase og adsorberet fase, prøvestoffets stabilitet og renhed, om sorptionsligevægt opnås, hvor meget opløsningens koncentration ændrer sig, forholdet jord/opløsning og ændringer i jordstrukturen under ekvilibrerings (35)(59-62). Nogle eksempler med relevans for nøjagtighedsproblematikken er givet i bilag 2.

Pålideligheden af den anvendte analysemetode skal være kontrolleret i det koncentrationsområde, som forventes at optræde under testen. Eksperimentatoren bør ikke afholde sig fra selv at udvikle en velegnet metode med passende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed, detektionsgrænser og genfindingsgrad. Nedenfor er givet en forsøgsvejledning, som viser udførelsen af en sådan test.

Et passende rumfang 0,01 M CaCl_2 , f.eks. 100 cm³, omrystes i 4 h med en afvejet mængde jord, f.eks. 20 g, med stor adsorptionsevne, dvs. stort organisk kulstofindhold; der kan afviges fra de angivne vægtmængder og rumfang afhængigt af, hvad hensynet til analysen kræver, men et forhold jord/opløsning på 1: 5 vil være et passende udgangspunkt. Blandingen centrifugeres, og den vandige fase kan eventuelt filtreres. Til den vandige fase tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestof, således at den nominelle koncentration når inden for det koncentrationsområde, der forventes at optræde under testen. Dette rumfang bør højst udgøre 10 % af den vandige fases endelige rumfang for at forekvilibreringsopløsningens beskaffenhed skal ændres mindst muligt. Opløsningen analyseres.

En blindprøve bestående af systemets jord + CaCl_2 -opløsning (uden prøvestof) skal indgå i analysen for at man kan kontrollere, om analysemetoden medfører artefakter, og om jorden giver matrixvirkninger.

Til sorptionsmåling kan anvendes gas-væskerkromatografi (GLC), high-performance væskerkromatografi (HPLC), spektrometri (f.eks. GC/massespektrometri, HPLC/massespektrometri) og væskescintillationstælling (ved radioaktivt mærket prøvestof). Uanset den anvendte analysemetode anses det for passende, hvis der genfindes mellem 90 % og 110 % af den nominelle værdi. For at give mulighed for detektion og evaluering efter at adskillelse af faserne har fundet sted, bør analysemetodens detektionsgrænser være mindst to størrelsesordener under den nominelle koncentration.

Karakteristika og detektionsgrænser for den analysemetode, der er til rådighed for adsorptionsundersøgelserne, spiller en vigtig rolle ved fastlæggelse af testbetingelserne og testens samlede præstationer. I denne metode angives en generel forsøgsgang, medens der gives anvisninger og vejledning for alternative løsninger, hvor analysemetode og laboratoriefaciliteter kan sætte begrænsninger.

Valg af optimalt jord/opløsning forhold

Et passende jord til opløsning forhold for sorptionsundersøgelser vælges ud fra fordelingskoefficienten K_d og den ønskede relative adsorptionsgrad. Den statistiske nøjagtighed, med hvilken stoffets koncentration i opløsningen lader sig bestemme, er givet ved koncentrationsændringen for stoffet i opløsningen, afhængigt af adsorptionsligningens form og analysemetodens grænseværdi. I praksis er det derfor sædvanligvis nyttigt at bestemme sig for nogle få faste forhold, som giver en adsorptionsprocent på over 20 %, helst også >50 % (62), samtidig med at man sørger for, at prøvestoffets koncentration i den vandige fase er høj nok til at kunne måles nøjagtigt. Dette er særlig vigtigt ved høje adsorptionsprocenter.

En bekvem måde at vælge passende jord/vand forhold på er at basere det på en skønnet K_d -værdi, enten fra de indledende forsøg eller er fra tilnærmet beregning med en anerkendt metode (bilag 3). Derefter kan et passende forhold jord/opløsning vælges ved afsætte en kurve over dette forhold som funktion af K_d for fastlagte adsorptionsprocenter (fig.1). Ved optegning af kurven antages adsorptionsligningen lineær.¹ Det pågældende forhold findes ved at omordne ligning (4) for K_d i samme form som ligning (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

eller i logaritmisk form, idet det forudsættes, at $R = m_{\text{jord}}/V_0$ og $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$

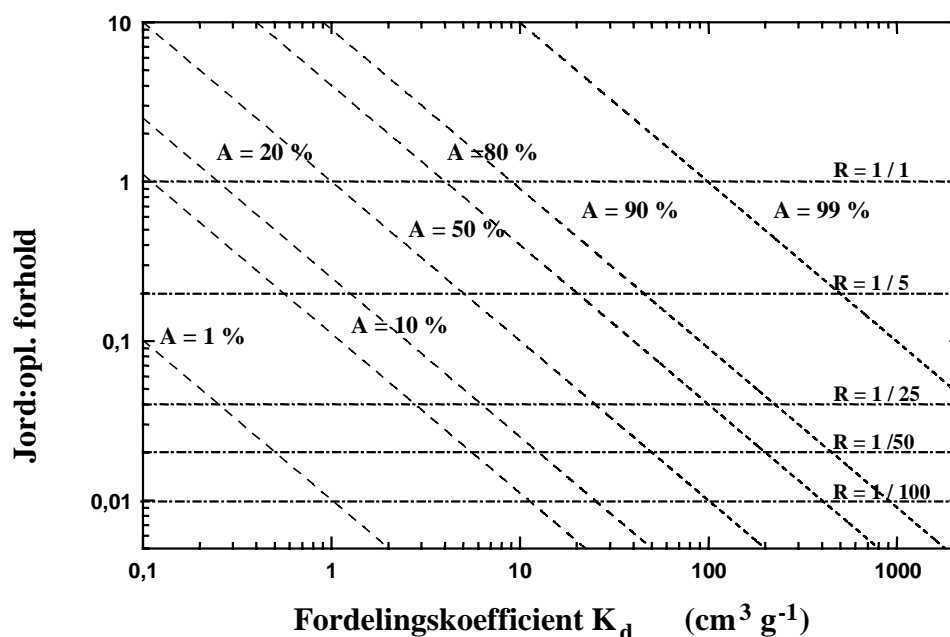


Fig. 1 Sammenhæng mellem forholdet jord/opløsning og K_d ved forskellige adsorptionsprocenter for prøvestof.

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

Fig. 1 viser det ønskede jord/opløsningsforhold som funktion af K_d ved forskellige adsorptionsgrader. F.eks. fås med et forhold jord/opløsning på 1:5 og $K_d = 20$ en adsorption på ca. 80 %. For at få 50 % adsorption ved samme K_d -værdi skal forholdet være 1:25. Denne måde at vælge passende jord/opløsningsforhold på giver undersøgeren den fleksibilitet, som er nødvendig under forsøgsomstændigheder.

Vanskeligere at håndtere er de områder, hvor det kemiske stof udviser enten meget høj eller meget lav adsorption. I tilfælde af lav adsorption anbefales et jord/opløsningsforhold på 1:1, dog kan det for visse meget organiske jordtyper være nødvendigt med et lavere forhold for at få en vællignende konsistens. Der må vises omhu med analysemetoden ved måling af små ændringer i opløsningens koncentration; ellers vil adsorptionsmålingen blive unøjagtig. Hvis fordelingskoefficienten K_d på den anden side er meget høj, kan man gå op til et forhold jord: opløsning på 1:100 for at en væsentlig del af det kemiske stof skal forblive i opløsningen. Der må dog sørges omhyggeligt for god opblanding, og man må give systemet tilstrækkelig tid til at ekvilibrerer. En alternativ fremgangsmåde er at forudsige K_d -værdien med teknikker til skønsvise beregning, f.eks. baseret på P_{ow} værdier (bilag 3). Især kan dette være nyttigt for lavt adsorberede/polære kemiske stoffer med $P_{ow} < 20$ og for lipofile/stærkt sorptive kemiske stoffer med $P_{ow} > 10^4$.

1.9 TESTENS PRÆSTATIONER

1.9.1 Testbetingelser

Alle forsøg udføres ved rumtemperatur, og om muligt ved konstant temperatur mellem 20 °C og 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserne skal gøre det muligt at fjerne partikler større end 0,2 µm fra opløsningen. Denne værdi medtager den mindste partikel, der betragtes som en faststofpartikel, og danner overgangen mellem faste og kolloide partikler. Vejledning for fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne findes i bilag 4.

Kan centrifugeringsfaciliteterne ikke garantere fjernelse af partikler over 0,2 µm, kan man eventuelt kombinere centrifugeringen med filtrering med filtre med 0,2 µm porestørrelse. Sådanne filtre skal være fremstillet af passende inaktivt materiale for at undgå tab af prøvestof på dem. Under alle omstændigheder skal det være godtgjort, at filtreringen ikke medfører tab af prøvestof.

1.9.2 Trin 1- Indledende undersøgelse

Formålet med den indledende undersøgelse er beskrevet i afsnittet "Område". Vejledning for opsætning af en sådan test gives i forbindelse med det nedenfor foreslåede forsøg.

1.9.2.1 Valg af optimalt forhold jord:opløsning

Der anvendes to jordtyper og tre forskellige jord:opløsning forhold (seks enkeltforsøg). Den ene jordtype har højt organisk kulstofindhold og lavt lerindhold, medens den anden har lavt organisk kulstofindhold og højt lerindhold. Der foreslås følgende forhold:

-50 g jord til 50 cm³ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:1);

-10 g jord til 50 cm³ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1/5);

-2 g jord til 50 cm³ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1/25).

Den mindste mængde jord, som forsøget kan gennemføres på, afhænger af laboratoriefaciliteterne og præstationerne af de anvendte analysemetoder. Dog anbefales det at anvende mindst 1 g, og helst 2 g for at få pålidelige resultater af testen.

En kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M CaCl₂ opløsning (ingen jord), underkastes nøjagtig de samme procedurer som prøvesystemerne for at kontrollere prøvestoffets stabilitet i CaCl₂-opløsning og dets eventuelle adsorption på overfladen af prøvekarrene.

For hver jordtype gennemføres samme testprocedure på en blindprøve med samme jordmængde og et totalt rumfang på 50 cm^3 0,01 M CaCl_2 -opløsning (uden prøvestof). Blindprøven tjener til baggrundskontrol under analysen med henblik på at opdage forstyrrende stoffer eller forurenet jord.

Alle forsøgene, herunder kontrol- og blindforsøg, skal udføres mindst som dobbeltforsøg. Det samlede antal prøver, som skal fremstilles til forsøget, kan beregnes ud fra den metode, der skal anvendes.

Sædvanligvis benyttes samme metoder ved forundersøgelsen og hovedundersøgelsen; undtagelser herfra nævnes i givet fald.

Dagen før forsøgsdagen ekvilibrerer de lufttørrede jordprøver ved omrystning med et mindsterumfang på 45 cm^3 0,01 M CaCl_2 natten over (12 h). Derefter tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestoffet, således at det endelige rumfang justeres til 50 cm^3 . Dette tilsatte rumfang stamopløsning: (a) må ikke være over 10 % af det endelige rumfang på 50 cm^3 af den vandige fase for ikke at ændre beskaffenheden af forekvilibreringsopløsningen mere end nødvendigt, og (b) bør fortrinsvis resultere i, at den prøveopløsning, som er i kontakt med jorden (C_0), har en begyndelseskonzentration mindst to størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden; denne grænse sikrer, at der kan foretages nøjagtige målinger, selv når der optræder stærk adsorption (> 90%), og giver mulighed for senere bestemmelse af adsorptionsisotermerne. Ligeledes anbefales det, at begyndelseskonzentrationen af det undersøgte stof (C_0) ikke er større end halvdelen af dets opløselighed.

Nedenfor er givet et eksempel på, hvordan stamopløsningens koncentration (C_{st}) beregnes. Det antages, at detektionsgrænsen er $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$, og at adsorptionen er 90 %; begyndelseskonzentrationen af prøvestoffet, som er i kontakt med jorden, bør derfor helst være $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ (to størrelsesordener over detektionsgrænsen). Når det forudsættes, at der tilsættes det anbefalede maksimale rumfang stamopløsning, dvs. 5 cm^3 til 45 cm^3 0,01 M CaCl_2 ekvibreringsopløsning (= 10 % stamopløsning i 50 cm^3 samlet vandigt rumfang), bør koncentrationen af stamopløsningen være $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, altså tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden.

pH af den vandige fase bør måles før og efter kontakt med jorden, da den spiller en vigtig rolle i hele adsorptionsprocessen, navnlig for ioniserbare stoffer.

Blandingen omrystes godt, indtil adsorptionsligevægt er nået. Ligevægtstiden i jord er stærkt varierende og afhænger af det kemiske stof og af jorden; et tidsrum på 24 h er sædvanligvis tilstrækkeligt. I forundersøgelsen kan prøverne udtages sekventielt gennem en omrystningsperiode på 48 h (f.eks. 4, 8, 24, 48 h). Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt under hensyntagen til laboratoriets arbejdsplan.

For analyse af prøvestoffet i den vandige opløsning er der to valgmuligheder: (a) den parallelle metode og (b) den sekventielle metode. Det må understreges, at skønt den parallelle metode er forsøgsmæssigt mere langstrakt, er den matematiske behandling af resultaterne enklere (bilag 5). Hvilken metode man vil vælge, er imidlertid op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

(a) den parallelle metode: der fremstilles prøver med ens jord:opløsning forhold, idet antal prøver skal være lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Efter centrifugering og (om ønsket) filtrering opsamles den vandige fase i første prøveglas så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 4 h, væsken i det andet prøveglas efter 8 h, i det tredje prøveglas efter 24 h, osv.

(b) den sekventielle metode: der fremstilles kun en dobbeltprøve for hvert forhold jord:opløsning. Ved fastlagte tidsintervaller centrifugeres blandingen for at skille faserne. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Filtreret der efter centrifugeringen, bør laboratoriet have de nødvendige faciliteter til filtrering af små vandige prøver. Det anbefales, at det samlede rumfang af de udtagne prøver ikke udgør over 1 % af opløsningens samlede rumfang, således at man ikke ændrer forholdet jord:opløsning væsentligt og nedsætter massen af opløst stof, som er til rådighed for adsorption under testen.

Adsorptionsprocenten A_{t_i} beregnes for hvert tidspunkt (t_i) på grundlag af den nominelle begyndelseskoncentration og den målte koncentration på prøvetagningstidspunktet (t_i), korregeret for blindværdien. Grafer over A_{t_i} som funktion af tiden (Fig. 1 bilag 5) optegnes for at vurdere, om der er nået et ligevægtsplateau.² K_d -værdien ved ligevægt beregnes ligeledes. På grundlag af denne K_d -værdi vælges passende forhold jord:opløsning i fig. 1, således at adsorptionsprocenten kommer over 20 %, og helst >50 % (61). Alle de pågældende ligninger og principper for grafisk afbildning er givet i afsnittet om data og rapportering i bilag 5.

1.9.2.2 *Bestemmelse af ekvibreringstid for adsorptionen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt*

Som nævnt giver grafer over A_{t_i} eller C_{aq}^{ads} som funktion af tiden mulighed for vurdere, om der er nået adsorptionsligevægt, samt den adsorberede mængde prøvestof ved ligevægt. Fig. 1 og 2 i bilag 5 viser eksempler på sådanne afbildninger. Ekvibreringstiden er den tid, systemet behøver for at nå et plateau.

Hvis der med en given jord ikke nås et plateau, men fås en konstant stigende værdi, kan det skyldes komplicerende faktorer som biologisk nedbrydning eller langsom diffusion. Biologisk nedbrydning kan påvises ved, at forsøget gentages med en steriliseret prøve af jorden. Hvis der heller ikke i dette tilfælde nås et plateau, bør eksperimentatoren søge efter andre fænomener, som som kan tænkes at gøre sig gældende i netop hans undersøgelser; dette kan ske gennem passende ændringer af forsøgsbetingelserne (temperatur, omrystningstid, jord:opløsning forhold). Det er op til eksperimentatoren at afgøre, om testen skal fortsættes, uanset at det måske ikke lykkes at nå ligevægt.

1.9.2.3 *Adsorption af prøvestof på overfladen af prøvebeholderne og prøvestoffets stabilitet*

Ved at analysere kontrolprøverne kan man skaffe sig en del oplysninger om prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt dets stabilitet. Hvis der iagttages en udtynding, som er større end svarende til middelfejlen på analysemetoden, kan der være tale om abiotisk nedbrydning og/eller adsorption på overfladen af prøveglassene. Man vil kunne skelne mellem disse to fænomener ved at vaske prøveglassets vægge grundigt med et kendt volumen af et passende opløsningsmiddel og derefter analysere vaskeopløsningen for prøvestoffet. Hvis der ikke konstateres adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene, er udtyndingen et bevis på abiotisk ustabilitet af prøvestoffet. Hvis der findes adsorption, må der anvendes prøveglas af andet materiale. De af dette forsøg afledte oplysninger om adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene kan imidlertid ikke overføres direkte til jord/opløsning forsøget. Tilstedeværelsen af jord vil indvirke på denne adsorption.

Supplerende oplysninger om prøvestoffets stabilitet kan fås ved bestemmelse af massebalancen for moderstoffet i tid. Dette indebærer, at den vandige fase, ekstrakterne af jord samt prøvekammerets vægge analyseres for prøvestof. Forskellen mellem massen af tilsat prøvestof og summen af masserne af prøvestof i den vandige fase, ekstrakterne fra jord og fra prøveglasset vægge er lig den masse, som er nedbrudt og/eller fordampet og/eller ikke ekstraheret. For at massebalancen kan beregnes, bør der være nået adsorptionsligevægt inden for forsøgsperioden.

² Kurver over koncentrationen af prøvestof i den vandige fase (C_{aq}^{ads}) som funktion af tiden kunne også anvendes til at vurdere, om der nås et ligevægtsplateau (se fig. 2 i bilag 5).

Massebalancen beregnes for begge jordprøver og for ét jord:opløsningsforhold for hver jordtype, som giver en udtynding over 20 %, og helst >50 % ved ligevægt. Når forsøget til fastlæggelse af forholdet jord:opløsning er fuldført med analyse af den sidste prøve af den vandige fase efter 48 h, adskilles faserne ved centrifugering og, om ønsket, filtrering. Der opsamles så meget som muligt af den vandige fase, og til jorden tilsættes et passende ekstraktionsopløsningsmiddel (ekstraktionskoefficient mindst 95 %) for at ekstrahere prøvestoffet. Det anbefales at foretage mindst to på hinanden følgende ekstraktioner. Mængden af prøvestof i ekstrakterne fra jord og prøveglas bestemmes, og massebalancen beregnes (ligning 10, data og rapportering). Hvis den er mindre end 90 %, regnes prøvestoffet for ustabil indtænkt for testperioden. Undersøgelserne kan dog i så tilfælde fortsættes, idet der tages hensyn til prøvestoffets ustabilitet; det anbefales da at analysere begge faser i hovedundersøgelsen.

1.9.2.4 Trin 2 - Adsorptionskinetik ved én prøvestofkoncentration

Der anvendes fem jordtyper, udvalgt fra tabel 1. Det vil være en fordel, hvis nogle af eller alle de anvendte jordtyper fra forundersøgelsen i givet fald er med blandt disse fem jordtyper. Derved undgår man at gentage trin 2 for de jordtyper, der er anvendt i forundersøgelsen.

Ekvibreringstiden, forholdet jord:opløsning, jordprøvens vægt, rumfanget af vandig fase i berøring med jorden og prøvestoffets koncentration i opløsningen vælges på grundlag af resultaterne af forundersøgelsen. Aanalyse bør helst finde sted efter ca. 2, 4, 6, 8 (eventuelt også 10) og 24 h kontakttid; omrystningstiden kan strækkes til højst 48 h i tilfælde af, at prøvestoffet kræver længere ekvibreringstid ud fra de resultater, der danner grundlag for fastlæggelse af opblandingsforholdet. Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt.

Hvert forsøg (ét med jord og ét med opløsning) gennemføres mindst som dobbeltforsøg for at resultaternes overensstemmelse kan vurderes. I hvert forsøg skal indgå én blindprøve. Denne består af jord og 0,01 M CaCl₂ opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og rumfang identisk med forsøgets. En kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M CaCl₂-opløsning (uden jord) underkastes samme testprocedure for at sikre mod det uventede.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt A_{t_i} og/eller tidsinterval $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af behov) og afsættes mod tiden. Desuden beregnes fordelingskoefficienten K_d ved ligevægt og den normaliserede adsorptionskoefficient K_{oc} for organisk kulstof (for upolære organiske stoffer).

Resultaterne af adsorptionskinetikforsøget

Den lineære K_d -værdi giver sædvanligvis en nøjagtig beskrivelse af sorptionsforholdene i jord (35)(78) og er et udtryk for den iboende mobilitet af kemiske stoffer i jord. For eksempel anses kemiske stoffer med $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ sædvanligvis for kvalitativt mobile. Tilsvarende har MacCall *et al.* (16) opstillet et system til opdeling efter mobilitet, baseret på K_{oc} -værdier. Endvidere findes der klassifikationssystemer for udvaskning, baseret på sammenhængen mellem K_{oc} og DT-50³ (32)(79).

I henhold til fejlanalyseundersøgelser (61) kan K_d -værdier under $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ desuden ikke beregnes nøjagtigt ud fra et fald i koncentrationen i den vandige fase, selv når der anvendes det (fra en nøjagtighedssynsvinkel) gunstigste forhold jord:opløsning, dvs. 1:1. I så tilfælde anbefales det at analysere begge faser - jord og opløsning.

³ DT-50: den tid, der forløber, til 50 % af prøvestoffet er nedbrudt.

Vedrørende ovenstående bemærkninger anbefales det, at undersøgelsen af adsorptionsforholdene for et kemisk stof i jord og dets potentielle mobilitet fortsættes med bestemmelse af Freundlich adsorptionsisotermer for disse systemer, for hvilke K_d kan bestemmes nøjagtigt ved brug af forsøgsprotokollen i denne testmetode. Nøjagtig bestemmelse er mulig, såfremt multiplikation af K_d med forholdet jord:opløsning giver en værdi $> 0,3$, når målingerne baseres på koncentrationsfaldet i den vandige fase (indirekte metode), hhv. $> 0,1$ når begge faser analyseres (direkte metode) (61).

1.9.2.5 *Trin 3 - Adsorptionsisotermer og desorptionskinetik/desorptionsisotermer*

1.9.2.5.1 Adsorptionsisotermer

Der anvendes fem prøvestofkoncentrationer, helst således at de spænder over to størrelsesordener; valg af disse koncentrationer bør ske på grundlag af vandopløseligheden og den resulterende ligevægtskoncentration i vand tages. For hver jordtype bør anvendes samme forhold jord:opløsning i hele undersøgelsen. Adsorptionstesten udføres som ovenfor beskrevet, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang efter forløb af den nødvendige tid til indtræden af ligevægt som tidligere bestemt i trin 2. Ligevægtskoncentrationerne i opløsningen bestemmes, og den adsorberede mængde beregnes enten ud fra svindet af prøvestof i opløsningen eller ved hjælp af den direkte metode. Den adsorberede masse pr. masseenhed jord afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet (se "Data og rapportering").

Resultater af bestemmelsen af adsorptionsisotermer

Af de matematiske adsorptionsmodeller, som hidtil er foreslået, er Freundlich-isotermen den oftest anvendte til beskrivelse af adsorptionsprocesser. Mere udførlige oplysninger om fortolkning og betydning af adsorptionsmodeller er givet i reference (41)(45)(80)(81)(82).

Bemærkning: Det skal nævnes, at man ikke kan sammenholde værdierne af K_F (Freundlich adsorptionskoefficienten) for forskellige stoffer, medmindre de pågældende K_F -værdier udtrykkes i samme enheder (83).

1.9.2.5.2 Desorptionskinetik

Formålet med dette forsøg er at undersøge, om et kemisk stof adsorberes reversibelt eller irreversibelt til en jordtype. Denne oplysning er vigtig, da også desorptionsprocessen spiller en vigtig rolle for et kemisk stofs opførsel i jord på en given lokalitet. Desuden er desorptionsdata nyttige som inddata for computermodeller af et stofs udvaskning og afstrømning i opløst form. Ønskes en desorptionsundersøgelse, anbefales det at udføre nedenstående undersøgelse på hvert system, for hvilket det var muligt at bestemme K_d nøjagtigt i det foregående adsorptionskinetikforsøg.

Ligesom for adsorptionskinetikundersøgelsen kan der vælges: (a) den parallelle metode og (b) den sekventielle metode. Valg af metode er op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

(a) Den parallelle metode: for hver jordtype, som udvælges til desorptionsundersøgelsen, fremstilles prøver med ens jord:opløsning forhold, således at antal prøver er lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Tidsintervallerne bør helst være de samme som i adsorptionskinetikforsøget; dog kan den samlede tid om nødvendigt forlænges, for at systemet kan nå desorptionsligevægt. I hvert forsøg (én jordtype, én opløsning), køres én blindprøve. Blindprøven består af jord og 0,01 M CaCl_2 opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og volumen identisk med forsøgets. Som kontrolprøve underkastes prøvestof i 0,01 M CaCl_2 -opløsning (uden jord) samme testprocedure. Alle blandingerne af jord og opløsning omrystes, til adsorptionsligevægt er nået (som tidligere bestemt i trin 2). Derefter adskilles faserne ved centrifugering, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M CaCl_2 uden prøvestof, og de nye blandinger omrystes igen. Den vandige fase i første prøveglas opsamles så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 2 h, væsken i det andet prøveglas efter 4 h, i det tredje prøveglas efter 6 h, osv., indtil desorptionsligevægt er nået.

(b) den sekventielle metode: efter adsorptionskinetikforsøget centrifugeres blandingen, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M CaCl_2 uden prøvestof. Den nye blanding omrystes, indtil desorptionsligevægt er nået. I dette tidsrum centrifugeres blandingen ved fastlagte tidsintervaller, så faserne adskilles. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Rumfanget af hver enkelt prøve skal være mindre end 1 % af det samlede rumfang. Der tilsættes samme mængde frisk fremstillet 0,01 M CaCl_2 opløsning til blandingen for at bevare uændret forhold mellem jord og opløsning, og omrystningen fortsætter indtil næste tidsinterval.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt (D_{t_i}) og/eller tidsinterval ($D_{\Delta t_i}$) (afhængigt af, hvad undersøgelsen kræver) og afsættes mod tiden. Desorptionskoefficienten K_{des} ved ligevægt beregnes ligeledes. Alle de ligninger, som skal anvendes, er givet i afsnittet data og rapportering og i bilag 5.

Resultater af desorptionskinetikforsøget

Fælles afbildninger af desorptionsprocenten D_{t_i} og adsorptionsprocenten A_{t_i} som funktion af tiden giver mulighed for at vurdere adsorptionsprocessens reversibilitet. Hvis desorptionsligevægt nås, selv om det tager dobbelt så lang tid som at nå adsorptionsligevægt, og hvis den samlede desorption udgør over 75 % af den adsorberede mængde, anses adsorptionen for reversibel.

1.9.2.5.3 Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermer bestemmes for de jordtyper, som anvendes i forsøget til bestemmelse af adsorptionsisotermer. Desorptionstesten udføres som beskrevet i afsnittet "Desorptionskinetik", blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang, ved desorptionsligevægt. Den samlede masse desorberet prøvestof beregnes. Indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet i opløsningen (se data og rapportering samt bilag 5).

2. DATA OG RAPPORTERING

Analysedata fremlægges i tabelform (se bilag 6). Enkeltmålinger og beregnede gennemsnit angives. Der gives grafiske fremstillinger af adsorptionsisotermerne. Beregningerne foretages som nedenfor beskrevet.

I forsøget sættes vægten af 1 cm^3 vandig opløsning til 1 g. Forholdet jord:opløsning kan angives i enheder w/w eller w/vol med samme talværdi.

Adsorptionen (A_{t_i}) defineres som den procentdel af det fra forsøgets begyndelse tilstedeværende stof, som adsorberes på jorden under de givne forsøgsbetingelser. Såfremt prøvestoffet er stabilt og ikke i nævneværdig grad adsorberes til beholderens væg, A_{t_i} beregnes adsorptionsprocenten til hvert af tidspunkterne t_i efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

hvor:

A_{t_i} = adsorptionsprocent til tiden t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i (μg);

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (μg).

Udførlige oplysninger om, hvordan den procentuelle adsorption beregnes A_{t_i} ved brug af den parallelle og sekventielle metode findes i bilag 5.

Fordelingskoefficienten K_d er forholdet mellem indholdet af stoffet i jordfasen og massekoncentrationen af stoffet i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af ligevægt.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

hvor:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved adsorptionsligevægt ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Koncentrationen bestemmes ved analyse under hensyntagen til resultaterne af blindprøverne;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg);

m_{soil} = mængde jordfase, angivet som tør masse af jord (g);

V_0 = begyndelsesrumfang af vandig fase i kontakt med jorden (cm^3).

Forholdet mellem A_{eq} og K_d er givet ved:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

hvor:

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt, %.

Den normaliserede adsorptionskoefficient for organisk kulstof K_{oc} angiver sammenhængen mellem fordelingskoefficienten K_d og jordprøvens organiske kulstofindhold:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (6)$$

hvor:

$\%OC$ = procentdel organisk kulstof i jordprøven (g g^{-1}).

K_{oc} koefficienten angiver ved én enkelt værdi fordelingen af hovedsagelig ikke-polære organiske stoffer mellem organisk kulstof i jord eller slam og vand. Adsorptionen af sådanne kemiske stoffer er korreleret med det organiske indhold af det sorberende faste stof (7); således afhænger K_{oc} -værdierne af de særlige karakteristika af humusfraktionerne, hvis sorptionsevne afviger betydeligt som følge af forskelle i oprindelse, tilblivelse osv.

2.1.1 Adsorptionsisotermer

Freundlich-adsorptionsisotermligningen giver sammenhængen mellem den adsorberede mængde prøvestof og koncentrationen af opløst prøvestof ved ligevægt (ligning 8).

Data behandles som angivet under "Adsorption", og for hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof adsorberet på jorden efter adsorptionstesten ($C_s^{ads}(eq)$), (andetsteds betegnet x/m) beregnes. Det antages, at der er indtrådt ligevægt, og at $C_s^{ads}(eq)$ udtrykker ligevægtsværdien:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsligningen er vist i (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

hvor:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficient; den har kun dimensionen $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$, såfremt $1/n = 1$; i alle andre tilfælde indføres hældningen $1/n$ i dimensionen af K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$);

n = regressionskonstant; $1/n$ ligger sædvanligvis i intervallet 0,7 - 1,0, hvilket viser, at sorptionsdata ofte er let ulineære.

Ligning (8) og (9) afsættes, og værdierne af K_F^{ads} og $1/n$ beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 9. Korrelationskoefficienten r^2 for den logaritmiske ligning beregnes ligeledes. Et eksempel på sådanne afbildninger er givet i fig. 2.

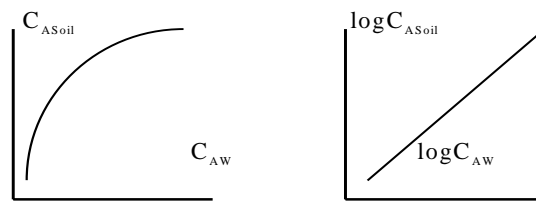


Fig. 2. Freundlich adsorptionskurve, normal og lineariseret

2.1.2 Massebalance

Massebalancen (MB) defineres som den procentdel af den nominelle mængde stof ved testens begyndelse, som kan genfindes analytisk efter en adsorptionstest.

Behandlingen af data vil være afvige, hvis det opløste stof er fuldstændig blandbart med vand. For opløsningsmidler blandbare med vand kan man ved at behandle data som beskrevet under "Desorption" bestemme den mængde stof, som genfindes ved ekstraktion med opløsningsmiddel. Er opløsningsmidlet mindre blandbart med vand, må den genfundne mængde bestemmes.

Beregning af massebalancen MB for adsorption: leddet (m_E) antages at svare til den samlede masse prøvestof ekstraheret af jorden og fra prøveglassets overflade med organisk opløsningsmiddel:

$$MB = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

hvor:

MB = massebalance (%);

m_E = Samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin (μg);

C_0 = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = rumfang supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt (cm^{-3}).

Desorptionen (D) defineres som den procentdel af den tidligere adsorberede stofmængde, som desorberes under forsøgsbetingelserne:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

hvor:

D_{t_i} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i , (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet fra jorden til tiden t_i , (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden ved adsorptionsligevægt (μg).

Udførlige oplysninger om, hvordan desorptionprocenten beregnes D_{t_i} ved brug af den parallelle og sekventielle metode, er givet i bilag 5.

Den tilsyneladende desorptionskoefficient (K_{des}) er forholdet mellem indholdet af resterende stof i jordfasen og massekoncentrationen af desorberet stof i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af desorptionsligevægt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

hvor:

K_{des} = desorptionskoefficient ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = samlet masse af prøvestof desorberet fra jorden ved desorptionsligevægt (μg);

V_T = samlet masse af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Vejledning for beregning af $m_{aq}^{des}(eq)$ findes i bilag 5 under overskriften "Desorption".

Bemærkning

Hvis den efterfølgende adsorptionstest blev udført med den parallelle metode, sættes rumfanget V_T i ligning (12) lig V_0 .

2.2.1

Desorptionsisotermer

Freundlich-ligningen for adsorptionsisotermer udtrykker sammenhængen mellem den mængde prøvestof, som stadig er absorberet på jorden, og koncentrationen af prøvestof ved desorptionsligevægt (ligning 16).

For hvert prøveglass beregnes indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, på følgende måde:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

m_{aq}^{des} (eq) defineres som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F^F} - m_{aq}^A \quad (\mu g) \quad (14)$$

hvor:

C_s^{des} (eq) = indhold af prøvestof, som ved desorptionsligevægt stadig er adsorberet til jorden ($\mu g g^{-1}$);

m_m^{des} (eq) = masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt (μg);

m_{aq}^A = masse af prøvestof, som på grund af ufuldstændig volumenudskiftning er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægt (μg);

m_{aq}^{des} (eq) = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_F^F = rumfang opløsning, som ved desorptionsligevægt er udtaget af prøveglasset med henblik på bestemmelse af prøvestof (cm^3);

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ -opløsning (cm^3);

Freundlich-desorptionsligningen er vist i (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

hvor:

K_F^{des} = Freundlich desorptionskoefficient;

n = regressionskonstant;

C_{aq}^{des} (eq) = massekoncentration af stof i vandig fase ved desorptionsligevægt ($\mu g cm^{-3}$).

Ligningerne (16) og (17) kan afsættes grafisk, og værdien af K_F^{des} og $1/n$ beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 17.

Bemærkning:

Hvis Freundlich adsorptions- eller desorptionsekspONENTEN $1/n$ er lig 1, vil Freundlich-bindingskonstanten for adsorption eller desorption (K_F^{ads} og K_F^{des}) være lig ligevægtskonstanterne (K_d og K_{des}) for henholdsvis adsorption og desorption, og ved afbildning af C_s mod C_{aq} fås en ret linje. Er eksponenterne forskellige fra 1, bliver en afbildning af C_s som funktion af C_{aq} ulineær, og adsorptions- og desorptionskonstanterne vil ændre sig langs isotermerne.

2.2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

- Fuldstændig identifikation af de anvendte jordprøver, med angivelse af:
 - stedsbestemmelse for lokaliteten (bredde og længde);
 - prøveindsamlingsdato,
 - anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.) ;
 - dybde af prøvetagning;
 - sand-/silt-/lerindhold;
 - pH-værdi (i 0,01 M CaCl_2);
 - organisk kulstofindhold;
 - indhold af organisk stof;
 - kvælstofindhold;
 - C/N forhold;
 - Kationbytningsskapacitet (mmol/kg);
 - udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver;
 - når det er hensigtsmæssigt, alle relevante oplysninger til fortolkning af prøvestoffets adsorption - desorption;
 - henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter.
- oplysninger om prøvestoffet, hvis det er hensigtsmæssigt;
- forsøgstemperaturen;
- centrifugeringsbetingelser;
- analysemetode anvendt til analyse af prøvestoffet;
- begrundelse af enhver brug af opløsningsmiddel til fremstilling af stamopløsningen af prøvestoffet;
- forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne;
- data i henhold til formularbladet (bilag 6) og grafiske fremstillinger;
- alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af testresultaterne.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hassett J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schiefferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

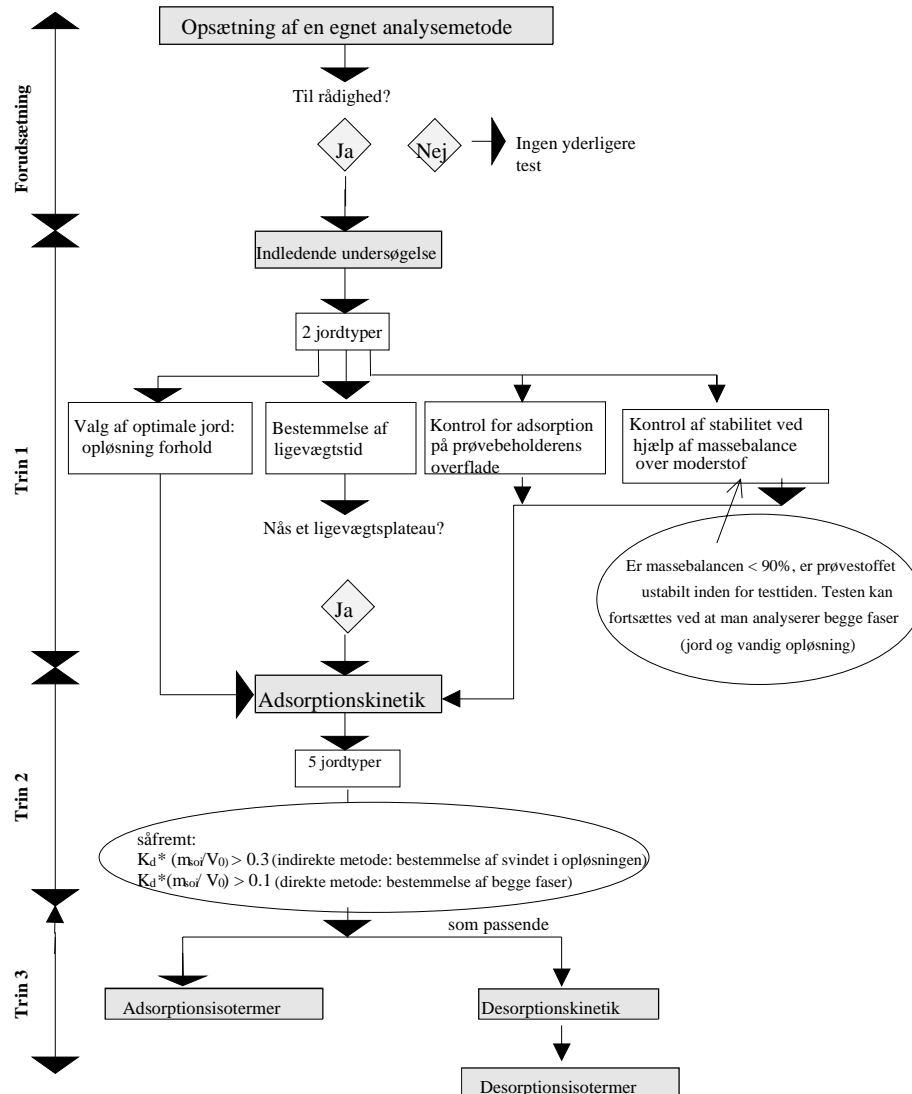
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Fumming C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I., "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. " Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), " Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

BILAG 1

Testplan



BILAG 2

BETYDNINGEN AF ANALYSEMETODENS NØJAGTIGHED OG KONCENTRATIONSÆNDRINGER

FOR ADSORPTIONSRESULTATERNES NØJAGTIGHED

Af følgende tabel (84) ses, at når der er meget lille forskel mellem prøvestoffets begyndelsesmasse ($m_0=110\text{ }\mu\text{g}$) og ligevægtsmasse ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$) i opløsningen, vil en fejl på 5 % på ligevægtskoncentrationsmålingen føre til en fejl på 50 % på beregningen af den stofmængde, som er adsorberet på jorden ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) og på 52,4 % på beregningen af K_d .

Mængde jord	m_{jord}	=	10 g
Opløsningens rumfang	V_0	=	100 cm^3

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110\text{ }\mu\text{g}$ or $C_0=1,100\text{ }\mu\text{g / cm}^3$	FOR A = 9 %							
	100	1,000	sand værdi	10	1,00	sand værdi	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10%	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
$m_0 = 110\text{ }\mu\text{g}$ or $C_0=1,100\text{ }\mu\text{g / cm}^3$	FOR A = 55 %							
	50,0	0,500	sand værdi	60,0	6,00	sand værdi	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7 %
$m_0 = 110\text{ }\mu\text{g}$ or $C_0=1,100\text{ }\mu\text{g / cm}^3$	FOR A = 99 %							
	1,100	0,011	sand værdi	108,9	10,89	sand værdi	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse af prøvestof i vandfasen ved ligevægt, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = indhold af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massekoncentration af prøvestoffet i vandig fase ved ligevægt, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = analysefejl på bestemmelse af $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R^\dagger = beregnet fejl som følge af analysefejl R .

BILAG 3

TEKNIKKER TIL SKØNSMÆSSIG BEREGNING AF K_d

1. Ved hjælp af teknikker til skønsmæssig beregning kan størrelsen af K_d forudsiges på grundlag af korrelationer med f.eks. værdier af P_{ow} (12)(39)(63-68), vandopløselighedsdata (12)(19)(21)(39)(68-73) eller polaritetsdata afledt ved brug af omvendt fase HPLC (74-76). Som vist i tabel 1 og 2 beregnes K_{oc} eller K_{om} , og dermed indirekte K_d , af ligningerne:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (cm^3 g^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (cm^3 g^{-1})$$

2. Princippet om disse korrelationer hviler på to forudsætninger: (1) et stofs adsorption er hovedsagelig bestemt af jordens organiske stofindhold, og (2) de indgående vekselvirkninger er hovedsagelig af ikke-polær art. For disse korrelationer gælder følgende: (1) de gælder ikke eller kun i nogen udstrækning for polære stoffer og (2) de gælder ikke ved meget lille organisk stofindhold i jorden (12). Desuden gælder, at skønt der er fundet tilfredsstillende korrelation mellem P_{ow} og adsorptionen (19), kan det samme ikke siges om forholdet mellem vandopløselighed og adsorptionsgrad (19)(21); undersøgelser heraf hidtil givet meget modstridende resultater.

3. Nogle eksempler på korrelationen mellem adsorptionskoefficient og oktanol-vand fordelingskoefficient samt vandopløselighed er givet henholdsvis i tabel 1 og 2.

Tabel 1. Eksempler på korrelation mellem adsorptionsfordelingskoefficienten og oktanol-vand fordelingskoefficienten; flere eksempler er givet i (12) og (68).

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Substituerede urinstoffer	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatiske klorerede	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Forskellige pesticider	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiske carbonhydrider	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles og Mantoura (1987) (67)

Tabel 2. Eksempler på korrelationen mellem adsorptionsfordelingskoefficient og vandopløselighed; flere eksempler er givet i (68) og (69).

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Forskellige pesticider	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiske og aromatiske klorerede forbindelser	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cykliske, alifatiske og aromatiske stoffer	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Forskellige forbindelser	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

BILAG 4

BEREGNINGER TIL FASTLÆGGELSE AF CENTRIFUGERINGSBETINGELSER

1. Centrifugeringstiden er givet ved følgende formel, idet partiklerne forudsættes at være kugleformede:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

For enkelhedens skyld er alle parametre angivet i ikke-SI enheder (g, cm).

hvor:

- ω = rotationshastighed ($=2\pi \text{ rpm}/60$), rad s^{-1} ;
- rpm = omdrejninger pr. minut;
- η = opløsningens viskositet, $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- r_p = partikelradius, cm;
- ρ_s = massefylde af jord, g cm^{-3} ;
- ρ_{aq} = massefylde af opløsning, g cm^{-3} ;
- R_t = afstand fra centrum af centrifugerotoren til overfladen af opløsningen i centrifugeglasset, cm;
- R_b = afstand fra centrum af centrifugerotoren til bunden i centrifugeglasset, cm;
- $R_b - R_t$ = længde af jord/opløsning blandingen i centrifugeglasset, cm.

I praksis fordobler man sædvanligvis de beregnede tider for at sikre fuldstændig separation.

2. Ligning (1) kan forenkles yderligere, hvis opløsningens viskositet (η) og massefylde (ρ_{aq}) sættes lig viskositeten og massefylden af vand ved 25 °C, altså $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, og $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

Centrifugeringstiden er da givet ved ligning (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Af ligning (2) ses, at to parametre er vigtige ved fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne, nemlig tid (t) og hastighed (rpm), når man vil udskille partikler med en given størrelse (i vort tilfælde radius 0,1 μm): (1) jordens massefylde og (2) længden af blandingen i centrifugeglasset ($R_b - R_t$), dvs. den distance, som en jordpartikel tilbagelægger fra overfladen af opløsningen til glassets bund; for et givet rumfang er det klart, at længden af blandingen i røret bestemmes af kvadratet på rørets radius.

4. Fig. 1 viser sammenhængen mellem centrifugeringstiden (t) og centrifugeringshastigheden (rpm) for forskellige jordmassefylder (ρ_s) (Fig. 1a) og forskellige længder af blandingen i centrifugeglassene (Fig. 2a). Af fig. 1a ses betydningen af jordens massefylde tydeligt; for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca. 240 min. for jord med massefylde 1,2 g cm^{-3} men kun 50 min., når massefylden er 2,0 g cm^{-3} . Tilsvarende ses af fig 1b, at for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca. 50 min. for en længde af blandingen på 10 cm, men kun 7 min. for en længde på 1 cm. Det er imidlertid vigtigt at finde et optimalt forhold mellem den centrifugering, som kræver mindst mulig længde, og den, som gør det let for eksperimentatoren at adskille faserne efter centrifugering.

5. Ved fastlæggelse af forsøgsbetingelserne med henblik på adskillelse af fast og flydende fase er det desuden vigtigt at tage hensyn til eventuel tilstedeværelse af en tredje "pseudo"-fase, kolloiderne. Disse partikler, der er under $0,2\mu$ m, kan i væsentlig grad påvirke hele absorptionsmekanismen for et stof i en jordsuspension. Når der centrifugeres som ovenfor beskrevet, forbliver kolloiderne i den vandige fase og bliver analyseret sammen med den vandige fase. Derfor går oplysningerne om deres indflydelse tabt.

Hvis det laboratorium, som forestår undersøgelsen, har faciliteter til ultracentrifugering eller ultrafiltrering, kan adsorption/desorption af et stof i jord undersøges mere tilbundsående, herunder stoffets adsorption på kolloiderne. I så tilfælde bør der anvendes ultracentrifugering ved 60.000 rpm eller ultrafiltrering med en filterporøsitet på 100.000 Dalton til at adskille de tre faser jord, kolloider og opløsning. Den forsøgsprotokol bør desuden ændres tilsvarende, således at alle tre faser analyseres for stoffet.

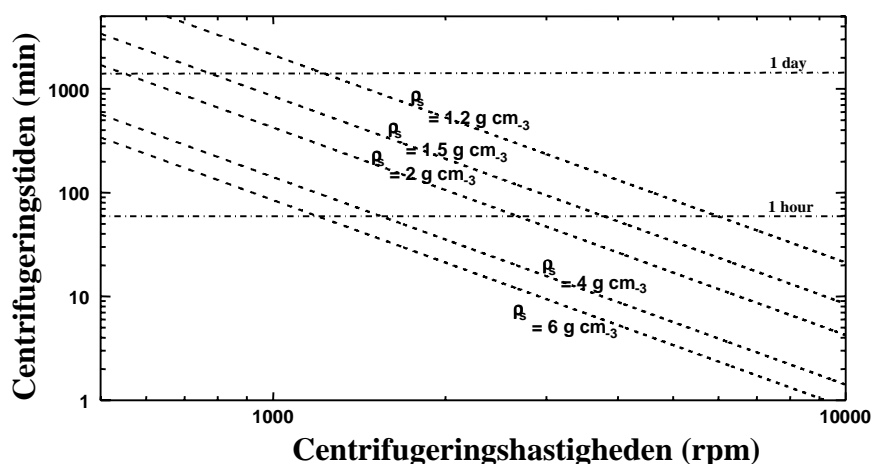


Fig. 1a. Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centrifugeringshastighed (rpm) ved forskellige jordmassefylder (ρ_s). $R_t = 10$ cm, $R_b - R_t = 10$ cm, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ og $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ v. 25°C .

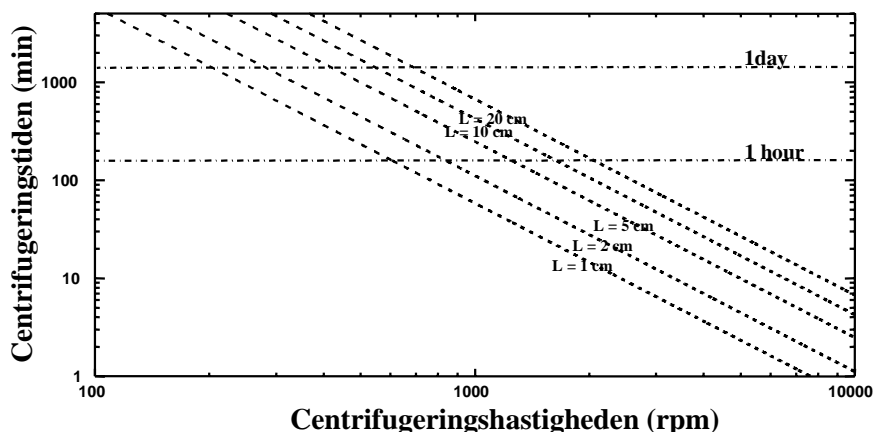
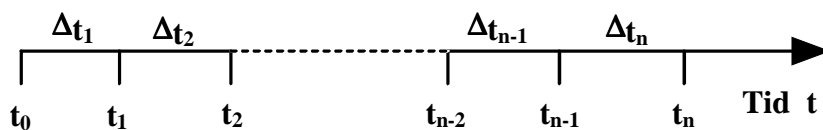


Fig. 1b. Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centrifugeringshastighed (rpm) for forskellige længder af blandingen i centrifugeglasset ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10$ cm, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ ved 25°C og $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

BILAG 5

BEREGNING AF ADSORPTION A (%) OG DESORPTION D (%)

Tidsplanen for proceduren er følgende:



Ved alle beregninger er forudsat, at prøvestoffet er stabilt og ikke adsorberes nævneværdigt til beholderens vægge.

ADSORPTION A (A%)

a) Den parallelle metode

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert prøveglas (i) ved hvert tidspunkt (t_i) efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Leddene i denne ligning kan beregnes på følgende måde:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

hvor:

A_{t_i} = adsorptionsprocent (%) til tiden t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden på det tidspunkt t_i , da analysen udføres (μg);

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (μg);

C_0 = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = massekoncentration af stof i vandig fase på det tidspunkt t_i da analysen udføres ($\mu\text{g cm}^{-3}$);
denne koncentration bestemmes ved analyse med hensyntagen til blindværdierne.

V_0 = initialt rumfang af prøveopløsning i kontakt med jorden (cm^3).

Værdierne af adsorptionsprocenten A_{t_i} eller $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ afsættes på en kurve mod tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes. Eksempler på sådanne kurver er givet i hhv. fig. 1 og fig. 2.

⁴ Ligninger, som gælder både for den direkte og den indirekte metode. Alle de øvrige ligninger gælder kun for den indirekte metode.

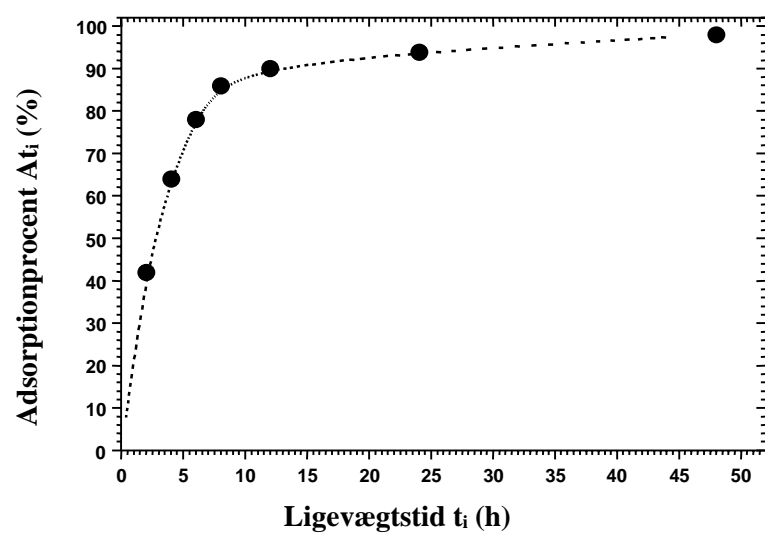


Fig. 1. Adsorptionsligevægtskurve

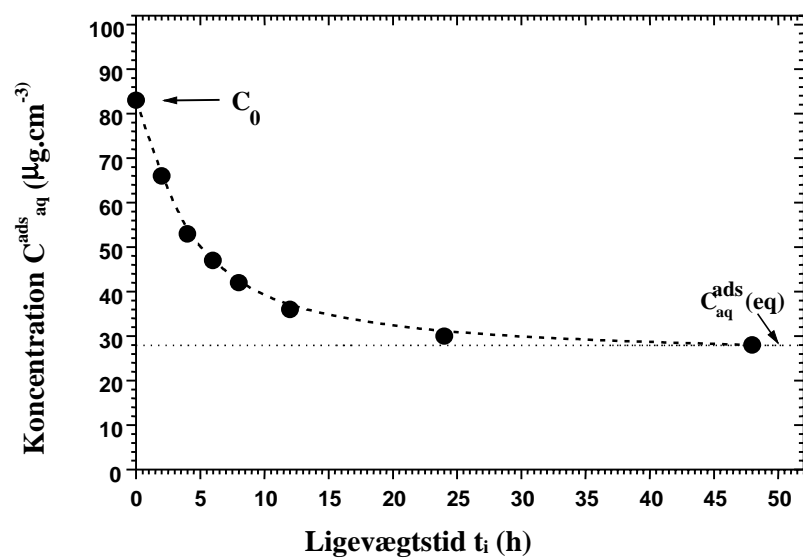


Fig.2. Massekoncentration af prøvestoffet i vandfasen (C_{aq}) som funktion af tiden

b) Den sekventielle metode

I de følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver af vandig fase til bestemte tidsintervaller.

- Inden for hvert tidsinterval beregnes mængden af stof adsorberet på jorden på følgende måde:

- for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- for det tredje tidsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Adsorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $A_{\Delta t_i}$, beregnes ved følgende ligning:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

medens adsorptionsprocenten (A_{t_i}) til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Ligninger, som finder anvendelse på både den direkte og den indirekte metode. Alle de øvrige ligninger finder kun anvendelse på den indirekte metode.

Adsorptionsværdierne A_{t_i} eller $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes som funktion af tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

- Ved ligevægtstidspunktet t_{eq} :

- er massen af prøvestof adsorberet på jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- er massen af prøvestof i opløsningen:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- og er adsorptionsprocenten ved ligevægt:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

De ovenfor anvendte parametre er defineret som følger:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden henholdsvis i løbet af tidsintervallerne $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve v_a^A henholdsvis til tiden t_1, t_2, \dots, t_n (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg);

v_a^A = rumfang af den prøve, hvori prøvestoffet måles (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = adsorptionsprocent svarende til et tidsinterval Δt_i (%);

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt (%).

DESORPTION D (%)

Tidspunktet t_0 for start af desorptionskinetikforsøget regnes som det tidspunkt, hvor det maksimale opsamlede rumfang af prøvestofopløsningen (efter indtræden af adsorptionsligevægt) erstattes et tilsvarende rumfang 0,01 M $CaCl_2$ -opløsning.

a) Den parallelle metode

Til tiden t_i måles massen af prøvestof i den vandige fase udtaget af prøveglas i (V_r^i), og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massen af prøvestof desorberet i et tidsinterval (Δt_i) er givet ved ligningen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorptionsprocenten beregnes:

- til tidspunktet t_i af ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- og i et tidsinterval (Δt_i) af ligningen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

hvor:

D_{t_i} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = desorptionsprocent svarende til et tidsinterval Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet til tidspunktet t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = masse af prøvestof desorberet af jorden i løbet af et tidsinterval Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof bestemt analytisk til et tidspunkt t_i i et rumfang opløsning V_r^i , som udtages til analysen (μg);

m_{aq}^A = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads(eq)} \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads(eq)}$ = masse af prøvestof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg);

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M CaCl_2 -opløsning (cm^3);

V_T^i = rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Værdierne af desorptionen D_{t_i} eller $D_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes mod tiden, og tidsrummet til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

b) Den sekventielle metode

I følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver (v_a^A) af vandig fase (den sekventielle metode i "Testens præstationer" 1.9.). Forudsætninger: a) det rumfang supernatant, som er fjernet fra glasset efter adsorptionskinetikforsøget er erstattet af samme rumfang 0,01 M CaCl_2 -opløsning (V_R) og b) det samlede rumfang vandig fase i kontakt med jorden (V_T) under desorptionskinetikforsøget forbliver uændret og er givet ved ligningen:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Til tidspunktet t_i :

- måles massen af prøvestof i en lille prøve, (v_a^D) og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des(eq)}$.

- kan desorptionsprocenten D_{t_i} beregnes af følgende ligning:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads(eq)}} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

I et tidsinterval (Δt_i):

- beregnes mængden af stof desorberet i for hvert tidsinterval på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \quad \text{og} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad \text{og}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq i}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{og} \quad m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq i}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Endelig beregnes desorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $D_{\Delta t_i}$, ved hjælp af følgende ligning:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

medens desorptionsprocenten D_{t_i} til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

hvor de ovenfor anvendte parametre er defineret således:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden henholdsvis efter $t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof desorberet henholdsvis i løbet af tidsintervallet $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), \dots, m_m^{des}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve (v_a^D) henholdsvis til tidspunktet t_1, t_2, \dots, t_n (μg);

V_T = samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode, (cm^3);

m_{aq}^A = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (μg);

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ -opløsning (cm^3);

v_a^D = rumfang af prøve udtaget af prøveglas (i) til analyseformål i desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode (cm^3);

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

BILAG 6

ADSORPTION-DESORPTION I JORD: : DATARAPPORTERINGSBLADE

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold, (105° C, 12 h):..... %

Temperatur:.....°C

Analysemetodens egnethed

Afvejet jord	g	
Jord: tør masse	g	
Rumfang CaCl ₂ -opl. middel	cm ³	
Nominel konc. endelig opl.	µg cm ⁻³	
Analytisk bestemt konc. endelig opl.	µg cm ⁻³	

Princip i anvendt analysemetode:

Kalibrering af analysemetode:

Afprøvet jord:

Temperatur:.....°C

Indirekte

7

--	--

Sekventie

7

Direkte

--	--

Adsorptionstest: udtagne prøver

	Symbol	Enhed	Ekvibrerings-tid		Ekvibrerings-tid		Ekvibrerings-tid		Ekvibrerings-tid	
Prøveglas nr										
Afvejet jord	-	g								
Jord: tør masse	m_{soil}	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	cm^3								
Rumfang 0,01 M CaCl_2 -opl.middel til ekvibrering af jord		cm^3								
Rumfang stamopløsning		cm^3								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3								
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Masse af prøvestof ved testens begyndelse	m_0	μg								
Efter omrøring og centrifugering										
Indirekte metode										
Parallele metode										
Koncentration af prøvestof i vandig fase inkl. korrektion f. blindværdi	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Sekventielle metode										
Målt masse af prøvestof i prøve V_a^A	$m_{\text{m}}^{\text{ads}}(t_i)$	μg								
Direkte metode										
Masse af prøvestof adsorberet på jord	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(t_i)$	μg								
Beregning af adsorption										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_d	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_{oc}	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold, (105° C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionstest: blindprøver og kontrolprøver

	Symbol	Enhed	Blindprøve		Blindprøve		Kontrolprøve	
Glas nr.								
Afvejet jord	-	g					0	0
Mængde vand i afvejet jord (beregnet)		cm ³					-	-
Tilsat rumfang 0,01 M CaCl ₂ -opløsning		cm ³						
Tilsat rumfang stamopløsning af prøvestof		cm ³	0	0				
Samlet rumfang vandig fase (beregnet)		cm ³					-	-
Begyndelseskonzentration af prøvestof i vandig fase		µg cm ⁻³						
Efter omrøring og centrifugering								
Konzentration i vandig fase		µg cm ⁻³						

Bemærkning: tilføj flere kolonner om nødvendigt

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105°C 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Massebalance

	Symbol	Enhed				
Prøveglass nr.						
Afvejet jord	-	g				
Jord: tør masse	m_{jord}	g				
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	ml				
Rumfang 0,01 M CaCl_2 -opl.middel til ekvilibrering af jord		ml				
Rumfang stamopløsning		cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3				
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Ekvilibreringstid	-	h				
Efter omrøring og centrifugering						
Koncentration af prøvestof i vandig fase ved adsorptionsligevægt inkl. blindværdikorrektion	$C_{\text{ad}}^{\text{eq}}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Ekvilibreringstid	t_{eq}	h				
1. fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang vandig fase	V_{rec}	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	ΔV	cm^3				
1. ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddel	S_{E1}	var.				
Konc. prøvestof i opl.middel	C_{E1}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E1}	μg				
2. fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang opløsningsmiddel	ΔV_s	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	vV'	nm^3				
2. ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddelfase	S_{E2}	var.				
Konc. prøvestof i opl.middel	C_{E2}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E2}	μg				
Samlet masse prøvestof ekstraheret i to trin	m_{E}					
Massebalance	MB	%				

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Tørstofmasseindhold af jord (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionsisotermer

	Symbol	Enhed								
Prøveglass nr.										
Afvejet jord	-	g								
Jord: tør masse	E	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{ws}	cm ³								
Rumfang 0,01 M CaCl ₂ -opl.middel til ekvibrering af jord		cm ³								
Tilsat rumfang stamopløsning		cm ³								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jorden (beregnet)	V_0	cm ³								
Koncentration, opløsning	C_0	µg cm ⁻³								
Ekvibreringstid	-	h								
Efter omrøring og centrifugering										
Stofkoncentration, vandig fase Inkl. blindkorrektion	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm ⁻³								
Temperatur		°C								
Adsorb. masse pr. enhed jord	$C_s^{ads}(eq)$	µg g ⁻¹								

Regressionsanalyse:

størrelse af K_F^{ads} :

størrelse af $1/n$:

regressionskoefficient r^2 :

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold, (105° C, 12 h).....%

Temperatur:.....°C

Anvendt analysemetodik:

Indirekte

☐

Parallel

☐

Sekventie

1

☐

Desorptionstest

	Symbol	Enhed	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval
Prøveglaas nr. fra adsorptionstrin						
Masse af stof adsorberet til jord ved adsorptionsligevægt	$m_s^{ads}(eq)$	μg				
Fjernet rumfang vandig fase, erstattet med 0,01 M $CaCl_2$	V_R	cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i berøring med jorden	PM V_0	cm^3				
	SM V_T	cm^3				
Masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning	m_{aq}^A	μg				
Desorptionskinetik						
Målt masse stof desorberet fra jorden til tiden t_i	$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof	PM V_R^i	cm^3				
	nSM v_a^D	ncm^3				
Masse stof desorberet fra jorden til tiden t_i (beregnet)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Masse stof desorberet fra jorden i tidsintervallet Δt_i (beregnet)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
Desorptionsprocent						
Desorption til tiden t_i	D_{t_i}	%				
Desorption til tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Tilsyneladende desorptionskoefficient	K_{des}					

PM: Parallele metode

SM: Sekventielle metode

C.19. BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{oc}) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG121 (2000).

1.1 INDLEDNING

Stoffers sorptionsegenskaber i jord og kloakslam kan beskrives ved parametre, som bestemmes eksperimentelt med prøvemethode C18. En vigtig parameter er adsorptionskoefficienten, der defineres som forholdet mellem stoffets koncentration i jord/slam og stoffets koncentration i den vandige fase ved adsorptionsligevægt. Adsorptionskoefficienten normaliseret efter jordens organiske kulstofindhold, K_{oc} , er nyttig som indikator for et kemisk stofs bindingsevne til organisk materiale i jord og kloakslam og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Denne parameter kan bestemmes ved korrelering med vandopløseligheden og fordelingskoefficienten i n-oktanol/vand (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes HPLC til bestemmelse af adsorptionskoefficienten K_{oc} i jord og i kloakslam (8). De derved beregnede værdier er mere pålidelige end dem, der bygger på QSAR-beregninger (9). Som beregningsmetode kan den ikke helt erstatte batch-ligevægtsforsøgene i prøvemethode C18. Den beregnede K_{oc} -værdi kan imidlertid være nyttig ved valg af passende testparametre til adsorptions-/desorptionsundersøgelser med prøvemethode C.18 gennem beregning af K_d (fordelingskoefficient) eller K_f (Freundlich adsorptionskoefficient) efter ligning 3 (jf. afsnit 1.2).

1.2 DEFINITIONER

K_d : Fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne C af et opløst prøvestof i et tofasesystem bestående af et sorptionsmiddel (jord eller kloakslam) og en vandig fase; den er dimensionsløs, når koncentrationerne i begge faser udtrykkes på w/w basis. Angives koncentrationen i den vandige fase på vægt/volumen basis, bliver enheden $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. K_d kan variere med absorptionsmidlets egenskaber og kan være koncentrationsafhængig.

$$K_d = \frac{C_{\text{soil}}}{C_{\text{aq}}} \text{ or } \frac{C_{\text{sludge}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

hvor:

C_{soil} = ligevægtskoncentration af prøvestof i jord ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{sludge} = ligevægtskoncentration af prøvestof i slam ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

K_f : Freundlich adsorptionskoefficienten defineres som prøvestoffets koncentration i jord eller kloakslam (x/m) når ligevægtskoncentrationen C_{aq} i den vandige fase er lig én; enheden er µg·g⁻¹ adsorptionsmiddel. Størrelsen kan afhænge af adsorptionsmidlets egenskaber.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

hvor:

x/m = mængde prøvestof x (µg) adsorberet på en mængde adsorptionsmiddel m (g) ved ligevægt

1/n = Freundlich adsorptionsisotermens hældning

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase (µg · ml⁻¹)

$$\text{Ved } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Fordelingskoefficient (K_d) eller Freundlich adsorptionskoefficient (K_f), normaliseret efter adsorptionsmidlets organiske kulstofindhold (f_{oc}); denne er navnlig for uioniserede kemiske stoffer en vigtig indikator for størrelsen af adsorptionen mellem et stof og adsorptionsmidlet og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Alt efter dimensionen af K_d og K_f kan K_{oc} være dimensionsløs eller have enheden ml · g⁻¹ eller µg · g⁻¹ organisk stof.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} (\text{dimensionless or ml} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (3)$$

Forholdet mellem K_{oc} og K_d er ikke altid lineært, således kan K_{oc}-værdierne variere fra jordtype til jordtype, dog med langt mindre variabilitet end K_d eller K_f.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc}) afledes af kapacitetsfaktoren (k') ved hjælp af en kalibreringskurve over log k' som funktion af log K_{oc} for de valgte referencestoffer.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

hvor:

t_R : HPLC-retentionstiden for prøve- og referencestof (minutter)

t₀: HPLC-dødtid (minutter) (se afsnit 1.8.2).

P_{ow}: Oktanol-vand fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem koncentrationerne af opløst stof i n-oktanol og vand; den er dimensionsløs.

$$P_{ow} = \frac{C_{oc \text{ tan ol}}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

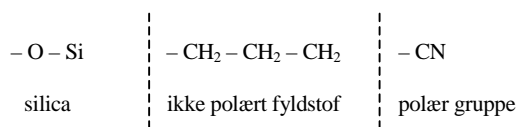
1.3 REFERENCESTOFFER

Før metoden anvendes, bør man kende strukturformel, renhed og eventuel dissociationskonstant. Det er nyttigt at kende opløselighed i vand og organiske opløsningsmidler, oktanol-vand fordelingskoefficient og hydrolyseegenskaber.

Før at korrelere de målte HPLC-retentionsdata for et prøvestof med dets adsorptionskoefficient K_{oc} må der opstilles en kalibreringskurve over $\log K_{oc}$ som funktion af $\log k'$. Der kræves mindst seks referencepunkter, heraf mindst ét over og ét under den forventede værdi for prøvestoffet. Metodens nøjagtighed kan forbedres væsentligt ved at anvende referencestoffer, som er strukturmæssigt beslægtet med prøvestoffet. Foreligger sådanne data ikke, er det op til brugeren at vælge passende kalibreringsstoffer. I så fald bør der vælges et mere generelt sæt strukturmæssigt forskelligartede stoffer. De stoffer og K_{oc} -værdier, som kan anvendes, er i bilaget angivet i tabel 1 for kloakslam og tabel 3 for jord. Valg af andre kalibreringsstoffer bør begrundes.

1.4 PRØVEMETODENS PRINCIP

Der udføres HPLC på analysekolonner pakket med en gængs cyanopropyl-faststoffase med både lipofile og polære grupper. Der anvendes en moderat polær stationær fase baseret på silicamatrix:



Prøvemethodens princip svarer til prøvemethode A.8 (fordelingskoefficient, HPLC-metode). Når prøvestoffet føres gennem kolonnen sammen med den mobile fase, reagerer prøvestoffet med den stationære fase. Prøvestoffets fordeling mellem mobil og stationær fasebevirker, at det bliver forsinket. Den stationære fases dobbelte sammensætning med både polære og upolære bindingssteder giver mulighed for interaktion med de polære og ikke-polære grupper i et molekyle på samme måde som det er tilfældet for et organisk stof i en grundsubstans af jord eller kloakslam. Derved er det muligt at fastlægge forholdet mellem retentionstiden på søjlen og adsorptionskoefficienten på organisk materiale.

pH har væsentlig indflydelse på sorptionsegenskaberne, navnlig af polære stoffer. I landbrugsjord og i tanke i spildevandsbehandlingsanlæg ligger pH normalt mellem 5,5 og 7,5. For ioniserbare stoffer bør der udføres to forsøg med både den ioniserede og den ikke-ioniserede form i passende bufferopløsninger, dog kun når mindst 10 % af prøvestoffet er dissocieret ved pH mellem 5,5 og 7,5.

Da vurderingen alene bygger på forholdet mellem retentionen på HPLC-kolonnen og adsorptionskoefficienten, er en kvantitativ analysemetode unødvendig, og kun retentionstiden behøver bestemmes. Hvis man råder over et egnet sæt referencestoffer og kan anvende standardiserede forsøgsbetingelser, er dette en hurtig og effektiv metode til at få et skøn over adsorptionskoefficienten K_{oc} .

HPLC-metoden kan anvendes på kemiske stoffer (mærkede eller umærkede), til hvilke der findes et egnet detektionssystem (f.eks. spektrofotometer, strålingsdetektor), og som er tilstrækkeligt stabile inden for forsøgsvarigheden. Den kan især være nyttig for kemiske stoffer, som er vanskelige at undersøge i andre eksperimentelle systemer (f.eks. stoffer som er flygtige eller hvis vandopløselighed er for ringe til at give målelige koncentrationer, og stoffer med høj affinitet til inkuberingsystemernes overflade). Metoden er anvendelig til blandinger, som giver dårligt adskilte elueringsbånd. I så fald bør øvre og nedre grænse for $\log K_{oc}$ -værdierne af stofferne i testblandingen angives.

Urenheder kan undertiden vanskeliggøre fortolkningen af HPLC-resultater, men er dog af underordnet betydning, når blot prøvestoffet kan identificeres sikkert ad analytisk vej og kan adskilles fra urenhederne.

Metoden er valideret for de stofferne i tabel 1 i bilaget og er endvidere anvendt på en række andre kemiske stoffer i følgende grupper:

- aromatiske aminer (f.eks. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naphthylamin);
- aromatiske carboxylsyreestere (f.eks. benzoesyremethylester, 3,5-dinitrobenzoesyreethylester);
- aromatiske carbonhydrider (f.eks. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen);
- aryloxyphenoxypropionsyreestere (f.eks. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);
- benzimidazol- og imidazol-fungicider (f.eks. carbendazim, fuberidazol, triazoxid);
- carboxylsyreamider (f.eks. 2-chlorbenzamid, N,N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid);
- chlorerede carbonhydrider (f.eks. endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, quintozen, 1,2,3-trichlorbenzen);
- insekticider af typen organiske fosforforbindelser (f.eks. azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos);
- phenoler (f.eks. phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, pentachlorphenol, 2,4,6-trichlorphenol, 1-naphthol);
- derivater af phenylurinstof (f.eks. isoproturon, monolinuron, pencycuron);
- pigmentfarvestoffer f.eks. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polyaromatiske carbonhydrider (f.eks. acenaphthen, naphthalen);
- 1,3,5-triazin-herbicider (f.eks. prometryn, propazin, simazin, terbutryn);
- triazolderivater (f.eks. tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoden er ikke anvendelig til stoffer, som reagerer enten med eluenten eller den stationære fase. Den er ligeledes ikke anvendelig til stoffer, som udviser specifik interaktion med uorganiske komponenter (f.eks. kompleksdannelse med lerminerale). Metoden virker ikke nødvendigvis på overfladeaktive stoffer, uorganiske stoffer og middelstærke til stærke organiske syrer og baser. $\log K_{oc}$ -værdier mellem 1,5 og 5,0 kan bestemmes. Til bestemmelse af ioniserbare stoffer må anvendes en bufret mobil fase, men der må tages forholdsregler til undgåelse af udfældning af bufferkomponenter eller prøvestof.

1.6 KVALITETSKRITERIER

1.6.1 Nøjagtighed

Normalt kan adsorptionskoefficienten af et prøvestof bestemmes inden for $\pm 0,5$ logaritmeenhed af den tilsvarende værdi bestemt ved batch-ligevægtsmetoden (se tabel 1 i bilaget). Bedre nøjagtighed kan opnås, hvis de anvendte referencestoffer er strukturelt beslægtet med prøvestoffet.

1.6.2 Repeterbarhed

Bestemmelserne skal foretages mindst som dobbeltbestemmelser. $\log K_{oc}$ -værdier baseret på enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed indbyrdes.

1.6.3 Reproducerbarhed

De hidtidige erfaringer med anvendelsen af metoden underbygger dens validitet. En undersøgelse af HPLC-metoden på 48 stoffer (hovedsagelig pesticider), for hvilke der forelå pålidelige data vedrørende K_{oc} i jord, resulterede i en korrelationskoefficient på $R = 0,95$ (10) (11).

Der er gennemført en sammenlignende laboratorieundersøgelse med 11 deltagende laboratorier med henblik på at forbedre og validere metoden (12). Resultaterne er gengivet i tabel 2 i bilaget.

1.7 BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.7.1 Indledende skøn over adsorptionskoefficienten

Oktanolvand fordelingskoefficienten P_{ow} ($= K_{ow}$) og, i nogen udstrækning, vandopløseligheden, kan - navnlig for uioniserede stoffer - benyttes som indikatorer for adsorptionsgraden og således bruges til indledende afgrænsning af området. Der er udgivet en række nyttige korrelationer for forskellige grupper af kemiske stoffer (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 Apparatur

Der anvendes en væskerkromatograf forsynet med en impulsfri pumpe og en egnet detektor. Det anbefales at bruge en injektionsventil med injektionssløjfe. Der anvendes gængse kemisk bundne cyanopropyl-harpikser på silicabasis (f.eks. Hypersil og Zorbax CN). En forkolonne af samme materiale kan placeres mellem injektionssystem og analysekolonne. Kolonner fra forskellige leverandører kan variere betydeligt i adskillelsesevne. Vejledende skal man opnå følgende kapacitetsfaktorer k' : $\log k' > 0,0$ for $\log K_{oc} = 3,0$ og $\log k' > -0,4$ for $\log K_{oc} = 2,0$ ved anvendelse af en mobil fase bestående af methanol/vand 55/45 %.

1.7.3 **Mobile faser**

Der er afprøvet forskellige mobile faser, og følgende to anbefales:

- methanol/vand (55/45% v/v)
- methanol/0,01M citratbuffer pH 6.0 (55/45% v/v)

Til fremstilling af elueringsvæsken anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret vand eller citratbuffer. Blandingen afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Er methanol/vand blandinger ikke egnede, kan andre blandinger af organiske opløsningsmidler og vand anvendes, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand. For ioniserbare stoffer anbefales at pH stabiliseres med bufferopløsning. Der må træffes foranstaltninger til at undgå saltudfældning og tæring af kolonnen, som kan forekomme ved visse blandinger af organisk fase og buffer.

Der må ikke anvendes additiver som f.eks. ionparreagenser, da de kan påvirke sorptionsegenskaberne af den stationære fase. Sådanne ændringer af den stationære fase kan være irreversible. Af denne grund er det ubetinget nødvendigt, at eventuelle forsøg med additiver udføres på separate kolonner.

1.7.4 **Opløste stoffer**

Prøve- og referencestoffer opløses i den mobile fase.

1.8 **UDFØRELSE AF FORSØGET**

1.8.1 **Prøvningsbetingelser**

Temperaturen bør registreres under af målingerne. Det anbefales stærkt, at kolonnenrummet er temperaturreguleret for at sikre konstante betingelser under kalibrerings- og overslagsforsøg og måling af prøvestoffet.

1.8.2 **Bestemmelse af dødtid t_0**

Til bestemmelse af dødtiden t_0 kan anvendes to forskellige metoder (se også afsnit 1.2).

1.8.2.1 *Bestemmelse af dødtiden t_0 ved hjælp af en homolog serie*

Denne fremgangsmåde har vist sig give pålidelige og ensartede t_0 -værdier. Nærmere enkeltheder herom kan findes i prøvemethode A.8: Fordelingskoefficient (n-oktanol/vand), HPLC-metode.

1.8.2.2 *Bestemmelse af dødtid t_0 ved hjælp af inaktive stoffer, som ikke tilbageholdes af kolonnen.*

Teknikken bygger på, at der indsprøjtes en opløsning af formamid, urinstof eller natriumnitrat. Bestemmelserne skal udføres mindst som dobbeltbestemmelser.

1.8.3 Bestemmelse af retentionstider t_R

Referencestoffer vælges som beskrevet i afsnit 1.3. Til bestemmelse af disse stoffers retentionstid kan de indsprøjtes som en blandet standard, forudsat at det er godtgjort, at retentionstiden for den enkelte referencestandard er upåvirket af tilstedeværelsen af de andre referencestandarder. Kalibrering skal ske med regelmæssige intervaller mindst to gange dagligt for at tage højde for eventuelle uventede ændringer i kolonnens præstationer. Det bedste er at udføre kalibreringsindsprøjtningerne før og efter indsprøjtning af prøvestoffet for at bekræfte, at retentionstiderne er uændrede. Prøvestofferne indsprøjtes separat i mindst mulig mængde (undgå overbelastning af kolonnen), og deres retentionstider bestemmes.

For at gøre målingerne mere pålidelige bør de udføres mindst som dobbeltbestemmelser. Log K_{oc} -værdier afledt af enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed fra hinanden.

1.8.4 Bedømmelse

Kapacitetsfaktorerne k' beregnes af dødtiden t_0 og retentionstiderne t_R for de valgte referencestoffer efter ligning 4 (se afsnit 1.2). Log k' -værdierne for referencestofferne afbildes derefter mod de tilhørende log K_{oc} -værdier fra batchlige vægtsforsøgene, som er givet i tabel 1 og 3 i bilaget. Ved hjælp af denne kurve anvendes log k' -værdien for et prøvestof derefter til beregning af dets K_{oc} -værdi. Viser de faktiske resultater, at log K_{oc} for prøvestoffet er uden for kalibreringsområdet, bør forsøget gentages med et andet, mere velegnet referencestof.

2. DATA OG RAPPORTERING

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

- identitet og renhed af prøve- og referencestof, samt pK_a -værdi hvis relevant;
- beskrivelse af apparatur og forsøgsbetingelser, f.eks. type og dimension af analysekolonne (og forkolonne), detektionsmåde, mobil fase (forholdet mellem komponenterne, samt pH), temperaturområde under målingerne;
- dødtiden og metoden anvendt til bestemmelse heraf;
- mængde prøve- og referencestof, som indføres i kolonnen;
- retentionstiderne for de referencestoffer, der anvendes til kalibrering;
- enkeltheder vedrørende den tilnærmede regressionslinje (log k' mod log K_{oc}) og grafisk fremstilling af regressionslinjen;
- gennemsnitlig retention og beregnet log K_{oc} -værdi for prøvestoffet;
- kromatogrammer.

3. **HENVISNINGER**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, kap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

BILAG

Tabel 1

**Sammenligning af K_{oc} -værdier for jordarter og kloakslam,
samt værdier beregnet ved HPLC-screeningsmetoden^{1,2}**

stof	CAS-nr.	log K_{oc} kloakslam	log K_{oc} ved HPLC	Δ	log K_{oc} for jordtype r	log K_{oc} ved HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoesyrephenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

¹ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Tabel 2

**Resultater af det laboratoriesammenlignende forsøg (11 deltagende laboratorier),
som er gennemført med henblik på at forbedre og validere HPLC-metoden¹**

stof	CAS-nr.	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC-metode]	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

Tabel 3

**Anbefalede referencestoffer til HPLC-screeningsmetoden
baseret på jordadsorptionsdata.**

Referencestof	CAS-nr.	gennemsnitlige log K _{oc} - værdier fra batchligevægt	nummer på K _{oc} data	log S.D.	kilde
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	a
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	b
N,N-dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	a
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	a
Methylbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	a
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	c
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	c
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	b
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	a
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	b
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	c
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	c
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	c
Naphthalen	91-20-3	2,75	4	2,20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	a
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	a
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	a
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	c
Phenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	a
DDT	50-29-3	5,63	1	–	b

- /a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
- /b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
- /c/ Data stillet til rådighed af industrien.

C.20 *Daphnia magna* FORMERINGS-TEST

1. METODE

Denne testmetode, der undersøger kemikaliers toksiske indflydelse på formeringsevnen, svarer til OECD TG 211 (1998)

1.1 INTRODUKTION

Det primære mål for testen er at vurdere kemikaliers indvirkning på *Daphnia magna*s formeringsevne.

1.2 DEFINITIONER OG ENHEDER

Forældregenerationen er de hundafnier, som er til stede ved testens begyndelse og hvis formeringsevne er genstand for undersøgelsen.

Afkom er de dafnier, der er født af forældregenerationen under testen.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste kemikalie-koncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant indflydelse ($p < 0,05$) på formeringen og dødelighed for forældregenerationen inden for den fastlagte eksponeringstid, sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Hvis ikke disse to krav opfyldes, skal der gøres fuldstændigt rede for fastlæggelsen af LOEC (og dermed NOEC).

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en fastlagt eksponeringstid.

EC_x er den koncentration af test-kemikaliets opløst i vand, som resulterer i en X procent reduktion i formeringen af *Daphnia magna* inden for en fastlagt eksponeringstid.

Den sande formeringshastighed er det mål for vækst, der integrerer formering og den aldersbetingede dødelighed (20) (21) (22). I en 'steady state' population vil den være lig nul. For populationer i vækst vil den være positiv og for populationer, der mindskes, vil den være negativ. Det er klart, at den sidste situation er uholdbar og vil ende med udslettelse af populationen.

Den påviselige grænseværdi er den laveste koncentration, der ses at have effekt, men som ikke kan kvantiteres.

Den målelige grænseværdi er den laveste koncentration, der kan kvantiteres.

Mortalitet: et dyr anses for værende dødt, når det ikke kan bevæge sig, dvs. når det ikke er i stand til at svømme, eller hvis der ikke ses bevægelser af vedhæng eller postabdomen inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af undersøgelsesbeholderen, (Hvis en anden definition anvendes, skal det meddeles sammen med dets reference).

1.3 PRINCIPPET FOR TESTMETODEN

Unge hundafnier (forældregenerationen), yngre end 24 timer ved testens begyndelse, udsættes for test-kemikaliet opløst i vand i en række koncentrationer. Testens varighed er 21 dage. Ved testens afslutning vurderes det totale antal efterkommere efter den stadig levende forældregeneration. Det betyder, at afkom af dafnier, der er døde i løbet af testen, ikke inkluderes i beregningerne. Forældregenerationens formeringsevne kan udtrykkes på andre måder, (fx antal levende efterkommere pr moderdyr fra den første dag afkom blev observeret) men skal rapporteres sammen med det totale antal afkom frembragt pr levende moderdyr ved testens afslutning. Formeringsevnen for de dyr, der blev eksponeret for test-kemikaliet, sammenlignes med formeringsevnen i kontrollen/kontrollerne for at fastlægge den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og dermed koncentrationen uden observeret effekt (NOEC). Så vidt muligt skal data desuden analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at vurdere de koncentrationer, der ville forårsage en x % reduktion i formeringsevnen (dvs. EC_{50} , EC_{20} eller EC_{10}).

Forældregenerationens overlevelse og tiden indtil den første yngel skal også meddeles. Andre effekter af kemikaliet på parametre såsom vækst (dvs. længde) og eventuelt den sande formeringshastighed kan tænkes undersøgt.

1.4 INFORMATION OM TEST-KEMIKALIET.

Resultatet fra en akut toksicitets-test (se Metode C.2, Del I) udført med *Daphnia magna* bør være tilgængelig. Resultatet kan være nyttigt for valget af en passende række af test-koncentrationer i formeringstestene. Opløseligheden i vand og test-kemikaliets damptryk bør være kendt ligesom en pålidelig analytisk metode til kvantitering af kemikaliet i test-opløsningerne med angivelse af effektivitet med hensyn til genfinding og den målelige grænseværdi.

Data for test-kemikaliet, som kan være nyttige for at fastslå test-betingelserne, inkluderer strukturformel, stoffets renhed, lysstabilitet, stabilitet i test-forløbet, pKa, Pow og resultater af test for spontan nedbrydning (se Metode C.4)

1.5 TESTENS VALIDITET

Hvis en test skal være valid skal følgende resultat-krav opfyldes af kontrollen/kontrollerne:

- forældregenerationens mortalitet (hundafnier) må ikke overstige 20 % ved afslutning af testen;
- det gennemsnitlige antal levende afkom pr overlevende forældre-hundafnie ved testens afslutning er ≥ 60

1.6 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1 Apparat

Bægerglas og andet apparatur, der kommer i kontakt med test-opløsningerne skal være fremstillet af rent glas eller andet kemisk inert materiale. Karrene til undersøgelsen vil almindeligvis være af glas.

Yderligere nødvendigt apparatur kan være følgende:

- Iltmålingsapparat (med mikroelektrode eller andet passende udstyr til måling af ilt i små volumina);
- fyldestgørende apparatur til temperaturkontrol;
- pHmeter;
- apparatur til måling af vands hårdhedsgrad;
- apparatur til måling af total koncentrationen af organisk kulstof (TOC) i vand eller apparatur til bestemmelse af det kemiske iltbehov (COD);
- fyldestgørende apparatur til kontrol af lys-regime og måling af lys-intensitet.

1.6.2

Test-organisme

Den art, der skal benyttes i testen, er *Daphnia magna* Straus. Andre arter af dafnier kan anvendes, under forudsætning af at de på passende måde opfylder validitets-kriterierne. (Det relevante validitets-kriterium for dafniearten er formeringsevnen, som den ses i kontrollerne). Hvis der anvendes andre dafniearter, skal de klart defineres og brugen af dem begrundes. En genotypebestemmelse som identifikation af arten vil være at foretrække. Undersøgelser (1) har vist, at formeringsevnen af Klon A (som stammer fra IRCHA) i Frankrig (3) er stabil med hensyn til det relevante validitets-kriterium med sit gennemsnit på ≥ 60 stk. afkom pr forældre-dafnie, der overlever ved de dyrkningsbetingelser, som nærværende metode beskriver. Andre kloner er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafnie-kulturen opfylder validitets-kriterierne for en test.

Ved testens begyndelse skal dyrene være yngre end 24 timer og må ikke være først udrugede afkom. De skal være efterkommere af en sund population (dvs. uden tegn på stress, såsom høj mortalitet, tilstedeværelse af handyr og ephippier, forsinkelse i fremkomst af første udrugede afkom, misfarvning osv.) De dyr, der siden skal levere forsøgsdyr, skal dyrkes under betingelser (lys, temperatur, medium, fodring og antal dyr pr volumenenhed) der svarer til dem, der anvendes i testen. Hvis dafnierne rutinemæssigt lever i et andet medium end det, der anvendes i testen, er det god praksis at inkludere en prætest-akklimatiseringsperiode på normalt 3 uger (dvs. en generation) for at undgå at stresse forældregenerationen.

1.6.3

Test-medie

Det anbefales at anvende et veldefineret medium i denne test. Derved undgås brugen af additiver (fx tang, udtræk af jord) som er vanskeligt at karakterisere, men derimod at forbedre muligheden for standardisering laboratorierne imellem. Elendt M4 (4) og M7 media (se bilag 1) er fundet velegnede til dette formål. Andre media kan imidlertid også bruges (fx (5) (6)), forudsat at dafnie-kulturen opfylder testens validitets-kriterier.

Hvis der anvendes medier, der indeholder udefinerede tilsætningsstoffer, skal disse klart specificeres og der skal fremskaffes oplysninger til test-rapporten om sammensætning, særlig med hensyn til kulstofindholdet, da det kan optræde som tilskud til diæten. Det anbefales at fastlægge det totale organiske kulstof- (TOC) og/eller kemiske iltkrav (COD) til det organiske additiv i stamopløsningen, og at der foretages en vurdering af det medfølgende tilskud til TOC/COD i test-mediet. Det anbefales, at niveauet af TOC i mediet (før tilsætning af alger) er under 2 mg/l (7).

Det er vigtigt at gøre sig klart i forbindelse med undersøgelse af kemikalier, der indeholder metaller, at test-mediets egenskaber (fx hårdhed, chelerings- kapacitet) kan have indflydelse på test-kemikaliet toksicitet. Af den grund er et fuldtud defineret medium ønskværdigt. For tiden er de eneste fuldtud definerede media, som er egnede til langtidskulturer med *Daphnia magna* Elendt M4 og M7. Begge indeholder EDTA som cheleringsmiddel. Work har påvist (2), at cadmiums tilsyneladende toksicitet generelt er lavere, når formerings-testen udføres med M4 og M7 end med media uden EDTA. Af den grund er M4 og M7 ikke at anbefale, når der skal undersøges kemikalier indeholdende metaller, ligesom andre media kendt for at have chelerende stoffer bør undgås. Til kemikalier, der indeholder metaller, tilrådes brugen af andre media som fx hårdt ferskvand tilsat ASTM (7), som ikke indeholder EDTA, hvortil sættes ekstrakt af tang (8). Denne kombination af hårdt ferskvand tilsat ASTM med ekstrakt af tang er også velegnet til langtidskulturer og undersøgelse af *Daphnia magna* (2), endskønt den udøver en let chelerende effekt på grund af den organiske komponent i den tilsatte tangekstrakt.

Under hele testen bør koncentrationen af opløst ilt være over 3 mg/l. pH bør være inden for 6-9 og normalt ikke variere mere end 1,5 enheder. Hårdhed over 140 mg/l (målt som CaCO₃) anbefales. Tests på dette niveau og derover har vist formeringsevne i overensstemmelse med validitets-kriterierne (9) (10).

1.6.4

Test-opløsninger

Test-opløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør almindeligvis fremstilles ved opløsning af de relevante kemikalier i test-mediet.

Brugen af organiske opløsningsmidler eller dispergenser er i nogle tilfælde nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning, men alle anstrengelser bør tages i anvendelse for at undgå brugen af sådanne materialer. Eksempler på passende opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylformamide og triethylene glycol. Eksempler på dispergenser er Cremophor RH40, methylcellulose 0.01 % og HCO-40. Under alle omstændigheder bør test-kemikaliets i test-opløsningen ikke overskride graden af opløselighed i test-mediet.

Opløsningsmidler anvendes til fremstilling af en stamopløsning, som kan doseres i vand med stor nøjagtighed. Med den anbefalede koncentration af opløsningsmiddel i det endelige test-medium (dvs. (0,1 ml/l)), vil de ovenfor nævnte opløsningsmidler ikke være toksiske og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

Dispergenser funktion er at hjælpe til med en nøjagtig dosering og dispersion. Med den anbefalede koncentration af dispergens i det endelige test-medium (dvs. (0,1 ml/l)), vil de ovenfor nævnte dispergenser ikke være toksiske og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

1.7

TESTENS DESIGN

Tilsætning til måleglassene og de påfølgende håndteringer af dem bør foretages på en randomiseret måde. Hvis dette ikke gøres, risikerer man bias, som kunne opfattes som resultatet af forskellige koncentrationer. Helt specielt kan dette ses, hvis undersøgelsesrækker håndteres systematisk efter behandling eller koncentrationer, at tidsrelaterede resultater, som fx person-træthed eller anden fejlmulighed, kan medføre større effekt ved de højere koncentrationer. Yderligere, hvis test-resultaterne kan tænkes påvirkede af begivenheder ved testens start eller af omgivelserne, som fx karrenes placering i laboratoriet, bør man overveje at dele testen op i grupper.

1.8

FREM GANGSMÅDE

1.8.1

Omstændigheder ved ekspositionen

1.8.1.1

Varighed

Testen varer 21 dage.

1.8.1.2

Påfyldning

Moderdyrene holdes individuelt med 1 dyr pr måleglas med 50-100 ml medium i hvert måleglas.

Af hensyn til målinger af koncentrationen af test-kemikaliets kan større volumina være nødvendige; det er dog tilladt at foretage den kemiske analyse på en pulje sammensat fra flergangsbestemmelser. Hvis der anvendes volumina større end 100 ml, kan det være nødvendigt at øge fødemængden for at sikre tilstrækkelig fødetilgang for dafnien og overensstemmelse med validitets-kriterierne. Hvis der anvendes gennemstrømnings-tests, kan det af tekniske grunde være nødvendigt med alternative designs (fx fire grupper med 10 dyr i et større test-volumen, men enhver ændring i test-design skal meddeles.

1.8.1.3 *Antal dyr*

Ved semi-statistiske tests skal der være mindst 10 dyr, hver holdt separat, for hver test-koncentration og mindst 10 dyr, hver holdt separat, i kontrolserien.

Det har ved gennemstrømnings-tests vist sig passende med 40 dyr opdelt i grupper med 10 dyr for hver test-koncentration (1). Man kan anvende et mindre antal test-organismer og der anbefales da et minimum på 20 dyr pr koncentration opdelt i dobbelt- eller flergangsbestemmelser med et tilsvarende antal dyr (fx fire bestemmelser med hver 5 dafnier). Det bemærkes, at ved tests, hvor dyrene holdes gruppevis, vil det ikke være muligt at udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende efterkommere frembragt for hvert levende forældredyr, dersom forældredyr dør i løbet af forsøget. I de tilfælde bør man udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende afkom pr forældredyr som var i live ved testens begyndelse.

1.8.1.4 *Fodring*

I semi-statistiske forsøg bør fodring foretages daglig eller i hvert fald tre gange ugentlig (dvs. i sammenhæng med udskiftning af medium). Afvigelser fra dette (fx for gennemstrømnings-tests) skal meddeles.

Under forsøget bør diæten for forældredyr fortrinsvis være levende algeceller af en eller flere af følgende: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (nu *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) and *Scenedesmus subspicatus*. Den tilførte diæt skal baseres på mængden af organisk kulstof (C) for hvert forældredyr. Undersøgelser (12) har vist, at for *Daphnia magna* er det tilstrækkeligt med foder mængder af størrelsesordenen 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn med henblik på det ifølge validitets-kriterierne ønskede antal afkom. Foder mængden kan enten være konstant gennem hele forsøgsperioden eller, om det ønskes, kan der gives en lavere mængde til at begynde med og siden lade mængden forøges for at tage hensyn til forældredyrets vækst under forløbet. I sidstnævnte tilfælde bør foder mængden i hele perioden stadig være inden for de anbefalede mængder på 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn.

Måling af kulstofindhold er tidsrøvende, men hvis erstatningsmålinger, som fx celletal af alger eller lysabsorption anvendes for nemheds skyld for at afmåle den korrekte fødemængde, må hvert laboratorium fremstille et nomogram som sammenholder erstatningsmålingen med kulstofindholdet i algekulturen (se bilag 2 for rådgivning om konstruktion af nomogram). Nomogrammer skal kontrolleres mindst en gang årligt og hyppigere, hvis betingelserne for algerne er ændrede. Det er vist, at lysabsorption er en bedre erstatning end celletælling til beregning af kulstofindhold (13).

Man bør tilføre Dafnierne algesuspensionen i koncentreret form, således at mindst muligt af alge kulturmediet overføres til forsøgsskarret. Opkoncentrering af alger kan foretages ved centrifugering efterfulgt af resuspension i destilleret vand eller dejoniseret vand eller dafniekulturmedium.

1.8.1.5 *Lys*

16 timers lys med en intensitet, der ikke overstiger $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatur*

Test-mediets temperatur skal ligge mellem 18 og 22 °C I det enkelte forsøg bør temperaturen, om muligt, ikke variere mere end 2 °C (fx 18-20, 19-21 eller 20-22 °C). Det kan være på sin plads at anvende et forsøgsskar yderligere til brug for temperatur-monitoreringen.

1.8.1.7 *Gennemluftning*

Måleglassene må ikke gennemluftes under forsøget.

1.8.2

Test-koncentrationer

Normalt bør der være mindst 5 test-koncentrationer arrangeret i en geometrisk række med en adskillelsesfaktor, som helst ikke bør overstige 3,2, og der skal udføres det passende antal af flergangsbestemmelser for hver test-koncentration (se sektion 1.8.1.3) Begrundelse skal angives, hvis færre end 5 koncentrationer undersøges. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger opløseligheden i test-mediet.

Når range for koncentrationerne skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:

- i. Hvis formålet er at opnå LOEC/NOEC, den laveste test-koncentration skal være så lav, at frugtbarheden ved denne koncentration ikke adskiller sig signifikant fra kontrollens. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med formindsket laveste koncentration.
- ii. Formålet er at opnå LOEC/NOEC, den højeste test-koncentration bør være så høj, at frugtbarheden ved denne koncentration er signifikant lavere end i kontrollen. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med forøget højeste koncentration.
- iii. Hvis EC_x for indvirkning på formeringsevnen beregnes, er det tilrådeligt at der anvendes tilstrækkeligt mange koncentrationer til at EC_x kan defineres med passende sikkerhed. Hvis EC₅₀ for indvirkning på formeringsevnen beregnes er det tilrådeligt at den højeste test-koncentration er større end den ved EC₅₀. Ellers vil sikkerhedsgrenserne for EC₅₀ blive meget vide, og selvom man kan beregne EC₅₀ er det ikke muligt i tilstrækkelig grad at vurdere om forsøget har været fyldestgørende.
- iv. Range for test-koncentrationerne bør ikke inkludere koncentrationer, der har en statistisk signifikant indflydelse på forældredyrets overlevelse, da det vil ændre undersøgelsens natur fra en simpel formerings-test til en kombineret formerings- og overlevelsesh-test, som stiller krav om mere komplekse statistiske analyser.

Kendskab på forhånd til test-kemikaliet toksicitet (fx fra en hurtig test og/eller fra undersøgelser over range) kan hjælpe til at finde passende test-koncentrationer.

Når et opløsningsmiddel eller et dispergens er anvendt i præparationen af test-opløsningen (se sektion 1.6.4), bør slutkoncentrationen i måleglasset ikke være større end 0,1 ml/l og desuden være den samme i alle måleglassene.

1.8.3

Kontroller

Sideløbende med test-serien bør udføres en test-mediumkontrol og ligeledes, hvis det er relevant, en kontrolserie, som indeholder opløsningsmiddel eller dispergens i koncentrationer som dem, der anvendes i forsøget. Der skal udføres et passende antal flergangsbestemmelser (se sektion 1.8.1.3).

Almindeligvis vil variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal afkom pr forældredyr i kontrollen/kontrollerne i en vellykket test være ≤ 25 og dette skal meddeles fra test-designs, hvor dyrene har været holdt alene.

1.8.4

Fornyelse af medium

Hyppigheden for fornyelse af mediet afhænger af test-kemikaliet stabilitet, men fornyelse bør foretages mindst tre gange om ugen. Hvis man ved fra forudgående stabilitetsundersøgelser, at test-kemikaliet ikke er stabilt (dvs. udenfor range 80-120 % af den nominelle koncentration eller falder under de 80 % af den målte begyndelseskonzentration) og ændrer sig i løbet af den maksimale fornyelsesperiode (dvs. 3 døgn) (se sektion 1.4), bør man overveje at skifte mediet hyppigere eller at gå over til en gennemstrømnings-test.

Når mediet skal fornyes i semi-statiske tests, er der fremstillet en anden række af måleglas og forældredyret flyttes over til dem fx ved hjælp af en glaspipette med en passende diameter. Mindst muligt medium bør overflyttes sammen med dafnien.

1.8.5 **Observationer**

Resultatet af undersøgelser gjort under forsøget skal noteres på data-ark (se eksempler på bilag 3 og 4). Hvis der ønskes andre målinger (se 1.3 og 1.8.8) kan det være nødvendigt med andre undersøgelser.

1.8.6 **Afkom**

Det er bedst dagligt at fjerne og tælle afkom fra hvert forældredyr fra første dag, der ses yngel, for at hindre ynglen i at indtage den føde, der var tiltænkt forældredyret. Undersøgelsens formål kræver kun, at man tæller antal levende afkom, men tilstedeværelsen af aborterede æg eller dødt afkom bør også noteres.

1.8.7 **Mortalitet**

Dødelighed blandt forældredyrene bør noteres dagligt og i hvert fald samtidigt med at afkommet tælles.

1.8.8 **Andre parametre**

Selvom metoden principielt er designet til at vurdere virkning på formeringsevnen, er det muligt, at andre virkninger kan kvantiteres, så der kan foretages statistiske beregninger. Målinger af vækst er særdeles ønskværdige, eftersom de giver informationer om mulige subletale virkninger, som kan tænkes at være mere nyttige end måling alene af formeringsevnen; det anbefales at man ved forsøgets afslutning måler længden af forældredyrene (dvs. kropslængden minus den anale spina). Andre parametre kan måles eller beregnes såsom tiden til fremkomst af den første yngel (og den påfølgende yngel), antal og størrelse af yngel pr dyr, antallet af aborteret yngel, tilstedeværelse af handyr eller ephippier, populationens egentlige formeringshastighed.

1.8.9 **Hyppeghed af analyser og målinger**

Ilt-koncentration, temperatur, hårdhedsgrad og pH-værdier bør måles i hvert fald hver uge i nye og gamle media, i kontroller og i opløsninger med den højeste koncentration af test-kemikaliet.

Mens forsøget løber, måles koncentrationen af test-kemikaliet med regelmæssige intervaller.

I semi-statistiske tests, hvor koncentrationen af test-kemikaliet forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration (dvs. inden for range 80 - 120 % - se 1.4 og 1.8.4), anbefales det som et minimum at måle højeste og laveste test-koncentration ved fremstillingen og i forbindelse med udskiftning ved en lejlighed i den første uge af forsøget (dvs. analyser skal udføres på en prøve fra samme opløsning - frisk fremstillet og ved en fornyelse). Disse målinger bør gentages mindst ugentligt derefter.

I forbindelse med tests, hvor test-kemikaliet ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle test-koncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning. I de tests, imidlertid, hvor test-kemikaliet målte begyndelseskonzentration ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, men hvor der er tilstrækkelig bevis for, at begyndelseskonzentrationerne kan genfindes og er stabile (dvs. inden for range 80 - 120 % af begyndelseskonzentrationen), kan kemiske målinger reduceres i uge 2 og 3 til kun at omfatte den højeste og den laveste test-koncentration. I alle tilfælde behøver man før fornyelse kun at bestemme test-kemikaliet koncentration i et af måleglassene i en flergangsbestemmelse for hver af test-koncentrationerne.

Anvendes en gennemstrømnings-test, er et analyse-regime svarende til de semi-statistiske tests passende (men i dette tilfælde er måling på 'gamle' opløsninger ikke mulig). I den første uge kan det være tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger (fx tre hold målinger) for at sikre, at test-koncentrationerne holder sig stabile. I den type tests bør gennemstrømningshastigheden for fortyndingsvæske og test-kemikalium kontrolleres daglig.

Hvis det viser sig, at koncentrationen af det undersøgte kemikalium på tilfredsstillende måde er holdt inden for $\pm 20\%$ af den nominelle eller målte begyndelseskonzentration gennem hele testforløbet, kan resultaterne baseres på de nominelle eller målte begyndelseskonzentrationer. Hvis afvigelsen fra den nominelle eller målte begyndelseskonzentration er større end $\pm 20\%$, skal resultaterne udtrykkes som tidsvægtet gennemsnit (se bilag 5).

2 DATA OG RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Formålet med denne test er at bestemme virkningen af test-kemikaliet på det totale antal levende afkom pr. forældredyr, som er i live ved forsøgets afslutning. Det totale antal afkom pr. forældredyr skal beregnes for hver beholder (dvs hver enkeltbestemmelse). Viser det sig ved en enkeltbestemmelse, at forældredyret dør under forsøget eller at det er af hankøn, ekskluderes denne enkeltbestemmelse fra analysen. Analysen vil så blive baseret på et reduceret antal enkeltbestemmelser.

Vurderingen af LOEC og dermed NOEC for virkningen af kemikaliet på det totale antal afkom forudsætter en beregning af det gennemsnitlige antal afkom på tværs af enkeltbestemmelserne for hver koncentration samt den samlede residuale standarddeviation. Dette kan gøres ved hjælp af en variansanalyse (ANOVA). Gennemsnittet for hver koncentration skal så sammenholdes med kontrolgennemsnittet ved hjælp af en passende metode til multiple sammenligninger. Dunnetts eller Williams test kan være anvendelige (14) (15) (16) (17). Det er nødvendigt at kontrollere, at ANOVA-forudsætningen om varians-homogenitet holder stik. Det anbefales, at dette gøres grafisk snarere end ved en formel signifikanstest (18). Et passende alternativ er Bartlett's test. Hvis den nævnte forudsætning ikke holder, bør man overveje at transformere data med henblik på sikring af homogenitet før udførelse af ANOVA eller at udføre en vægtet ANOVA. Størrelsen af den virkning, der kan påvises med ANOVA (dvs. mindste signifikante forskel), skal beregnes og meddeles.

Til vurdering af den koncentration, som medfører en 50 % reduktion af det totale antal afkom (dvs. EC_{50}), konstrueres en passende kurve, fx en logistisk kurve, som er tilpasset data ved hjælp af en statistisk metode, fx de mindste kvadraters metode. Kurven skal parameteriseres, således at EC_{50} og standardfejlen på denne kan aflæses direkte. Dette vil lette beregningen af sikkerhedsgrænserne for EC_{50} . Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, skal tosidede 95 % sikkerhedsgrænser meddeles. Tilpasningsproceduren skal helst tillade en vurdering af signifikansen af den manglende overensstemmelse. Man kan gøre dette grafisk eller man kan inddrage den residuale kvadratsum i to komponenter: manglende overensstemmelse og tilfældig variation, hvorefter man udfører en signifikanstest for den manglende overensstemmelse. Eftersom behandlinger, der medfører højere frugtbarhed, må formodes at udvise større varians i antallet af afkom end behandlinger, der medfører lav frugtbarhed, bør man overveje at vægte de observerede data, så de afspejler de forskellige varianser i de forskellige behandlingsgrupper (se baggrundsinformation i ref. 18).

Ved analysen af data fra den endelige 'ring test' (2) tilpassedes en logistisk kurve ved hjælp af følgende model, selvom andre passende modeller kan anvendes:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^b}$$

Y: totale antal afkom pr. forældredyr, som var i live ved forsøgets afslutning (beregnet for hver beholder)

x: substanskoncentrationen

c: det forventede antal afkom, når $x = 0$.

x_0 : EC_{50} i populationen

b: hældningen

Denne model vil formentlig være passende i et stort antal tilfælde, men der vil være forsøg, hvor den ikke er adækvat. Man bør vurdere modellens validitet som foreslået ovenfor. I nogle tilfælde vil det være passende at anvende en hormese-model, hvor lave koncentrationer giver en øget virkning. (19)

Andre virkningskoncentrationer, såsom EC_{10} eller EC_{20} kan også estimeres, men det kan i så fald være formålstjenligt at anvende en parameterisering af modellen, som er forskellig fra den, der anvendes til at estimere EC_{50} .

2.2 TESTRAPPORT

Test-rapporten skal indeholde:

2.2.1 For test-kemikaliets:

- fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber;
- data vedrørende den kemiske identifikation inklusive renhedsgrad

2.2.2 For dyrearten:

- klonen (om den er blevet genotypebestemt), leverandør eller kilde (hvis kendt) og dyrkningsbetingelserne. Hvis en anden art end *Daphnia magna* anvendes, skal det meddeles og begrundes.

2.2.3 Test-omstændigheder:

- den anvendte test-procedure (fx semistatisk eller gennemstrømning, volumen, antal dafnier pr liter ved påfyldning;
- lysperiode og lysintensitet;
- test-design (fx antal flergangsbestemmelser, antal forældredyr pr måleglas);
- detaljer vedrørende kulturmediet;
- eventuel tilsætning af organisk materiale, inkluderende sammensætning, kilde, fremstillingsmetode, stamopløsningens TOC/COD, vurdering af resulterende TOC/COD i testmediet;
- detaljeret information angående fodring, inklusive mængde (i mg C/*Daphnia*/døgn og liste (fx fodertype(r) inklusive algerne specifikke navn (arten) og, hvis kendt, herkomst og dyrkningsbetingelserne;
- måde til fremstilling af stamopløsninger og hyppighed af fornyelse (evt. opløsningsmidler eller dispergenser og deres koncentrationer skal opgives).

Resultater

- resultater af ethvert forudgående studium af test-kemikaliets stabilitet;
- de nominelle test-koncentrationer og resultaterne af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af test-kemikaliets i måleglasset (se eksempler på data-ark i bilag 4); metodens genfindingssevne og dens grænser skal også meddeles;
- vandets kvalitet i måleglasset (dvs. pH, temperatur, koncentrationen af opløst ilt og TOC og/eller COD og hårdhedsgrad, hvor dette er relevant) (se eksempler på data-ark i bilag 3);
- fuld fortegnelse over levende afkom efter hvert moderdyr (se eksempler på data-ark i bilag 3);
- antal døde moderdyr og dagen for hændelsen (se eksempler på data-ark i bilag 3);
- variationskoefficienten for frugtbarhed i kontrollerne (baseret på det totale antal afkom pr forældredyr, som er i live ved testens afslutning);
- det totale antal af levende afkom pr forældredyr (for hver af flergangsbestemmelserne) som er i live ved testens afslutning plottet over for koncentrationen af test-kemikaliets;
- Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) med hensyn til frugtbarhed, inklusive en beskrivelse af den anvendte statistiske fremgangsmåde og en angivelse af, hvilken virkningsstørrelse der kunne måles og koncentration uden observeret effekt (NOEC) med hensyn til frugtbarhed; hvor relevant opgives ligeledes LOEC/ NOEC - mortaliteten for forældredyrene.
- hvor relevant EC_x med hensyn til frugtbarhed og sikkerhedsgrænser og en graf af den model, der var anvendt til beregningen, hældningen på dosis-responskurven og standardfejlen;
- andre observerede biologiske virkninger eller målinger: der skal rapporteres enhver biologisk virkning, som blev observeret eller målt (fx forældredyrenes vækst) inklusive relevante begrundelser;
- forklaringer for enhver afvigelse fra test-metoden.

REFERENCER

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.
- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.LØkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., **26**, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., **120**(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990)*Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990, Biologice Prace,**36**, 209
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, **12**, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., **128**, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics **27**, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, **28**, 510-531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, **29**, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, **67**, 1156-1166.

BILAG 1

KOMPLET FREMSTILLING AF MEDIERNE M7 OG M4

Akklimatisering til Medierne Elendt M 7 og M 4

Nogle laboratorier har haft problemer med at overflytte dafnier direkte til M4- (1) og M7- medierne. Imidlertid har en gradvis akklimatisering givet nogen succes; man flytter dafnierne fra deres eget medium til et 30 % Elendt, siden til et 60 % Elendt og så til et 100 % Elendt. Akklimatiseringsperioden kan være på op til en måned.

FREMSTILLING

Sporelementer

Separate stamopløsninger (I) med de forskellige sporstoffer fremstilles primært i vand af passende renhedsgrad, fx deioniseret, destilleret vand eller vand rensat ved omvendt osmose. Ud fra disse forskellige stamopløsninger (I) fremstilles en sekundær stamopløsning (II), som indeholder alle sporstofferne (kombinationsopløsningen), som følger:

Stamopløsning (enkelt stof)	Antal mg sat til 1 liter vand	Koncentrationer (refererende til M4)	For at fremstille stamopløsning II tilsættes nedennævnte antal ml af stamopløsning I til 1 liter vand	
			M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	260	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	5 000	2 000	-	-
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	-	-
Na ₂ EDTA- og FeSO ₄ -opløsningerne fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks. Dette giver:				
21 Fe-EDTA-opløsning		1 000-fold	20,0	5,0

M4 og M7-medierne

M4 og M7-medierne fremstilles ved hjælp af stamopløsning II, makro-næringsstofferne og vitaminerne som følger:

	Antal mg sat til 1 liter vand	Koncentrationer (relateret til medium M4)	Antal ml af stamopløsning, der sættes til 1 liter for at fremstille mediet	
			M4	M7
Stamopløsning II samlede sporstoffer		20	50	50
Stamopløsning med makro-næringsstoffer (enkelte stoffer)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinerede vitaminopløsning	-	10 000	0,1	0,1
Den kombinerede vitaminopløsning fremstilles ved at sætte de 3 vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:				
Thiamine hydrochloride	750	10 000	-	-
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10 000	-	-
Biotine	7,5	10 000	-	-

Den kombinerede vitaminopløsning opbevares i små mængder i frossen tilstand. Vitaminerne sættes til mediet kort før brugen.

NB 1 For at undgå udfældning af salte, når det fuldstændige medium fremstilles, skal man tilsætte de enkelte opløsninger til 500-800 ml deioniseret vand og derefter fylde op til 1 liter.

NB 2 Den første publicerede beskrivelse af M4-mediet kan findes i Elendt, B.P. (1990) Seleniumdeficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

BILAG 2

ANALYSE FOR DET TOTALE ORGANISKE KULSTOF (TOC) OG

FREMSTILLING AF NOMOGRAM TIL TOC-INDHOLDET I ALGEFODERET

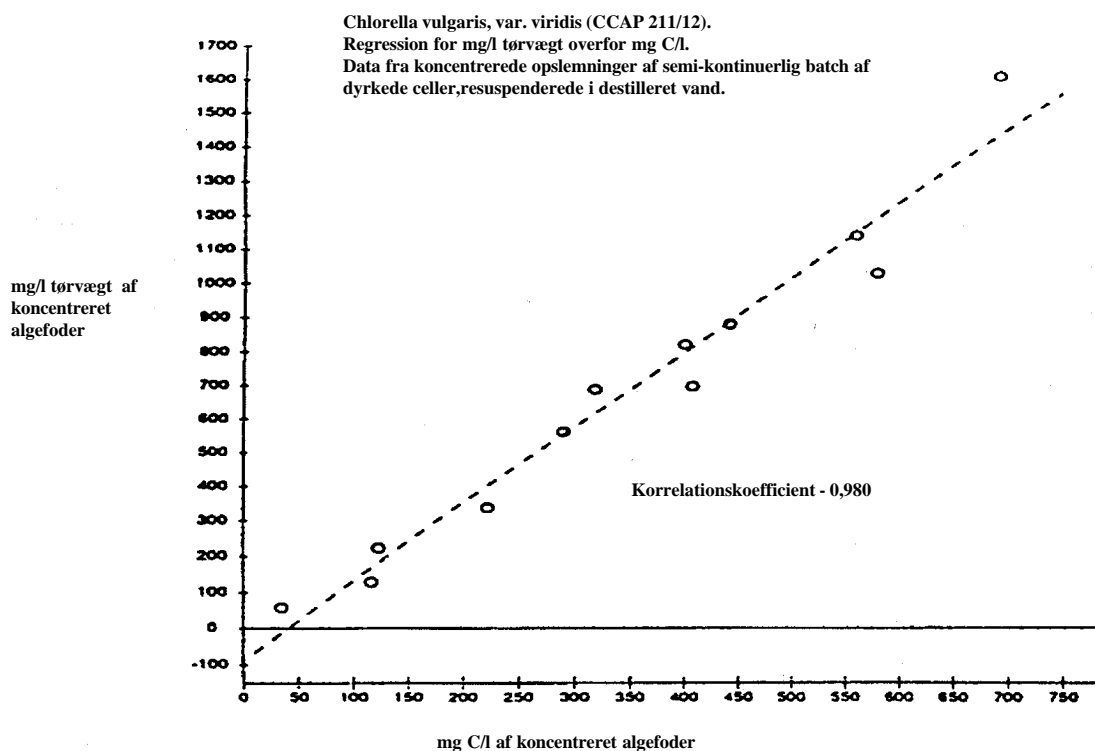
Det erkendes, at kulstof indholdet i algefoderet almindeligvis ikke vil blive målt direkte men ud fra korrelationer (dvs. nomogrammer med erstatningsmålinger, såsom antallet af alge-celler eller lysabsorbans).

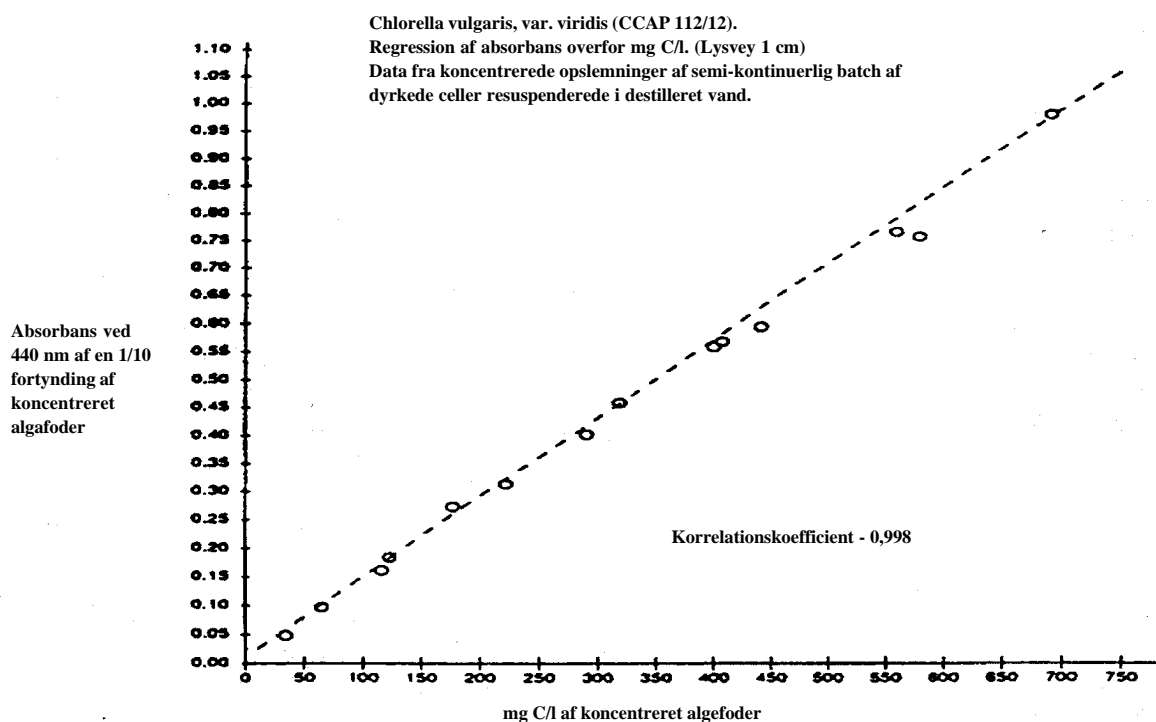
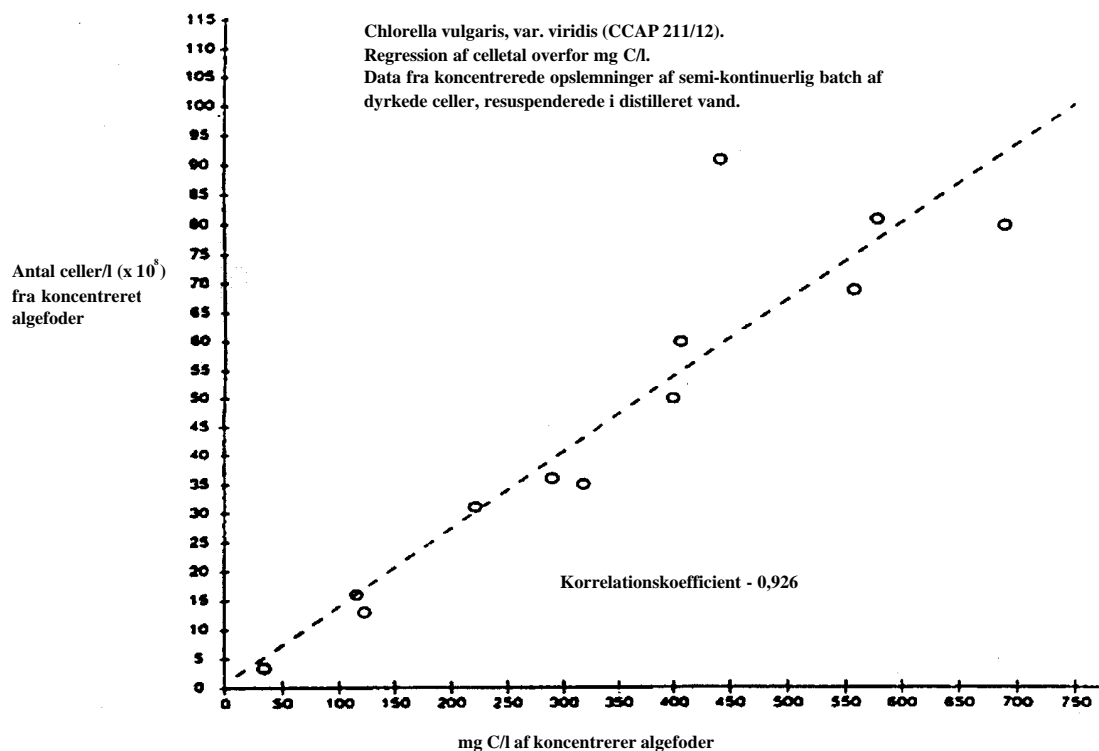
TOC bør måles ved oksidation ved høje temperaturer snarere end ved UV eller persulphate metoder. (Se: The instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Med henblik på fremstilling af nomogrammer skal algerne adskilles fra dyrkningsmediet ved centrifugering med påfølgende resuspension i destilleret vand. Mål erstatningsparameteren og TOC-koncentrationen i hver prøve som en tredobbelt-bestemmelse. Blindværdier måles i destilleret vand og TOC-koncentrationen trækkes fra TOC-værdien i algeprøven.

Nomogrammet skal være lineært i hele området over kulkoncentrationer. Eksempler ses nedenfor:

NB! Værdierne fra det her viste nomogram må ikke anvendes; det er essentielt at laboratorierne selv fremstiller deres egne nomogrammer.





BILAG 3

EKSEMPEL PÅ DATA-ARK TIL NOTATER OM FORNYELSE AF MEDIUM, FYSISK/KEMISK MONITORERING, FODRING, FORMERING OG MORTALITET BLANDT VOKSNE DAFNIER

Eksperiment nr.: Startdato: Klon: Medium: Fodertype: Test-kemikalium: Nominel koncentration:

Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Fornyelse af medium																								
pH *																							ny	
																							gl.	
O ₂ i mg/l *																							ny	
																							gl.	
Tp °C *																							ny	
																							gl.	
Fodring																								
Antal levende afkom †																								Total
Måleglas 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Kumulativ voksen-mortalitet ‡																								

* Angiv hvilket glas, der blev anvendt til undersøgelsen

† Anfør aborteret afkom som 'AB' i den relevante box

‡ Anfør mortalitet for ethvert voksent dyr som 'M' i den relevante box

BILAG 4

ØKSEMPEL PÅ DATA-ARK MED RESULTATER AF KEMISKE ANALYSER

(A) Målte koncentrationer

[illegible]

(B) Målte koncentrationer I procent af nominelle

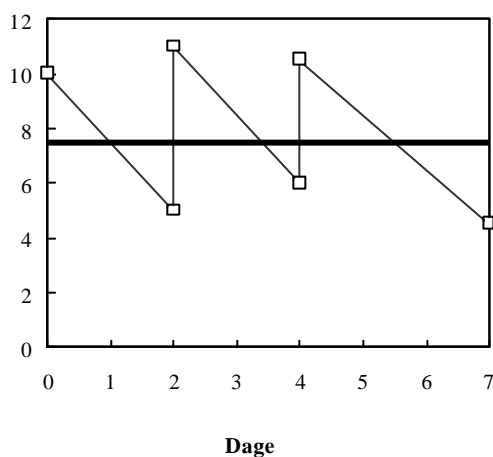
[illegible]

BILAG 5

BEREGNING AF TIDSVÆGTET GENNEMSNI

Tidsvægtet gennemsnit

Idet koncentrationen af test-kemikaliet kan falde i perioden mellem fornyelsen af medierne, er det nødvendigt at overveje, hvilken koncentration der skal vælges som repræsentant for variationen af koncentrationer, som den voksne dafnie bliver udsat for. Valget skal baseres på såvel biologiske som statistiske betragtninger. Hvis for eksempel formeringen formodes mest påvirket af den højeste koncentration, så skal den anvendes. Hvis imidlertid den akkumulerede effekt eller langtidseffekten fra det toksiske stof regnes for mere vigtigt, så er gennemsnitskoncentrationen mere relevant. I dette tilfælde er den tidsvægtede gennemsnitskoncentration det passende at anvende, eftersom den tager hensyn til variationen af hvert øjeblikks koncentration i tidsforløbet.



Figur 1 : Eksempel på tidsvægtet gennemsnit

Figur 1 viser som eksempel et (forenklet) forsøg over 7 dage med en fornyelse af mediet på dag 0, 2 og 4.

- Zig-zag linien repræsenterer koncentrationen på ethvert tidspunkt. Faldet i koncentration formodes at følge en eksponential henfaldsproces.
- De 6 angivne punkter repræsenterer de målte koncentrationer ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode.
- Den tykke, solide linie angiver placeringen af det tidsvægtede gennemsnit.

Det tidsvægtede gennemsnit er beregnet, så arealet under det tidsvægtede gennemsnit har samme størrelse som arealet under koncentrationskurven. Beregningen af det ovenfor viste eksempel ses i Tabel 1.

Tabel 1: Beregning af tidsvægtet gennemsnit

Fornyelse nr.	Dage	Konc. 0	Konc. 1	Ln(Konc.0)	Ln(Konc.1)	Areal
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Totale antal dage 7					Totale areal	50,091
					TW gennemsnit	7,156

Dage er antallet af dage i fornyelsesperioden

Konc.0 er den målte koncentration ved begyndelsen af hver fornyelsesperiode

Konc.1 er den målte koncentration ved afslutningen af hver fornyelsesperiode

Ln(Konc.0) er den naturlige logaritme til *Konc. 0*

Ln(Konc.1) er den naturlige logaritme til *Konc. 1*

Arealet er arealet under eksponentialkurven for hver fornyelsesperiode. Det beregnes således:

$$Area = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Days$$

Det tidsvægtede gennemsnit (*TW gennemsnit*) er det *totale areal* divideret med de *totale antal dage*.

0

Tabellen vil selvfølgelig strække sig over 21 dage i forbindelse med dafnie-formeringstesten.

Det er klart, at når der kun foretages målinger ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode, kan man ikke bekræfte, at henfaldsproessen er eksponentiel. En anderledes kurve ville resultere i en anderledes beregning for arealet. En eksponential henfaldsproces er dog ikke usandsynlig, og den er den bedste kurve at anvende, når der ikke foreligger andre informationer.

Stor omhu må udvises, hvis en kemisk analyse ikke kan påvise test-kemikaliet ved afslutningen af en fornyelsesperiode. Medmindre man kan påvise, med hvilken hastighed test-kemikaliet forsvandt fra opløsningen, er det ikke muligt at finde frem til et realistisk areal under kurven, hvilket medfører, at det er umuligt at finde frem til et rimeligt tidsvægtet gennemsnit.