

II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) 2016/266

af 7. december 2015

om tilpasning til den tekniske udvikling af forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF ⁽¹⁾, særlig artikel 13, stk. 2, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 ⁽²⁾ indeholder de testmetoder, der skal anvendes til at bestemme kemikaliers fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet i forbindelse med forordning (EF) nr. 1907/2006.
- (2) Det er nødvendigt at opdatere forordning (EF) nr. 440/2008 med henblik på at indarbejde de nye og opdaterede testmetoder, som OECD indførte for nylig, for at tage højde for den tekniske udvikling og for at begrænse antallet af dyr, der anvendes til dyreforsøg, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU ⁽³⁾. De interesserede parter er blevet hørt om dette forslag.
- (3) Tilpasningen omfatter 20 testmetoder, én ny metode til fastlæggelse af en fysisk-kemisk egenskab, 11 nye testmetoder og tre opdaterede testmetoder til vurdering af økotoksicitet og fem nye testmetoder til vurdering af skæbne og adfærd i miljøet.
- (4) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.
- (5) Foranstaltningerne i nærværende forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er nedsat ved artikel 133 i forordning (EF) nr. 1907/2006 —

⁽¹⁾ EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 af 30. maj 2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) (EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 ændres i overensstemmelse med bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 7. december 2015.

På Kommissionens vegne
Jean-Claude JUNCKER
Formand

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 foretages følgende ændringer:

- 1) En bemærkning indsættes i starten af bilaget før del A:

»Bemærk:

Inden brug af en af følgende testmetoder til at teste multikonstituent stoffer (MCS), stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) eller blandinger — og hvis dennes anvendelse til testning af MCS, UVCB eller blandinger ikke er angivet i den pågældende testmetode — bør det overvejes, om metoden er egnet til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.

Hvis testmetoden anvendes til at teste MCS, UVCB eller blandinger, skal der så vidt muligt foreligge tilstrækkelige oplysninger om sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og bestanddelenes relevante egenskaber.«

- 2) Kapitel A.24 tilføjes:

»A.24. **FORDELINGSKOEFFICIENT (N-OCTANOL/VAND), HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC)-METODEN**

INDLEDNING

Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 117 (2004)

1. Fordelingskoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne af et stof, der er opløst i et tofasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler. I tilfælde af n-octanol og vand:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{vand}}}$$

Fordelingskoefficienten, som er et forhold mellem to koncentrationer, er dimensionsløs og opgives ofte som titalslogaritmen.

2. P_{ow} er en nøgleparameter i undersøgelser af kemiske stoffers skæbne i miljøet. Der har vist sig at være et stærkt signifikant forhold mellem P_{ow} for stoffers ikke-ioniserede form og bioakkumulering heraf i fisk. Det har desuden vist sig, at P_{ow} er en nyttig parameter i forudsigelsen af adsorption i jord og sedimenter og til bestemmelse af kvantitative struktur/aktivitet-forhold for en lang række biologiske virkninger.
3. Det oprindelige forslag til denne testmetode var baseret på en artikel af C. V. Eadsforth og P. Moser (1). Udviklingen af testmetoden og OECD's sammenlignende laboratorieundersøgelse blev koordineret af Forbundsrepublikken Tysklands Umweltbundesamt i 1986 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

4. $\log P_{ow}$ -værdier i området – 2 til 4 (undertiden op til 5 og derover) ⁽¹⁾ kan bestemmes eksperimentelt med rystekolbemetoden (kapitel A.8 i dette bilag, OECD Test Guideline 107). HPLC-metoden omfatter $\log P_{ow}$ i området 0 til 6 (1)(2)(3)(4)(5). Denne metode kan kræve en beregning af P_{ow} med henblik på valg af egnede referencestoffer og som underbygning for konklusioner draget af de data, der er genereret ved hjælp af testen. Beregningsmetoderne beskrives kort i tillægget til denne testmetode. HPLC-operationsformen er isokratisk.
5. P_{ow} -værdierne afhænger af miljøforholdene, såsom temperatur, pH, ionstyrke osv., og disse bør defineres i eksperimentet med henblik på korrekt fortolkning af P_{ow} -data. For så vidt angår ioniserbare stoffer, kan en alternativ metode blive tilgængelig (f.eks. udkastet til OECD's vejledning for den pH-metriske metode for ioniserede stoffer (6)). Udkastet til OECD's vejledning kan være egnet til at bestemme P_{ow} for disse ioniserbare stoffer, men i visse tilfælde er det mere hensigtsmæssigt at bruge HPLC-metoden ved en miljørelevant pH-værdi (se punkt 9).

⁽¹⁾ En øvre grænse opstår som følge af behovet for at opnå en fuld separationsfase efter justering af fordelingsligevægten og inden udtagning af prøver til analyse. Hvis der udvises omhu, kan den øvre grænse udvides til højere P_{ow} -værdier.

METODENS PRINCIP

6. Omvendt fase-HPLC udføres på analytiske kolonner pakket med en kommercielt tilgængelig fast fase indeholdende lange kulbrintekæder (f.eks. C8, C18), der er kemisk bundet til silica.
7. Et kemikalie, der indsprøjtes på en sådan kolonne, fordeles mellem den mobile opløsningsmiddelfase og den stationære kulbrintefase, efterhånden som den mobile fase transporterer det gennem kolonnen. Stoffernes retentionstid afhænger af deres kulbrinte/vand-fordelingskoefficient; hydrofile stoffer elueres først, og lipofile stoffer sidst. Retentionstiden beskrives ved kapacitetsfaktoren k , der er givet ved udtrykket:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

hvor t_R er teststoffets retentionstid, og t_0 er dødtiden, dvs. den tid det i gennemsnit tager et opløsningsmiddel-molekyle at komme gennem kolonnen. Der kræves ikke kvantitative analysemetoder, og det er kun nødvendigt at bestemme retentionstiderne.

8. Et teststofs octanol/vand-fordelingskoefficient kan beregnes ved eksperimentelt at bestemme dets kapacitetsfaktor k og indsætte k i følgende ligning:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

hvor

a, b = lineære regressionskoefficienter.

Ligningen ovenfor kan opnås ved lineær regression af logaritmen for referencestoffernes octanol/vand-fordelingskoefficienter mod logaritmen for referencestoffernes kapacitetsfaktorer.

9. Med omvendt fase-HPLC-metoden kan der skønnes fordelingskoefficienter i $\log P_{ow}$ -området fra 0 til 6, men metoden kan udvides til undtagelsesvis at omfatte $\log P_{ow}$ -området fra 6 til 10. Det kan gøre det nødvendigt at ændre den mobile fase (3). Metoden kan ikke benyttes til stærke syrer og baser, metalkomplekser, overfladeaktive stoffer og stoffer, der reagerer med elueringsmidlet. Målinger på ioniserbare stoffer kan udføres på den ikke-ioniserede form (fri syre eller fri base) og kun ved anvendelse af en passende buffer med en pH-værdi på under pK_a for en fri syre eller over pK_a for en fri base. Hvis den pH-metriske metode til testning af ioniserbare stoffer (pH-Metric Method for Ionisable Substances (6)) bliver tilgængelig, vil den kunne benyttes som en alternativ metode. Hvis $\log P_{ow}$ -værdien bestemmes med henblik på miljøfareklassificering eller miljørisikovurdering, bør testen udføres inden for det pH-område, der er relevant for det naturlige miljø, dvs. i pH-området 5,0-9.
10. I visse tilfælde kan urenheder vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne på grund af usikker tilforordning af toppene. For blandinger, der giver et uopløst bånd, anføres en øvre og nedre grænse for $\log P_{ow}$ og område- % af hver $\log P_{ow}$ -top. For blandinger, som er en gruppe af homologer, anføres også det vægtede gennemsnit af $\log P_{ow}$ (7), som beregnes på grundlag af de enkelte P_{ow} -værdier og de tilsvarende område- %-værdier (8). Alle toppe, der bidrager med et område på mindst 5 % til det samlede topareal, bør tages i betragtning i beregningen (9):

$$\text{vægtet gns. af } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{areal } \%)}{\text{samlet topareal } \%} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{areal } \%_i)}{\sum_i \text{areal } \%}$$

Det vægtede gennemsnit af $\log P_{ow}$ gælder kun for stoffer eller blandinger (f.eks. tallolie), der består af homologer (f.eks. serier af alkaner). Blandinger kan måles med relevante resultater, forudsat at den anvendte analytiske detektor har samme følsomhed over for alle stoffer i blandingen og kan opløses i tilstrækkelig grad.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

11. Stoffets dissociationskonstant, strukturformel og opløselighed i den mobile fase skal være kendt forud for anvendelsen af metoden. Derudover er det nyttigt at have oplysninger om hydrolyseegenskaber.

KVALITETSKRITERIER

12. For at øge tilliden til målingen foretages der dobbeltbestemmelse.
- Repeterbarhed: Værdien for $\log P_{ow}$ beregnet ud fra gentagne målinger foretaget under identiske betingelser og med samme sæt referencestoffer skal ligge inden for et interval på $\pm 0,1$ logenheder.
 - Reproducerbarhed: Hvis målingerne gentages med et andet sæt referencestoffer, kan der forekomme andre resultater. Typisk ligger korrelationskoefficienten R for sammenhængen mellem $\log k$ og $\log P_{ow}$ for et sæt teststoffer på omkring 0,9, hvilket svarer til en octanol/vand-fordelingskoefficient på $\log P_{ow} + 0,5$ logenheder.
13. Den sammenlignende laboratorieundersøgelse har vist, at der med HPLC-metoden kan opnås $\log P_{ow}$ -værdier på $\pm 0,5$ enheder i forhold til de værdier, der er opnået med rystekolbemetoden (2). Andre sammenligninger kan findes i litteraturen (4)(5)(10)(11)(12). Korrelationskurver baseret på strukturmæssigt beslægtede stoffer giver de mest nøjagtige resultater (13).

REFERENCESTOFFER

14. For at kunne korrelere den målte kapacitetsfaktor k for et stof med dets P_{ow} skal der fastlægges en kalibreringskurve, som er baseret på mindst seks punkter (se punkt 24). Det er op til brugeren at vælge passende referencestoffer. Referencestoffet bør normalt have $\log P_{ow}$ -værdier, der omfatter teststoffets $\log P_{ow}$, hvilket vil sige, at mindst et referencestof skal have en P_{ow} -værdi på over teststoffets værdi og en anden P_{ow} -værdi på under teststoffets værdi. Ekstrapolation bør kun anvendes i særlige tilfælde. Det foretrækkes, at referencestofferne er strukturmæssigt beslægtet med teststoffet. $\log P_{ow}$ -værdierne for de referencestoffer, der bruges til kalibreringen, skal være baseret på pålidelige forsøgsdata. For stoffer med høj $\log P_{ow}$ (normalt over 4) kan der anvendes beregnede værdier, medmindre der foreligger pålidelige forsøgsdata. Hvis der bruges ekstrapolerede værdier, skal der anføres en grænseværdi.
15. Der foreligger omfattende lister med $\log P_{ow}$ -værdier for mange grupper af kemikalier (14)(15). Hvis der ikke foreligger data om fordelingskoefficienter for strukturmæssigt beslægtede stoffer, kan der bruges en mere generel kalibrering foretaget med andre referencestoffer. Anbefalede referencestoffer og deres P_{ow} -værdier er anført i tabel 1. For ioniserbare stoffer gælder de anførte værdier den ikke-ioniserede form. Værdierne blev kontrolleret med hensyn til sandsynlighed og kvalitet under den sammenlignende laboratorieundersøgelse.

Tabel 1

Anbefalede referencestoffer

	CAS-nummer	Referencestof	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-butanon (methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylpyridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Phenoxyeddikesyre	1,4	pKa = 3,12

	CAS-nummer	Referencestof	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Phenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Phenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-methylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetophenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzoesyre	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Cinnamylalkohol (kanelalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoesyre	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-cresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kanelsyre	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Methylbenzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	3-methylbenzoesyre	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichlorethylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Ethylbenzoat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-dichlorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-chlorbenzoesyre	2,7	pKa = 3,82

	CAS-nummer	Referencestof	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloranilin	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzen	2,8	
36	1746-13-0	Allylphenylether	2,9	
37	108-86-1	Brombenzen	3,0	
38	100-41-4	Ethylbenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzophenon	3,2	
40	92-69-3	4-phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorbenzen	3,4	
43	122-39-4	Diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalen	3,6	
45	93-99-2	Phenylbenzoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzylbenzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorbenzen	4,2	
52	143-07-7	Dodecansyre	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Diphenylether	4,2	
54	85-01-8	Phenanthren	4,5	
55	104-51-8	n-butylbenzen	4,6	

	CAS-nummer	Referencestof	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-diphenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthren	5,1	
59	603-34-9	Triphenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

BESKRIVELSE AF METODEN

Foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten

16. Om nødvendigt kan teststoffets fordelingskoefficient skønnes enten ved beregning (se tillæg) eller i givet fald ud fra teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler.

Apparatur

17. Der kræves en væskechromatograf med pumpe med lav pulsation og passende detektionssystem. En UV-detektor, der bruger en bølglængde på 210 nm, eller en RI-detektor kan anvendes på en lang række kemiske grupper. Polære grupper i den stationære fase kan nedsætte HPLC-kolonnens ydeevne væsentligt. Derfor skal stationære faser have det lavest mulige procentindhold af polære grupper (16). Der kan anvendes kommercielt mikroniseret pakkemateriale med omvendt fase eller færdigpakkede kolonner. Der kan eventuelt anbringes en beskyttelseskolonne mellem injektionssystemet og analysekolonnen.

Mobil fase

18. Der anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret eller deioniseret vand til fremstilling af elueringsvæsken, som afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Den anvendte methanol/vand-blanding skal indeholde mindst 25 % vand. Til eluering af stoffer med en log P på 6 på en time ved en flowhastighed på 1 ml/min. vil en blanding af methanol og vand i forholdet 3:1 (v/v) typisk være tilfredsstillende. For stoffer med en log P-værdi på over 6 kan det være nødvendigt at nedsætte elueringstiden (også for referencestofferne) ved at benytte en mindre polær mobil fase eller en kortere kolonne.
19. Både teststof og referencestoffer skal være opløselige i den mobile fase i en så høj koncentration, at de kan påvises. Der må kun undtagelsesvis benyttes tilsætningsstoffer til methanol/vand-blandingen, da tilsætningsstoffer vil ændre kolonnens egenskaber. I disse tilfælde skal det kontrolleres, at retentionstiden for teststof og referencestoffer er upåvirket. Hvis en methanol/vand-blanding ikke er egnet, kan der anvendes andre blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, f.eks. ethanol/vand, acetonitril/vand eller isopropylalkohol-(2-propanol)/vand.
20. For ioniserbare stoffer er elueringsvæskens pH kritisk. Det skal ligge inden for kolonnens pH-driftsområde, normalt fra 2 til 8. Det anbefales at anvende buffer. Man må være omhyggelig med at undgå saltudfældning og ødelæggelse af kolonnen, hvilket kan forekomme med visse blandinger af organisk fase og buffer. Det frarådes normalt at foretage HPLC-målinger med silicabaserede stationære faser med en pH over 8, da brug af en alkalisk mobil fase kan føre til, at kolonnens ydeevne hurtigt falder.

Opløste stoffer

21. Teststof og referencestoffer skal være tilstrækkeligt rene til, at toppene i kromatogrammerne kan henføres til de respektive stoffer. Til test- og kalibreringsformål opløses stofferne om muligt i den mobile fase. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end den mobile fase til at opløse test- og referencestofferne, skal den mobile fase benyttes til slutfortyndingen forud for indsprøjtningen.

Testbetingelser

22. Under målingen må temperaturen ikke variere med mere end ± 1 °C.

Bestemmelse af dødtid t_0

23. Dødtiden t_0 kan måles med organiske stoffer, der ikke holdes tilbage (f.eks. thiourinstof eller formamid). En mere præcis dødtid kan beregnes på grundlag af de målte retentionstider eller et sæt af ca. syv medlemmer af en homolog række (f.eks. n-alkylmethylketoner) (17). Retentionstiderne $t_R(n_C + 1)$ afbildes mod $t_R(n_C)$, hvor n_C er antallet af kulstofatomer. Der frembringes en ret linje, $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A)t_0$, hvor A, der repræsenterer $k(n_C + 1)/k(n_C)$, er konstant. Dødtiden t_0 bestemmes af skæringspunktet $(1 - A)t_0$ og hældningskoefficienten A.

Regressionsligning

24. Næste trin består i at konstruere en korrelationskurve af log k mod log P for passende referencestoffer med log P-værdier i nærheden af den værdi, der forventes for teststoffet. I praksis indsprøjtes der 6-10 referencestoffer samtidigt. Retentionstiderne bestemmes, helst med en integrationsskriver, der er koblet til detektionssystemet. De tilsvarende logaritmer for kapacitetsfaktorerne, log k, afsættes som funktion af log P. Regressionsligningen foretages regelmæssigt, mindst en gang dagligt, så der kan tages højde for eventuelle ændringer i kolonnens ydeevne.

BESTEMMELSE AF TESTSTOFFETS P_{ow}

25. Teststoffet indsprøjtes i den lavest påviselige mængde. Retentionstiden bestemmes dobbelt. Teststoffets fordelingskoefficient fås ved interpolation af den beregnede kapacitetsfaktor på kalibreringskurven. Ved meget lave og meget høje fordelingskoefficienter er det nødvendigt at ekstrapolere. Især i sådanne tilfælde må man være særlig opmærksom på regressionslinjens konfidensgrænser. Hvis prøvens retentionstid ligger uden for det interval af retentionstider, der er opnået for standarderne, skal der anføres en grænseværdi.

DATA OG RAPPORTERING

Testrapport

26. Følgende skal anføres i rapporten:

- hvis de er bestemt i det foreløbige skøn over fordelingskoefficienten, de tilnærmede værdier og den anvendte metode; og hvis en beregningsmetode blev anvendt, en fuld beskrivelse heraf, herunder identifikation af de anvendte datas oprindelse og detaljerede oplysninger om valg af fragmenter
- test- og referencestoffer: renhedsgrad, strukturformel og CAS-nummer
- beskrivelse af udstyr og driftsbetingelser: analyse- og beskyttelseskolonne
- mobil fase, detektionssystem, temperaturinterval, pH
- elueringsprofiler (kromatogrammer)
- dødtiden og hvordan den er målt
- retentionsdata og litteraturværdier for log P_{ow} for referencestoffer benyttet ved kalibrering
- detaljerede oplysninger om den fittede regressionslinje (log k mod log P_{ow}) og linjens korrelationskoefficient, herunder konfidensintervaller
- gennemsnitlige retentionsdata og interpoleret log P_{ow} -værdi for teststoffet
- for blandinger: elueringsprofilkromatogram med anførte tærskelværdier

- $\log P_{ow}$ -værdier i forhold til område- % af $\log P_{ow}$ -toppen
- beregning med en regressionslinje
- beregnede $\log P_{ow}$ -værdier som vægtet gennemsnit, når det er relevant.

LITTERATUR

- (1) C. V. Eadsforth og P. Moser (1983), Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients, *Chemosphere*, 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss og H. J. Poremski (1988), Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method, *Chemosphere*, 17, 361.
- (3) C. V. Eadsforth (1986), Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient, *Pesticide Science*, 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt og R. Fuerer (1981), Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients, *Pesticide Science*, 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981), Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography, *Chemosphere*, 10, 73.
- (6) OECD (2000), Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances, Draft Guideline, november 2000.
- (7) OSPAR (1995), »Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995«, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20.-24. februar 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez og C. C. Karman (1999), An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999, Version 1.0, 3, august.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke og K. Bansal (1998), Partitioning of Chemicals, Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges, *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, s. 529-537.
- (10) L. O. Renberg, S. G. Sundstroem og K. Sundh-Nygård (1980), Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes, *Chemosphere*, 9, 683.
- (11) W. E. Hammers, G. J. Meurs og C. L. De-Ligny (1982), Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system, *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J. E. Haky og A. M. Young (1984), Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds, *J. Liq. Chromatography*, 7, 675.
- (13) S. Fujisawa og E. Masuhara (1981), Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Biomedical Materials Research*, 15, 787.
- (14) C. Hansch og A. J. Leo (1979), Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York.

-
- (15) C. Hansch, chairman; A. J. Leo, dir. (1982), Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (16) R. F. Rekker og H. M. de Kort (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.*, 14, 479.
- (17) G. E. Berendsen, P. J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony og J. Inczédy (1980), On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography, *J. Liq. Chromato*, 3, 1669.
-

Tillæg

P_{ow}-beregningsmetoder

INDLEDNING

1. Dette tillæg indeholder en kort introduktion til beregningen af P_{ow}. Yderligere oplysninger kan findes i lærebøger (1)(2).
2. Beregnede værdier for P_{ow} bruges til at:
 - beslutte, hvilken forsøgsmetode der skal bruges: rystekolbemetoden for log P_{ow} på mellem - 2 og 4 og HPLC-metoden for log P_{ow} på mellem 0 og 6
 - vælge betingelserne for HPLC (referencestoffer, methanol/vand-forhold)
 - kontrollere sandsynligheden af de værdier, der er opnået med forsøgsmetoderne
 - give et skøn, i tilfælde hvor der ikke kan anvendes forsøgsmetoder.

Princippet bag beregningsmetoderne

3. Alle de beskrevne beregningsmetoder er baseret på teoretisk fragmentering af molekylet i passende delstrukturer, for hvilke man har pålideligt kendskab til log P_{ow}-inkremitter. Log P_{ow} fås ved at summere fragmentværdierne og korrektionsudtrykkene for intramolekylære vekselvirkninger. Der foreligger lister over fragmentkonstanter og korrektionsudtryk (1)(2)(3)(4)(5)(6). Nogle af dem ajourføres regelmæssigt (3).

De beregnede værdiers pålidelighed

4. Sædvanligvis aftager beregningsmetodens pålidelighed med, at det undersøgte stofs kompleksitet stiger. For simple molekyler med lav molekylvægt og en eller to funktionelle grupper kan der forventes en afvigelse på 0,1 til 0,3 mellem resultatet af forskellige fragmenteringsmetoder og den målte værdi for log P_{ow}. Fejlmargenen afhænger af, hvor pålidelige de anvendte fragmentkonstanter er, om intramolekylære vekselvirkninger (f.eks. hydrogenbindinger) kan genkendes, og om korrektionsudtrykkene anvendes korrekt. Ved ioniserende stoffer skal ladningen og ioniseringsgraden tages i betragtning (10).

Fujita-Hansch π-metoden

5. Konstanten for hydrofobe substituer, π, som indførtes af Fujita et al. (7), defineres som:

$$\pi_X = \log P_{ow}(\text{PhX}) - \log P_{ow}(\text{PhH})$$

hvor PhX er et aromatisk derivat, og PhH er moderstoffet.

$$\begin{aligned} \text{f.eks. } \pi_{\text{Cl}} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &= 0,71 \end{aligned}$$

π-metoden er primært relevant for aromatiske stoffer. Der foreligger π-værdier for en lang række substituer (4)(5).

Rekkers metode

6. Efter Rekker (8) beregnes værdien af log P_{ow} således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vekselvirkningsudtryk})$$

hvor a_i er den hyppighed, hvormed et givet fragment forekommer i molekylet, og f_i er fragmentets $\log P_{ow}$ -inkrement. Vekselvirkningsudtrykkene kan udtrykkes som et heltalsmultiplum af en enkelt konstant C_m (den såkaldte »magiske konstant«). Fragmentkonstanterne f_i og C_m er bestemt på grundlag af en liste med 1 054 eksperimentelt bestemte P_{ow} -værdier for 825 stoffer ved hjælp af flerdimensional regressionsanalyse (6)(8). Vekselvirkningsudtrykkene bestemmes efter faste regler (6)(8)(9).

Hansch-Leos metode

7. Efter Hansch og Leo (4) beregnes værdien af $\log P_{ow}$ således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

hvor f_i er en fragmentkonstant, F_j er et korrektionsudtryk (faktor), og a_i og b_j er de dertil hørende hyppigheder. Ud fra eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} har man ved at prøve sig frem kunnet opstille lister over atom- og gruppefragmentværdier og over korrektionsudtryk F_j . Korrektionsudtrykkene er inddelt i flere forskellige klasser (1)(4). Der er udviklet edb-programmer for at tage højde for alle regler og korrektionsudtryk (3).

KOMBINERET METODE

8. Beregningen af $\log P_{ow}$ for komplekse molekyler kan forbedres betydeligt, hvis molekylet deles op i større delstrukturer, som man har pålidelige $\log P_{ow}$ -værdier for, enten fra tabeller (3)(4) eller fra eksisterende målinger. Sådanne fragmenter (f.eks. heterocykliske forbindelser, anthraquinon, azobenzen) kan dernæst kombineres med Hansch- π -værdier eller Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Bemærkninger

- i) Beregningsmetoderne kan kun anvendes på helt eller delvist ioniserede stoffer, hvis de nødvendige korrektionsfaktorer tages i betragtning.
- ii) Hvis der må antages at forekomme intramolekulære hydrogenbindinger, må det hertil svarende korrektionsudtryk (ca. + 0,6 til + 1,0 $\log P_{ow}$ -enheder) lægges til (1). Modeller og spektroskopiske data kan afsløre, om der kan være tale om sådanne bindinger.
- iii) Hvis flere tautomere former er mulige, benyttes den mest sandsynlige form som grundlag for beregningen.
- iv) Man skal nøje følge med i revisioner af lister over fragmentkonstanter.

LITTERATUR OM BEREKNINGSMETODER

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Reehl og D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W. J. Dunn, J. H. Block og R. S. Pearlman (ed.), Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986),
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch og A. J. Leo Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).
- (5) Leo, C. Hansch og D. Elkins (1971), Partition coefficients and their uses, *Chemical. Reviews*, 71, 525.
- (6) R. F. Rekker og H. M. de Kort (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.*, 14, 479.

- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa og Corwin Hansch (1964), A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 5175.
- (8) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, *Pharmacochemistry Library*, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C. V. Eadsforth og P. Moser (1983), Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients, *Chemosphere*, 12, 1459.
- (10) R. A. Scherrer, ACS — Symposium Series 255, s. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).«

3) Kapitel C.3 affattes således:

»C.3. **FERSKVANDSALGER OG CYANOBAKTERIER, VÆKSTHÆMNINGSTEST**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 201 (2006, bilag berigtiget i 2011). Testmetoden bør revideres, idet der indsættes yderligere arter, og opdateres, således at den opfylder behovene for vurdering af kemikaliers farlighed og klassificering. Revisionen er foretaget på grundlag af de omfattende praktiske erfaringer med testen, den videnskabelige udvikling inden for algetoksicitetsundersøgelser samt de kontrollerende myndigheders udstrakte anvendelse af testen, siden denne oprindeligt blev indført.
2. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Testens formål er at bestemme kemikaliet påvirkning af væksten af ferskvandsmikroalger og/eller cyanobakterier. Testorganismer i eksponentiel vækst eksponeres for kemikaliet i batchkulturer i et tidsrum på normalt 72 timer. Til trods for testens forholdsvis korte varighed giver den mulighed for at vurdere virkningerne på flere generationer.
4. Systemets respons er væksthæmningen i en række algekulturer (testenheder), der eksponeres for forskellige koncentrationer af et testkemikalie. Responsen udtrykkes som funktion af eksponeringskoncentrationen og sammenholdes med gennemsnitsvæksten i ikke-eksponerede replikatkontrollkulturer. For at systemets respons på toksiske virkninger kan komme fuldt til udtryk (optimal følsomhed), lader man kulturerne vokse uhæmmet eksponentielt med tilstrækkelige næringsstoffer og kontinuerlig belysning, tilstrækkelig længe til at hæmningen af den specifikke væksthastighed kan måles.
5. Vækst og væksthæmning bestemmes kvantitativt ved måling af algebiomassen som funktion af tiden. Algebiomasse defineres som tørvægt pr. volumenenhed, f.eks. mg alger/liter testopløsning. Tørvægt er imidlertid vanskelig at måle, hvorfor der anvendes surrogatparametre. Af sådanne surrogater er celletal det mest anvendte. Andre surrogatparametre er cellevolumen, fluorescens, optisk tæthed mv. Omregningsfaktoren mellem den målte surrogatparameter og biomassen skal være kendt.
6. Endepunktet for testen er væksthæmning, udtrykt som den logaritmiske stigning i biomasse (gennemsnitlig specifik væksthastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke væksthastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af væksthastigheden, og denne betegnes E_xC_x (f.eks. $E_{50}C_{50}$).
7. I denne metode anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelser i visse lande. Udbyttet defineres som biomassen ved eksponeringsperiodens slutning minus biomassen ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) i udbyttet, og denne betegnes E_yC_x (f.eks. $E_{50}C_{50}$).

8. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Med henblik på fastsættelse af testbetingelser vil det være nyttigt at kende testkemikaliet's strukturformel, renhed, lysstabilitet, stabilitet under testbetingelserne, lysabsorptionsegenskaber, pKa og resultaterne af omdannelsesundersøgelser, herunder bionedbrydeligheden i vand.
10. Kemikaliet's vandopløselighed, octanol/vand-fordelingskoefficient (P_{ow}) og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode, hvis restitutionsevne og detektionsgrænse rapporteres.

TESTENS VALIDITET

11. Til afgørelse af, om en test er valid, anvendes følgende præstationskriterier:
- Biomassen i kontrolkulturerne skal være steget eksponentielt med mindst en faktor 16 i løbet af testperioden på 72 timer. Dette svarer til en specifik væksthastighed på $0,92 \text{ dag}^{-1}$. For de oftest anvendte arter er væksthastigheden sædvanligvis betydeligt højere (se tillæg 2). Dette kriterium er ikke nødvendigvis opfyldt for arter, der er mere langsomtvoksende end de i tillæg 2 anførte. I så fald må testperioden forlænges, så der opnås en vækst til mindst det 16-dobbelte i kontrolkulturerne, og så væksten er eksponentiel i hele testperioden. For at opretholde uhæmmet eksponentiel vækst under testen kan testperioden afkortes til ikke under 48 timer, når blot minimumsmultiplikationsfaktoren på 16 nås.
 - Den gennemsnitlige variationskoefficient af den trinvis specifikke væksthastighed (ved 72-timers test, dag 0-1, 1-2 og 2-3) i kontrolkulturerne (se tillæg 1 under »variationskoefficient«) må ikke være over 35 %. Vedrørende beregning af trinvis specifik væksthastighed: se punkt 49. Kriteriet gælder for gennemsnitsværdien af variationskoefficienterne for kontrolkulturreplikater.
 - Variationskoefficienten for de gennemsnitlige specifikke væksthastigheder i hele testperioden i kontrolkulturreplikater må ikke være over 7 % i test med *Pseudokirchneriella subcapitata* og *Desmodesmus subspicatus*. For andre, mindre hyppigt benyttede testarter må værdien ikke være over 10 %.

REFERENCEKEMIKALIE

12. Til kontrol af testmetoden kan der testes et eller flere referencekemikalier, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (1). Kaliumdichromat kan ligeledes anvendes som referencekemikalie for grønalg. Det er ønskeligt, at der et referencekemikalie testes mindst to gange årligt.

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

13. Metoden er bedst anvendelig på vandopløselige kemikalier, som under testbetingelserne forventes at forblive i vandet. Til testning af kemikalier, der er flygtige, stærkt adsorberende, farvede eller tungtopløselige i vand, eller som kan ændre tilgængeligheden af næringsstoffer eller mineraler i testsubstratet, kan visse ændringer af den beskrevne fremgangsmåde være nødvendige (f.eks. lukket system eller konditionering af testbeholderne). Anvisninger for sådanne ændringer er givet i (2), (3) og (4).

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparatur

14. Bægerglas og andet apparatur, der kommer i kontakt med testopløsningerne, skal være fremstillet af rent glas eller andet kemisk inert materiale. Det pågældende udstyr skal være omhyggeligt vasket, for at sikre at ingen organiske eller uorganiske kontaminanter kan forstyrre algevæksten eller testopløsningernes sammensætning.

15. Som testbeholdere anvendes sædvanligvis glaskolber af en størrelse, der giver tilstrækkeligt kulturvolumen til målingerne under testen og tilstrækkelig masseoverførsel af CO₂ fra atmosfæren (se punkt 30). Bemærk, at der skal være tilstrækkeligt væskevolumen til de analytiske bestemmelser (se punkt 37).
16. Derudover kan der være brug for følgende udstyr eller en del deraf:
- dyrkningsapparat: Det anbefales at benytte et kabinet eller kammer med mulighed for fastholdelse af den valgte inkubationstemperatur inden for ± 2 °C.
 - instrumenter til lysmåling: Man må være opmærksom på, at den anvendte metode til lysintensitetsmåling, specielt den anvendte type detektor (kollektor), kan påvirke måleværdien. Til målingerne skal fortrinsvis benyttes en sfærisk detektor (4 π -detektor) (som reagerer på direkte og reflekteret lys fra alle vinkler over og under måleplanet) eller en 2 π -detektor (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet).
 - apparatur til bestemmelse af algebiomasse: Celletal, der er den oftest anvendte surrogatparameter for algebiomasse, kan bestemmes med en elektronisk partikeltæller, et mikroskop med tællekammer eller et flowcytometer. Andre biomassesurrogater kan måles med flowcytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Det er hensigtsmæssigt at beregne en omregningsfaktor fra celletal til tørvægt. Ved spektrofotometrisk bestemmelse af lave biomassekoncentrationer kan det være nødvendigt at bruge kuvetter med en lysvej på mindst 4 cm for at få brugbare målinger.

Testorganismer

17. Der kan anvendes forskellige arter af ikke-fastsiddende mikroalger og cyanobakterier. De i tillæg 2 opførte stammer har vist sig velegnede ved brug af fremgangsmåden i denne testmetode.
18. Benyttes andre arter, skal stamme og/eller oprindelse angives. Det kontrolleres, at der kan opretholdes eksponentiel vækst af de valgte testalger i hele testperioden under de givne betingelser.

Næringssubstrat

19. To alternative næringssubstrater, OECD-substratet og AAP-substratet, anbefales. Substraternes sammensætning er angivet i tillæg 3. Bemærk, at de to substraters initiale pH-værdi og bufferkapacitet (som regulerer pH-stigningen) er forskellige. Testen kan derfor give forskelligt resultat afhængigt af substratet, specielt ved testning af ioniserende kemikalier.
20. Til visse formål kan det være nødvendigt at modificere substratet, f.eks. ved testning af metaller og chelaterende midler, eller når testning finder sted ved afvigende pH-værdier. Modificerede substrater skal beskrives i detaljer og deres anvendelse begrundes (3)(4).

Initial biomassekoncentration

21. Den initiale biomasse i testkulturerne skal være ens i alle testkulturer og tilstrækkelig lav til at muliggøre eksponentiel vækst i hele inkubationsperioden, uden risiko for at næringsstofferne opbruges. Den initiale biomasse må ikke udgøre mere end 0,5 mg/l som tørvægt. Følgende initiale cellekoncentrationer anbefales:

Pseudokirchneriella subcapitata: $5 \times 10^3 - 10^4$ celler/ml

Desmodesmus subspicatus $2-5 \times 10^3$ celler/ml

Navicula pelliculosa 10^4 celler/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 celler/ml

Synechococcus leopoliensis $5 \times 10^4 - 10^5$ celler/ml

Testkemikaliekoncentrationer

22. Der kan udføres indledende test til at fastlægge det koncentrationsområde, hvor der kan forventes en effekt. Til den endelige test skal der vælges mindst fem koncentrationer, der er ordnet i en geometrisk serie med en faktor på højst 3,2. For testkemikalier med flad koncentrationsresponskurve kan en højere faktor være berettiget. Koncentrationsserien skal fortrinsvis dække det område, der medfører 5-75 % hæmning af algevæksthastigheden.

Replikater og kontroller

23. Testens design skal indeholde tre replikater ved hver testkoncentration. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der anvendes flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal være mindst tre replikater af kontrollerne, og ideelt dobbelt så mange som antallet af replikater for hver testkoncentration.
24. Der kan fremstilles et separat sæt testopløsninger til analytisk bestemmelse af testkemikaliekoncentrationerne (se punkt 36 og 38).
25. Anvendes der et opløsningsmiddel til at bringe testkemikaliets opløsning, skal testen omfatte ekstra kontroller indeholdende opløsningsmidlet i samme koncentration som i testkulturerne.

Fremstilling af podekultur

26. For at lade de testede alger tilpasse sig til testbetingelserne og sikre, at algerne er i den eksponentielle vækstfase, når de benyttes til podning af testopløsningerne, fremstilles en podekultur i testsubstratet, 2-4 dage før testen begynder. Mængden af algebiomasse skal tilpasses, så der bliver eksponentiel vækst i podekulturen, indtil testen begynder. Podekulturen skal inkuberes under samme betingelser som testkulturerne. Stigningen i biomasse i podekulturen skal måles, for at sikre at væksten er inden for normalområdet for den pågældende teststamme under dyrkningsbetingelserne. Et eksempel på fremgangsmåden ved dyrkning af alger er beskrevet i tillæg 4. For at undgå synkrone celledelinger under testen kan et ekstra trin til formering af podekulturen være nødvendigt.

Fremstilling af testopløsninger

27. Alle testopløsninger skal indeholde samme koncentration af næringssubstrat og initial biomasse af testalger. Testopløsningerne af de valgte koncentrationer fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af testkemikaliets opløsningsmiddel blandes med næringssubstrat og podekultur. Stamopløsningerne fremstilles normalt ved opløsning af testkemikaliets opløsningsmiddel i testsubstrat.
28. Opløsningsmidler, f.eks. acetone, t-butylalkohol og dimethylformamid, kan bruges som bæremedier, når kemikalier med ringe vandopløselighed skal tilsættes testsubstratet (2)(3). Koncentrationen af opløsningsmiddel må ikke være over 100 µl/l, og det skal tilsættes i samme koncentration til alle kulturer (også kontrollerne) i testserien.

Inkubation

29. Testbeholderne lukkes med luftgennemtrængelige propper. Testbeholderne omrystes og anbringes i dyrkningsapparatet. Under testen skal algerne holdes opslæmmede og CO₂-overførslen lettes. Kontinuerlig omrystning eller omrøring er derfor nødvendig. Kulturerne skal være reguleret til en temperatur i området 21 til 24 °C, og den fastsatte temperatur skal holdes inden for ± 2 °C. Til andre arter end de i tillæg 2 anførte, f.eks. tropiske arter, kan højere temperaturer være hensigtsmæssigt, forudsat at validitetskriterierne kan opfyldes. Det anbefales at placere kolberne i vilkårlig rækkefølge og dagligt bytte rundt på dem i inkubatoren.
30. Kontrolmediets pH må højst stige med 1,5 enheder under testen. For metaller og kemikalier, der kun er delvist ioniseret ved pH-værdier omkring testens pH, kan det være nødvendigt at begrænse pH-afvigelsen for at få reproducerbare og veldefinerede resultater. Begrænsning af afvigelsen til < 0,5 pH-enhed er teknisk mulig og kan opnås ved at sikre tilstrækkelig CO₂-masseoverførsel fra den omgivende luft til testopløsningen, f.eks. ved at øge omrystningshastigheden. En anden mulighed er at nedsætte CO₂-behovet ved enten at reducere den initiale biomasse eller testens varighed.

31. Den overflade, som kulturerne inkuberes på, skal have kontinuerlig, ensartet fluorescerende belysning, f.eks. af typen »cool-white« eller »daylight«. Forskellige stammer af alger og cyanobakterier har forskelligt lysbehov. Der skal vælges en passende lysintensitet i forhold til den anvendte organisme. Til de anbefalede arter af grønalger skal lysintensiteten i testopløsningernes niveau vælges i området $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, målt i det fotosyntetisk effektive bølglængdeområde 400–700 nm med en egnet detektor. Visse arter, navnlig *Anabaena flos-aquae*, vokser godt ved lavere lysintensitet og kan tage skade af højere intensitet. Til sådanne arter bør vælges en gennemsnitlig lysintensitet i området $40\text{--}60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. (For lysmåleinstrumenter kalibreret i lux vil den anbefalede lysintensitet på $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ med cool-white-lys tilnærmelsesvis svare til området 4 440–8 800 lux). Lysintensiteten må ikke afvige mere end $\pm 15\%$ fra den gennemsnitlige lysintensitet i hele inkubationsområdet.

Testens varighed

32. Testens varighed er normalt 72 timer. Kortere eller længere varighed kan dog anvendes, forudsat at alle validitetskriterierne i punkt 11 kan opfyldes.

Målinger og analytiske bestemmelser

33. Algebiomassen i hver kolbe bestemmes mindst en gang dagligt i hele testperioden. Hvis målingerne foretages på små volumener, der er udtaget af testopløsningen med pipette, bør disse ikke erstattes.
34. Måling af biomasse foretages enten ved manuel celletælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller (i celletal og/eller biovolumen). Andre teknikker kan anvendes, f.eks. flowcytometri, in vitro eller in vivo chlorophyll-fluorescens (5)(6) eller optisk densitet, hvis der kan påvises tilfredsstillende korrelation med biomasse i hele det biomasseområde, der forekommer under testen.
35. Opløsningernes pH skal måles ved testens start og slutning.
36. Hvis der foreligger en analysemetode til bestemmelse af testkemikaliets i det anvendte koncentrationsområde, skal testopløsningerne analyseres til efterprøvning af startkoncentrationerne og af, at eksponeringskoncentrationerne overholdes under testen.
37. Hvis eksponeringskoncentrationerne under testen forventes at afvige mindre end 50% fra de nominelle værdier, kan det være tilstrækkeligt at bestemme en høj og en lav testkemikaliekoncentration og en koncentration omkring den forventede EC_{50} ved testens begyndelse og slutning. Når koncentrationen ikke kan forventes at holde sig inden for $80\text{--}120\%$ af den nominelle koncentration, anbefales analytisk bestemmelse af alle testkoncentrationer ved testens begyndelse og slutning. Til flygtige, ustabile eller stærkt adsorberende testkemikalier anbefales det at udtage supplerende prøver til analyse med 24 timers mellemrum i hele eksponeringsperioden for bedre at bestemme tabet af testkemikaliets. For disse kemikalier kan der være brug for supplerende replikater. I alle tilfælde behøver testkemikaliekoncentrationen kun bestemmes på en testbeholder-replikat ved hver testkoncentration (eller indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).
38. Testsubstrater, der er fremstillet specielt til analyse af eksponeringskoncentrationerne under testen, skal behandles på samme måde som dem, der anvendes til testning, dvs. podes med alger og inkuberes ved identiske betingelser. Hvis koncentrationen af opløst testkemikalie kræves analyseret, kan det være nødvendigt at separere algerne fra substratet. Separationen skal fortrinsvis ske ved centrifugering med lav g-kraft, som er tilstrækkelig til at få algerne til at bundfælde.
39. Hvis det kan konstateres, at testkemikaliekoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for $\pm 20\%$ af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end $\pm 20\%$, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelsoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (3)(7).
40. Algevæksthæmning er et mere dynamisk testsystem end de fleste andre korttidstest for akvatisk toksicitet. De faktiske eksponeringskoncentrationer kan derfor være vanskelige at fastlægge, navnlig for adsorberende

kemikalier, der testes ved lav koncentration. I sådanne tilfælde er testkemikaliets forsvinden fra opløsningen ved adsorption til den voksende algebiomasse ikke ensbetydende med, at det forsvinder fra testsystemet. Ved analyse af testresultatet skal det kontrolleres, om et fald i testkemikaliekoncentrationen under testen ledsages af et fald i væksthæmningen. Hvis det er tilfældet, kan det overvejes at benytte en egnet model, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (7). Hvis ikke, kan det være hensigtsmæssigt at basere analysen af resultaterne på de initiale (nominelle eller målte) koncentrationer.

Andre observationer

41. Der skal foretages mikroskopisk undersøgelse for at verificere, at podekulturen fremtræder normal og sund, og konstatere, om algernes udseende er unormalt ved testens slutning (som en mulig følge af eksponeringen for testkemikaliets).

Grænsetest

42. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikaliets er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier gælder for grænsetesten, bortset fra at antallet af behandlingsreplikater skal være mindst seks. Responsvariablene i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test. Er variansen i de to grupper uens, skal der anvendes en t-test justeret for forskel i varians.

DATA OG RAPPORTERING

Optegning af vækstkurver

43. Biomassen i testbeholderne kan angives i enheder svarende til den til målingen anvendte surrogatparameter (f. eks. celletal eller fluorescens).
44. Der opstilles en tabel over den beregnede biomassekoncentration i testkulturer og kontroller sammen med teststofkoncentrationer og måletidspunkter, målt med en mindste opløsning på hele timer, og derudfra optegnes vækstkurverne. Både logaritmisk og lineær afbildning kan være nyttig på dette første trin, men logaritmisk afbildning er obligatorisk og giver sædvanligvis en bedre fremstilling af variationerne i vækstmønsteret i løbet af testperioden. Bemærk, at eksponentiel vækst frembringer en ret linje, når den afbildes på en logaritmisk skala, og at linjens hældning angiver den specifikke væksthastighed.
45. Ud fra kurverne undersøges det, om kontrollkulturene vokser eksponentielt med den forventede hastighed igennem hele testen. Alle datapunkter og kurvernes udseende kontrolleres kritisk, og rådata og de anvendte metoder gås efter for eventuelle fejl. Navnlig kontrolleres alle datapunkter, der synes at afvige med en systematisk fejl. Det er indlysende, at hvis metodefejl kan konstateres og/eller må anses for stærkt sandsynlige, må det pågældende punkt markeres som afvigende og udelades af den efterfølgende statistiske analyse. (En algekoncentration på nul i den ene af tre testbeholderreplikater kan tyde på, at beholderen enten ikke er blevet podet korrekt eller ikke har været tilstrækkelig rengjort.) Begrundelsen for at afvise et datapunkt som afvigende skal klart angives i testrapporten. Som begrundelse godtages kun (sjældne) metodefejl, ikke blot ringe præcision. Til identifikation af afvigende værdier har statistiske metoder kun begrænset værdi ved problemer af denne art og kan ikke erstatte en faglig vurdering. Afvigende værdier (mærket som sådanne) skal helst bibeholdes blandt de datapunkter, der vises ved efterfølgende fremstilling af data i grafer eller tabeller.

Responsvariable

46. Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på væksten af alger. I nærværende testmetode beskrives to responsvariable, da præferencer og myndighedskrav er forskellige fra land til land. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle lande, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariable a) og b).
 - a) gennemsnitlig specifik væksthastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske stigning i biomasse i løbet af testperioden, angivet pr. døgn
 - b) udbytte: Denne responsvariabel er biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start.

47. Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og at forskellen mellem dem må have sig i øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (ErC_x) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte (EyC_x), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik væksthastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for alger i ikke-begrænsede kulturer, mens toksicitet vurderes på grundlag af virkningerne på væksthastigheden og ikke afhænger af kontrollens absolutte specifikke væksthastighed, koncentrationsresponskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariablen for udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variable. E_yC_x afhænger af den specifikke væksthastighed af de algearter, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke væksthastighed, som kan variere mellem forskellige arter og endda algestammer. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer hos forskellige algearter eller -stammer. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, indeholder nærværende testmetode toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse lande.

Gennemsnitlig væksthastighed

48. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i biomassen ved hjælp af ligningen for hver enkelt testbeholder med kontrol- og behandlingsprøver [1]:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dag}^{-1}) \quad [1]$$

hvor:

μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed fra tiden i til j

X_i er biomassen ved tiden i

X_j er biomassen ved tiden j .

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimer for variansen.

49. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i hele testperioden (sædvanligvis dag 0-3) beregnes ved at bruge den nominelt podede biomasse som startværdi i stedet for en målt startværdi, da der herved sædvanligvis opnås størst præcision. Hvis udstyret til biomassemåling tillader tilstrækkelig nøjagtig bestemmelse af den lille mængde podede biomasse (f.eks. med flowcytometer), kan den målte initiale biomassekonzentration anvendes. Desuden foretages trinvis beregning af den specifikke væksthastighed for hver dag af testen (dag 0-1, 1-2 og 2-3), og det undersøges, om væksthastigheden i kontrollen forbliver konstant (se validitetskriterierne i punkt 11). Er den specifikke væksthastighed væsentligt lavere på dag et end den totale gennemsnitlige specifikke væksthastighed, kan dette tyde på, at der er tale om en lag-fase. Mens en lag-fase i kontrolkulturerne kan minimeres og i praksis elimineres ved korrekt formering af forkulturen, kan en lag-fase i eksponerede kulturer tyde på, at der er tale om restitution efter indledende toksisk stress, eller at eksponeringen efter den initiale eksponering er mindsket på grund af tab af testkemikalie (herunder sorption på algebiomassen). Trinvis beregning af væksthastigheden kan derfor anvendes til at vurdere testkemikaliet virkninger i eksponeringsperioden. Væsentlige forskelle mellem den trinvist beregnede væksthastighed og den gennemsnitlige væksthastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig.

50. Den procentuelle hæmning af væksthastigheden beregnes for hver behandlingsreplik af ligningen [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad [2]$$

hvor:

$\% I_r$ = procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μ_c = middelværdi af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (μ) i kontrolgruppen

μ_T = gennemsnitlig specifik væksthastighed for behandlingsreplikaten.

51. Når der anvendes opløsningsmiddel til fremstilling af testopløsningerne, skal hæmningen i procent beregnes ved hjælp af opløsningsmiddelkontroller i stedet for kontroller uden opløsningsmiddel.

Udbytte

52. Udbytte beregnes som biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start for hver enkelt beholder med kontrol- eller behandlingsprøve. For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimer for variansen. Udbyttehæmningen i procent ($\% I_y$) kan beregnes for hver behandlingsreplikat som følger:

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

hvor:

$\% I_y$ = udbyttehæmning i procent

Y_c = gennemsnitligt udbytte i kontrolgruppen

Y_T = størrelsen af udbyttet for behandlingsreplikaten.

Optegning af koncentrationsresponskurve

53. Hæmningen i procent afsættes som funktion af logaritmen til testkemikaliekoncentrationen, og grafen undersøges nøje, idet der ses bort fra alle datapunkter, der er udpeget som afvigende i første fase. Der lægges en jævn linje gennem datapunkterne, enten i fri hånd eller med computerinterpolation, for at få et første indtryk af sammenhængen mellem koncentration og respons, hvorefter der fortsættes med en mere dybtgående metode, fortrinsvis en computerbaseret statistisk metode. Afhængigt af den påtænkte anvendelse af data, dataenes kvalitet (præcision) og mængde samt adgangen til dataanalyseværktøjer kan det blive besluttet (undertiden med god grund) at standse dataanalysen på dette trin og blot aflæse nøgletallene EC_{50} og EC_{10} (og/eller EC_{20}) på frihåndskurven (se også afsnittet nedenfor om stimulerende virkninger). Af gyldige grunde til ikke at benytte en statistisk metode kan nævnes:

- Dataene er ikke egnede til at give mere pålidelige resultater ved hjælp af computermetoder end ved et fagligt skøn — nogle computerprogrammer kan i sådanne situationer endda være ude af stand til at finde en pålidelig løsning (f.eks. hvis iterationen ikke konvergerer).
- Stimuleret vækstrespons kan ikke behandles fyldestgørende med de forhåndenværende computerprogrammer (se nedenfor).

Statistiske metoder

54. Målet er at formulere den kvantitative sammenhæng mellem koncentration og respons ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet linear regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (8), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger bedre. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (8). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på kvantale data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne håndtere vækst- eller biomassedata. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x -værdier ud fra kontinuerlige data findes i henvisning (9), (10) og (11). Brugen af ikke-lineær regressionsanalyse er nærmere beskrevet i tillæg 5.

55. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes sammenhængen mellem koncentration og respons til at beregne punktestimater for EC_x -værdier. Når det er muligt, skal der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages på responsværdierne for de enkelte replikater, ikke på behandlingsgruppegennemsnit. Hvis ikke-lineær kurvetilpasning er vanskelig eller umulig på grund af for stor spredning i dataene, kan problemet omgås ved udførelse af regressionen på gruppegennemsnittet som en praktisk måde at mindske indflydelsen fra formodet afvigende værdier på. Når denne mulighed udnyttes, skal det i testrapporten anføres, at der her er afvejet fra den normale procedure, fordi kurvetilpasning med de enkelte replikater ikke har givet et godt resultat.
56. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (13).
57. For at beregne et estimat for LOEC og dermed NOEC og testkemikaliet virkninger på væksthastigheden må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan eventuelt bruges (12) (14) (15) (16) (17). Det må vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (17). Hertil kan Levenes eller Bartlett's test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (11).
58. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater EC_x . Der er ikke fastlagt en passende værdi for x til denne algetest. Et område på 10 til 20 % synes at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20} .

Vækststimulation

59. Ved lave koncentrationer ses undertiden vækststimulation (negativ hæmning). Dette kan enten skyldes hormese («toksisk stimulation»), eller at der er tilsat stimulerende vækstfaktorer sammen med testmaterialet til det anvendte minimalsubstrat. Bemærk, at tilsætning af uorganiske næringsstoffer ikke skulle have nogen direkte virkning, da testmediet skal indeholde overskud af næringsstoffer under hele testen. Sædvanligvis kan der ses bort fra lavdosisstimulation i EC_{50} -beregninger, medmindre den er ekstrem. Er den ekstrem, eller skal der beregnes en EC_x -værdi for en lav x -værdi, kan særlige procedurer dog være nødvendige. Om muligt bør det undgås at lade stimulerende responsværdier udgå af dataanalysen, og kan den forhåndenværende kurvetilpasningssoftware ikke acceptere en lav grad af stimulation, kan der anvendes lineær interpolation med bootstrapping. Hvis stimulationen er ekstrem, kan det overvejes at anvende en hormese-model (18).

Ikke-toksisk væksthæmning

60. Lysabsorberende teststoffer kan nedsætte væksthastigheden, fordi de ved at skygge mindsker den tilgængelige lysmængde. Sådanne fysiske virkninger må adskilles fra toksiske virkninger ved ændring af testbetingelserne og skal rapporteres særskilt. Vejledning findes i (2) og (3).

TESTRAPPORT

61. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- fysisk tilstand og relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed
- kemiske identifikationsdata (f.eks. CAS-nr.), herunder renhed (urenheder).

Testede arter:

- stamme, leverandør eller kilde og anvendte dyrkningsbetingelser.

Testbetingelser:

- startdato og varighed for testen
- beskrivelse af testens design: testbeholdere, kulturvolumen, biomassetæthed ved testens start
- substratets sammensætning
- testkoncentrationer og replikater (f.eks. antal replikater, antal testkoncentrationer og den anvendte geometriske progression)
- beskrivelse af fremstillingen af testopløsningerne, herunder brug af opløsningsmiddel osv.
- dyrkningsapparat
- lysintensitet og -kvalitet (kilde, homogenitet)
- temperatur
- testede koncentrationer: de nominelle testkoncentrationer og alle resultater af bestemmelser af testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne. Metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænse i testmatrixen skal rapporteres
- alle fravigelser af nærværende testmetode
- metode til bestemmelse af biomasse og påvisning af korrelation mellem den målte parameter og tørvægten.

Resultater:

- pH-værdi ved testens start og slutning for alle behandlinger
- biomasse for hver kolbe ved hvert målepunkt samt metode til måling af biomasse
- vækstkurver (biomasse som funktion af tiden)
- beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne
- grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning
- estimater for toksiciteten for responsvariablene, f.eks. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at bestemme dem
- hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindst signifikante forskel),
- enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling
- eventuelle andre observerede virkninger, f.eks. morfologiske ændringer af algerne
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

- (1) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1993), ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.
- (2) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1998), ISO/DIS 14442, Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- (3) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Satety Publitations, Series on Testing and Assessment No. 23, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (4) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1998), ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

-
- (5) P. Mayer, R. Cuhel og N. Nyholm (1997), A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests, *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) R. E. Slovencey og P. J. Hanna (1997), In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925.
- (7) S. L. Simpson, M. G. E. Roland, J. L. Stauber og G. E. Batley (2003), Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints, *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
- (8) E. R. Christensen og N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Env. Sci. Technol.*, 19: 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
- (10) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
- (11) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (12) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (13) Norberg-King T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- (14) C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) N. R. Draper og H. Smith (1981), *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, New York.
- (18) P. Brain og R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner og forkortelser anvendes i denne testmetode:

Biomasse er tørvægten af levende materiale, som er til stede i en population, i et givet volumen, f.eks. mg alger/liter testopløsning. »Biomasse« defineres sædvanligvis som masse, men skal i denne test forstås som masse pr. volumenenhed. I denne test anvendes typisk målinger af surrogater for biomasse som f.eks. celletal, fluorescens mv., hvorfor betegnelsen »biomasse« ligeledes dækker disse surrogatmåleværdier.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Variationskoefficient er et dimensionsløst mål for variabiliteten af en parameter, defineret som forholdet mellem standardafvigelsen og middelværdien. Den kan også angives i procent. Middelværdien af variationskoefficienten for den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i kontrolkulturreplikater beregnes som følger:

1. Variationskoefficienten beregnes som % af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed ved hjælp af de trinvist beregnede daglige vækstrater for den pågældende replikat.
2. Der beregnes et gennemsnit af alle værdier beregnet i punkt 1. Deraf fås den gennemsnitlige variationskoefficient for den beregnede trinvis daglige specifikke vækstrate i kontrolkulturreplikater.

EC_x er den koncentration af testkemikalie opløst i testsubstratet, der medfører en væksthæmning på x % (f.eks. 50 %) af testorganismen inden for en angiven eksponeringsperiode (som angives udtrykkeligt, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis væksthastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for væksthastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield).

Næringssubstrat er det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvori algerne vokser, når de eksponeres for testkemikallet. Normalt er testkemikallet opløst i testsubstratet.

Væksthastighed (gennemsnitlig specifik væksthastighed) er den logaritmiske biomasseforøgelse i eksponeringsperioden.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) er den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikallet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning, der mindst svarer til den, som iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Nuleffektkoncentration (No Observed Effect Concentration, NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

Responsvariabel er en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målte parametre, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende testmetode er væksthastigheder og udbytte responsvariable, der er afledt ved måling af biomasse direkte eller af et af de nævnte surrogater.

Specifik væksthastighed er en responsvariabel, der er defineret som forholdet mellem ændringen i den naturlige logaritme for en observationsparameter (i nærværende testmetode, biomasse) og det tilsvarende tidsrum.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Udbytte er værdien af en målevARIABLE ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variabelen ved eksponeringsperiodens start, dvs. stigningen i biomasse under testen.

Tillæg 2

Stammer, der er påvist at være velegnede til testen**Grønalger**

Pseudokirchneriella subcapitata (tidligere benævnt *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (tidligere benævnt *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Diatoméer

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobakterier

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Kilder til stammer

De anbefalede stammer fås som monokulturer fra følgende samlinger (i alfabetisk rækkefølge):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Det Forenede Kongerige

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
TYSKLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

Udseende og karakteristika af anbefalede arter

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Udseende	Krumme, skrueformede enkelt-celler	Ovale, hovedsagelig enkelt-celler	Stave	Kæder af ovale celler	Stave
Størrelse (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Celle volumen (µm ³ /celle)	40-60 ⁽¹⁾	60-80 ⁽¹⁾	40-50 ⁽¹⁾	30-40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Tørvægt af celle (mg/celle)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Væksthastighed ⁽³⁾ (dag ⁻¹)	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 - 2,4

⁽¹⁾ Målt med elektronisk partikeltæller

⁽²⁾ Beregnet af størrelsen

⁽³⁾ Hyppigste observerede væksthastighed i OECD-substrat ved en lysintensitet på ca. 70 µE m⁻² s⁻¹ og 21 °C

Særlige anbefalinger for dyrkning og håndtering af de anbefalede testarter***Pseudokirchneriella subcapitata* og *Desmodesmus subspicatus***

Disse grønalgarter er sædvanligvis lette at holde i forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Cellerne er normalt solitære, og måling af celletætheden kan let foretages med elektronisk partikeltæller eller i mikroskop.

Anabaena flos-aquae

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Det er især vigtigt at undgå, at batchkulturen kommer ud af den logaritmiske vækstfase, når den udskiftes, da restitution på dette punkt er vanskelig.

Anabaena flos-aquae udvikler aggregater af sammenfiltrede kæder af celler. Størrelsen af aggregaterne kan være forskellig, afhængigt af dyrkningsbetingelserne. Det kan være nødvendigt at bryde sådanne aggregater op, før biomassen kan bestemmes ved tælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller.

For at nedsætte variabiliteten af tællingerne kan kæderne brydes op ved sonikering af delprøver. Hvis sonikeringen fortsættes længere end nødvendigt for at bryde kæderne til kortere længder, kan cellerne blive ødelagt. Intensitet og varighed af sonikeringen skal være ens for alle behandlinger.

For at medvirke til at kompensere for variabiliteten skal der tælles et tilstrækkeligt antal felter på hæmocytometeret (mindst 400 celler). Derved fås mere pålidelige tæthedsbestemmelser i mikroskop.

Til bestemmelse af det totale cellevolumen af *Anabaena* kan en elektronisk partikeltæller anvendes efter forudgående forsigtig sonikering for at bryde cellekæderne. Sonikeringsenergien skal tilpasses, så bristning af celler undgås.

Ved hjælp af hvirvelomrører eller en tilsvarende velegnet metode skal det sikres, at den anvendte algesuspension til podning af testbeholderne er godt opblandet og homogen.

Testbeholderne anbringes på et roterende eller frem- og tilbagegående rystebord ved ca. 150 omdr./min. I stedet kan der anvendes intermitterende omrystning for at mindske *Anabaenas* tilbøjelighed til sammenklumpning. I tilfælde af sammenklumpning skal der drages omsorg for, at prøverne til biomassebestemmelse bliver repræsentative. Energisk omrystning kan være nødvendig før prøvetagning for at skille algeklumperne ad.

Synechococcus leopoliensis

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne.

Synechococcus leopoliensis vokser som solitære, stavformede celler. Cellerne er meget små, hvilket komplicerer tælling i mikroskop til biomassebestemmelse. Elektroniske partikeltællere, der er udstyret til tælling af partikler ned til ca. 1 µm, er gode. In vitro fluorometrisk måling kan ligeledes anvendes.

Navicula pelliculosa

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Bemærk, at substratet skal indeholde silikat.

Navicula pelliculosa kan danne aggregater under visse vækstbetingelser. På grund af dannelse af lipider vil algecellerne undertiden have tendens til at akkumulere i overfladefilmen. Under sådanne omstændigheder må der ved udtagning af delprøver til biomassebestemmelse træffes særlige foranstaltninger for at sikre, at prøverne er repræsentative. Det kan være nødvendigt med kraftig omrystning, f.eks. med en hvirvelomrører.

Tillæg 3

Næringssubstrater

Et af nedenstående to næringssubstrater kan anvendes:

- OECD-substrat: Det oprindelige substrat fra OECD TG 201, også i henhold til ISO 8692
- US. EPA-substrat AAP, ligeledes i henhold til ASTM.

Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Sammensætning af AAP-substratet (US. EPA) og OECD TG 201-substratet.

Komponent	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Det molære forhold mellem EDTA og jern er lidt over 1. Derved undgås udfældning af jern, samtidig med at chelatering af tungmetalioner minimeres.

I testen med diatoméen *Navicula pelliculosa* skal begge substrater suppleres med $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ til en koncentration på 1,4 mg Si/l.

Substratets pH opnås ved ligevægt mellem substratets carbonatsystem og partialtrykket af CO_2 i atmosfærisk luft. En omtrentlig sammenhæng mellem pH ved 25 °C og den molære bicarbonatkoncentration er givet ved:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3]$$

Ved 15 mg NaHCO_3 /l er $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (U.S. EPA-substrat), og ved 50 mg NaHCO_3 /l er $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (OECD-substrat).

Testsubstraternes sammensætning af grundstoffer

Grundstof	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Fremstilling af OECD-substrat

Næringsstof	Koncentration i stamopløsning
Stamopløsning 1: makronæringsstoffer	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stamopløsning 2: jern	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Næringsstof	Koncentration i stamopløsning
Stamopløsning 3: sporstoffer	
H_3BO_3	185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Stamopløsning 4: bicarbonat	
NaHCO_3	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Stamopløsningen steriliseres ved membranfiltrering (middelporediameter 0,2 µm) eller autoklaving (120 °C, 15 min). Opløsningerne opbevares i mørke ved 4 °C.

Stamopløsning 2 og 4 må ikke autoklaveres, men skal steriliseres ved membranfiltrering.

Næringssubstrater fremstilles ved tilsætning af et passende volumen stamopløsning 1-4 til vand:

Til 500 ml steriliseret vand tilsættes der:

10 ml stamopløsning 1

1 ml stamopløsning 2

1 ml stamopløsning 3

1 ml stamopløsning 4

Der tilsættes steriliseret vand til 1 000 ml.

Giv substratet tid til at ækvilibrere med atmosfærens CO_2 , om nødvendigt ved nogle timers gennembobling med sterilfiltreret luft.

Fremstilling af U.S. EPA-substrat

- 1 ml af hver stamopløsning i 2.1–2.7 tilsættes til ca. 900 ml deioniseret eller destilleret vand og fortyndes derefter til 1 liter.
- Stamopløsninger af makronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand. Reagens 2.1, 2.2, 2.3 og 2.4 kan kombineres til en stamopløsning.

2.1 NaNO_3 12,750 g

2.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6,082 g

2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g
2.4	Stamopløsning af mikronæringsstoffer (se 3).	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	NaHCO_3	7,500 g
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Se bemærkning 1.

Bemærkning 1: Anvendes kun til diatomé-testarter. Kan tilsættes direkte (202,4 mg) eller som stamopløsning til en endelig Si-koncentration i substratet på 20 mg/l.

3. Stamopløsningen af mikronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg
3.2	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,690 mg
3.3	ZnCl_2	1,635 mg
3.4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,880 mg
3.5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg
3.6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,630 mg
3.7	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg
3.8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000 mg [dinatrium-(ethylendinitrilo)-tetraacetat]
3.9	$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg, se bemærkning 2.

Bemærkning 2: Bruges kun i substrat til stamkulturer af diatoméarter.

4. pH justeres til $7,5 \pm 0,1$ med 0,1 N eller 1,0 N NaOH eller HCl.
5. Substratet filtreres over i en steril beholder, enten gennem et 0,22 μm membranfilter, hvis der skal bruges partikeltæller, eller et 0,45 μm filter, hvis der ikke skal bruges partikeltæller.
6. Substratet opbevares i mørke ved ca. 4 °C, til det skal bruges.
-

Tillæg 4

Eksempel på fremgangsmåde ved dyrkning af alger**Almindelige bemærkninger**

Formålet med dyrkningen efter følgende metode er at fremstille algekulturer til toksicitetstest.

Det skal ved hjælp af egnede metoder sikres, at algekulturerne ikke er inficeret med bakterier. Axeniske kulturer kan være ønskeligt, men der skal fremstilles og anvendes monokulturer af alger.

Alle operationer skal udføres med steril teknik for at undgå kontaminering med bakterier og andre alger.

Udstyr og materialer

Se under testmetode: Apparatur

Metode til fremstilling af algekulturer*Fremstilling af næringssubstrater (medier)*

Alle næringssalte i substratet fremstilles som koncentrerede stamopløsninger, der opbevares mørkt og koldt. Disse opløsninger steriliseres ved filtrering eller autoklavering.

Substratet fremstilles ved, at den korrekte mængde stamopløsning sættes til destilleret vand, idet der udvises omhu for at undgå kontaminering. Til faste substrater tilsættes 0,8 procent agar.

Stamkultur

Stamkulturerne er små algekulturer, som regelmæssigt overføres til frisk substrat, og som benyttes som udgangsmateriale til testen. Hvis disse kulturer ikke anvendes regelmæssigt, stryges de ud på skråagar. Sådanne kulturer overføres til frisk substrat mindst hver anden måned.

Stamkulturerne dyrkes i koniske kolber med et egnet substrat (volumen ca. 100 ml). Dyrkes algerne ved 20 °C med kontinuerlig belysning, er overførsel en gang ugentligt påkrævet.

Ved overførslen overføres en mængde af den »gamle« kultur med sterile pipetter til en kolbe med frisk substrat, så startkoncentrationen for hurtigtvoksende arter er ca. 100 gange mindre end i den gamle kultur.

En arts væksthastighed kan bestemmes ud fra vækstkurven. Hvis denne kendes, kan man skønne, ved hvilken tæthed kulturen må overføres til et nyt substrat. Dette skal gøres, før kulturen når dødsfasen.

Forkultur

Forkulturen har til formål at give en passende algemængde til podning af testkulturerne. Forkulturer inkuberes under testbetingelserne og tages i anvendelse, medens væksten stadig er eksponentiel, normalt efter 2-4 dage. Algekulturer, der indeholder deforme eller abnorme celler, kasseres.

Tillæg 5

Dataanalyse ved ikke-lineær regression**Generelle betragtninger**

Responsen i algetest og andre test af mikrobiel vækst — vækst af biomasse — er i sig selv en kontinuert eller metrisk variabel — en proceshastighed, når væksthastigheden anvendes, og integralet af væksthastigheden med hensyn til tiden, når biomasse vælges. Begge henføres til den tilsvarende gennemsnitsrespons for ikke-eksponerede kontrolreplikater, der udviser maksimal respons ved de anvendte betingelser — med lys og temperatur som de primære bestemmende faktorer i algetesten. Systemet er distribueret eller homogent, og biomassen kan betragtes som en helhed uden hensyn til enkeltceller. Variansfordelingen for den type respons, der ses i et sådant system, afhænger udelukkende af eksperimentelle faktorer (dette beskrives typisk ved, at fejlen er log-normalfordelt eller normalfordelt). Dette er modsat typiske bioassay-responser med kvantale data, hvor det dominerende bidrag til variansen ofte antages at være de enkelte organismers tolerance (der typisk er binomialfordelt). Responsen fra kontrollerne er her nulniveau eller baggrundsniveau.

I det ukomplicerede tilfælde aftager den normaliserede eller relative respons, r , monotont fra 1 (ingen hæmning) til 0 (100 procents hæmning). Bemærk, at der til alle responser er knyttet en fejl, og at tilsyneladende negative hæmningsværdier ved beregningen kan tilskrives tilfældige fejl alene.

Regressionsanalyse*Modeller*

Med regressionsanalyse tilstræbes det at beskrive koncentrationsresponskurven som en matematisk regressionsfunktion $Y = f(C)$ eller oftere $F(Z)$, hvor $Z = \log C$. Med den omvendte funktion $C = f^{-1}(Y)$ kan der beregnes EC_x -værdier, herunder EC_{50} , EC_{10} og EC_{20} , med tilhørende 95 % konfidensgrænser. Flere forskellige enkle matematiske funktioner har vist sig velegnede til at beskrive den koncentrationsresponsammenhæng, der optræder i væksthæmningstest med alger. Af sådanne funktioner kan nævnes den logistiske ligning, den asymmetriske Weibull-ligning og log-normalfordelingsfunktionen, der alle er S-formede kurver, der asymptotisk går mod nul for $C \rightarrow 0$, og mod en for $C \rightarrow$ uendeligt.

Anvendelse af modeller med kontinuerte tærskelfunktioner (f.eks. »the Kooijman model for inhibition of population growth« Kooijman et al. 1996) er for nylig blevet foreslået som et alternativ til asymptotiske modeller. I denne model antages, at der ikke er nogen virkninger ved koncentrationer under en bestemt tærskel, EC_0^+ , som estimeres ved at ekstrapolere responskoncentrationsforholdet til skæring med koncentrationsaksen ved hjælp af en simpel kontinuert funktion, der ikke er differentiabel i udgangspunktet.

Bemærk, at analysen kan bestå i en simpel minimering af summer af residualkvadrater (når variansen forudsættes konstant) eller af vægtede kvadrater, når der kompenseres for variansheterogenitet.

Fremgangsmåde

Fremgangsmåden kan sammenfattes således: Der vælges en passende funktion, $Y = f(C)$, som tilpasses til dataene ved ikke-lineær regression. Det må foretrækkes at anvende målinger fra hver enkelt kolbe frem for gennemsnitsværdier for replikaterne, da man derved får mest mulig information fra dataene. Hvis variansen derimod er høj, tyder praktisk erfaring på, at der ved brug af gennemsnitsværdier af replikaterne fås en mere robust matematisk beregning, der er mindre påvirkelig af systematiske fejl i data end bibeholdelse af de enkelte datapunkter.

Den tilpassede kurve og de målte data afsættes, og det undersøges, om tilpasningen af kurven er tilfredsstillende. Analyse af residualer kan være et særdeles nyttigt redskab til dette formål. Hvis den valgte funktion for koncentrationsresponsammenhængen ikke beskriver hele kurven eller en vigtig del af denne som f.eks. responsen i koncentrationslavpunktet, vælges en anden mulighed for kurvetilpasning — f.eks. en ikke-symmetrisk kurve som Weibull-funktionen i stedet for en symmetrisk. Negativ hæmning kan være et problem ved brug af f.eks. log-normalfordelingsfunktionen, så der også her er brug for en alternativ regressionsfunktion. Det kan ikke anbefales at tildele en nulværdi

eller en lille positiv værdi til sådanne negative værdier, da det forvrænger fejlfordelingen. Det kan være hensigtsmæssigt at foretage separate kurvetilpasninger, f.eks. på den del af kurven, hvor hæmningen er lille, for at beregne et estimat for $EC_{low\ x}$ -værdierne. Af den tilpassede ligning beregnes (ved »omvendt beregning«, $C = f^{-1}(Y)$) karakteristiske punktestimater EC_x , og som minimum rapporteres EC_{50} -værdien og et eller to estimater for $EC_{low\ x}$. De praktiske erfaringer fra testene har vist, at algetesten sædvanligvis er tilstrækkelig præcis til at give et rimelig nøjagtigt estimat ved 10 % hæmning, hvis der er tilstrækkeligt med datapunkter — medmindre der ved lave koncentrationer optræder stimulation som konfunderende faktor. Nøjagtigheden af et estimat for EC_{20} er ofte betydeligt bedre end af en EC_{10} -værdi, da EC_{20} sædvanligvis ligger på den tilnærmelsesvis lineære del af den centrale del af koncentrationsresponskurven. Undertiden kan EC_{10} være vanskelig at fortolke på grund af vækststimulation. Selv om EC_{10} således normalt fås med tilstrækkelig nøjagtighed, anbefales det således, at man desuden altid rapporterer EC_{20} -værdien.

Vægtningsfaktorer

Den eksperimentelle varians er sædvanligvis ikke konstant, men indeholder typisk en proportional komponent, hvorfor rutinemæssig brug af vægtet regression vil være en fordel. Vægtningsfaktorerne til en sådan analyse antages normalt at være omvendt proportionale med variansen:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Mange regressionsprogrammer kan bruges til vægtet regressionsanalyse med vægtningsfaktorer angivet i en tabel. For nemheds skyld bør vægtningsfaktorerne normaliseres ved multiplikation med $n/\sum w_i$ (hvor n er antallet af datapunkter), således at deres sum bliver lig en.

Normalisering af respons

Normalisering med gennemsnitsresponsen i kontrollerne medfører visse principielle problemer foruden en ret kompliceret variansstruktur. Når responsværdierne divideres med kontrollerens gennemsnitsrespons for at få hæmningen i procent, indføres derved en ekstra fejl, der skyldes fejlen på middelværdien for kontrollerne. Medmindre denne fejl er ubetydelig, skal vægtningsfaktorerne i regressionen og konfidensgrænserne korrigeres for kovarians med kontrollen (Draper og Smith, 1981). Bemærk, at det er vigtigt med en høj præcision af estimatet for middelværdien af responsen i kontrollerne, for at den samlede varians af den relative respons kan blive minimeret. Denne varians kan angives således:

(indeks i henviser til koncentrationsniveau i og indeks 0 til kontrollerne)

$$Y_i = \text{Relativ respons} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

med variansen $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

og, eftersom $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$, og $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

med normalfordelte data og replikaterne m_i og m_0 : $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

bliver den totale varians af den relative respons Y_i

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Fejlen på middelværdien for kontrollerne er omvendt proportional med kvadratroden af det antal replikater af kontrollerne, som gennemsnittet er beregnet af, og undertiden kan det være berettiget at medtage historiske data for på denne måde at mindske fejlen stærkt. En alternativ metode er at undlade normalisering af dataene og i stedet tilpasse de absolutte responsværdier, også responsdata for kontrollerne, men herved indføres responsværdien for kontrollerne som en ekstra parameter, der skal indgå i tilpasningen ved ikke-lineær regression. Med en sædvanlig to-parameters regressionsligning kræver denne metode tilpasning af tre parametre og dermed flere datapunkter end ikke-lineær regression på data, der er normaliseret med en forud fastlagt respons for kontrollerne.

Omvendte konfidensintervaller

Beregning af konfidensintervaller i ikke-lineær regression ved hjælp af omvendt estimation er ret kompliceret og hører ikke til standardvalgene i almindelige statistikprogrampakker. Tilnærmede konfidensgrænser kan beregnes med standardprogrammer til ikke-lineær regression med re-parameterisering (Bruce og Versteeg, 1992), hvorved den matematiske ligning omskrives med de ønskede punkttestimater, f.eks. med EC_{10} og EC_{50} som de parametre, der skal estimeres. (Lad funktionen være $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentration})$, og benyt definitionsrelationerne $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ og $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ til at erstatte funktionen $f(\alpha, \beta, \text{koncentration})$ med den ækvivalente funktion $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentration})$).

En mere direkte beregning (Andersen et al., 1998) foretages ved at bibeholde den oprindelige ligning og bruge Taylor-udvikling omkring middelværdierne af r_i og r_0 .

På det seneste har »boot strap«-metoder vundet udbredelse. I sådanne metoder estimeres en empirisk variansfordeling ved hjælp af de målte data sammen med hyppig resampling, der styres af en generator af vilkårlige tal.

REFERENCER

S. A. L. M. Kooijman, A. O. Hanstveit og N. Nyholm (1996), No-effect concentrations in algal growth inhibition tests, *Water Research*, 30, 1625-1632.

N. R. Draper og H. Smith (1981), *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, New York.

R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

J. S. Andersen, H. Holst, H. Spliid, H. Andersen, A. Baun og N. Nyholm (1998), Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response, *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

4) Kapitel C.11 affattes således:

»C.11. AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST (KULSTOF- OG AMMONIUMILTNING)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 209 (2010). Den beskrevne testmetode er en metode til at bestemme virkningen af et kemikalie på mikroorganismer fra aktiveret slam (hovedsagelig bakterier) ved måling af respirationshastigheden (kulstof- og/eller ammoniumiltning) under fastsatte betingelser ved forskellige koncentrationer af testkemikaliet. Denne testmetode er baseret på ETAD-testen (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1)(2), på det tidligere OECD TG 209 (3) og på den reviderede ISO-standard 8192 (4). Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til vurdering af virkningen af kemikalier på mikroorganismerne i det aktiverede slam i spildevandsanlæggets biologiske (aerobe) fase. Resultatet af testen kan også indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af testkemikalier til anvendelse i bionedbrydelighedstest (f.eks. kapitel C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 og C.29 i dette bilag, OECD TG302C). I dette tilfælde kan testen udføres som en screeningstest, som ligner en test til bestemmelse af dosisinterval eller en grænsetest (se punkt 39), hvor kun den samlede respiration tages i betragtning. Der må dog udvises omhu med at bruge disse oplysninger til test for let bionedbrydelighed (kapitel C.4 A-F og C.29 i dette bilag), hvor inokulumkoncentrationen er betydeligt lavere end den, der bruges i denne testmetode. Fravær af hæmning i denne respirationshæmningstest indebærer ikke automatisk ikke-hæmmende betingelser i testen for let bionedbrydelighed i kapitel C.4 A-F eller C.29 i dette bilag.

2. Generelt lader det til, at respirationshæmningstesten er blevet anvendt med succes, siden den blev offentliggjort, men der er i nogle tilfælde indberettet falske resultater, f.eks. (2)(4)(5). Der forekommer undertiden tofasede koncentrationsrelaterede respirationskurver, forvrængede dosis/respons-kurver og uventet lave EC_{50} -værdier (5). Undersøgelser har vist, at sådanne resultater fås, når det aktiverede slam, der bruges i testen, nitrificerer i betydelig grad, og testkemikaliet har større virkning på iltningen af ammonium end på den generelle heterotrofe iltning. Disse falske resultater kan derfor afhjælpes ved yderligere testning med en specifik nitrifikationshæmmer. Ved at måle iltoptagelseshastigheden med og uden en sådan hæmmer, f.eks. N-allylthiourinstof (ATU), kan de enkelte samlede iltoptagelseshastigheder ved henholdsvis heterotrof iltning og nitrifikation beregnes (4)(7)(8). Et testkemikalies hæmmende virkninger på de to processer kan således bestemmes, og EC_{50} -værdierne for både iltning af organisk kulstof (heterotrof) og ammoniumiltning (nitrifikation) kan beregnes på sædvanlig vis. Det skal bemærkes, at N-allylthiourinstofs hæmmende virkning i sjældne tilfælde kan ophæves helt eller delvist som følge af kompleksdannelse med testkemikalier eller tilsat substrat, f.eks. Cu^{++} -ioner (6). Cu^{++} -ioner er af afgørende betydning for Nitrosomonas, men er toksiske i højere koncentrationer.
3. Der er opstået et presserende behov for nitrifikation i den aerobe behandling af spildevand i europæiske lande som et nødvendigt trin i fjernelsen af kvælstofforbindelser fra spildevand ved denitrifikation til gasformige produkter; EU har nu fastsat nedre grænser for koncentrationen af kvælstof i behandlet spildevand, der udledes til modtagende vand (¹).
4. Metoden til vurdering af virkningen på iltning af organisk kulstof er tilstrækkelig til de fleste formål. I visse tilfælde er det dog nødvendigt med en undersøgelse af virkningen på nitrifikation alene, eller på både nitrifikation og iltning af organisk kulstof hver for sig, for at kunne fortolke resultaterne og forstå virkningerne.

TESTMETODENS PRINCIP

5. Respirationshastigheden for prøver af aktiveret slam tilført syntetisk spildevand måles i en indkapslet celle, der indeholder en iltelektrode, efter en kontakttid på tre timer. Længere kontakttider kan være hensigtsmæssige for at opnå et realistisk eksponeringsscenarie. Hvis testkemikaliet er hurtigt nedbrydeligt, f.eks. abiotisk ved hydrolyse, eller er flygtigt, og koncentrationen ikke kan opretholdes i tilstrækkelig grad, kan der desuden anvendes en kortere eksponeringsperiode, f.eks. 30 minutter. Følsomheden af hvert parti aktiveret slam bør kontrolleres med et passende referencekemikalie på eksponeringsdagen. Testen bruges typisk til at bestemme testkemikaliet EC_x (f.eks. EC_{50}) og/eller koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).
6. Hæmningen af iltoptagelsen i mikroorganismer, der ilter organisk kulstof, kan udtrykkes særskilt fra iltoptagelsen i mikroorganismer, der ilter ammonium, ved måling af iltoptagelseshastigheden med og uden N-allylthiourinstof, som er en specifik inhibitor af de nitrificerende bakteriers iltning af ammonium til nitrit i første fase. I dette tilfælde beregnes hæmningen i procent af iltoptagelseshastigheden ved sammenligning af iltoptagelseshastigheden med et testkemikalie med den gennemsnitlige iltoptagelseshastighed for de tilsvarende kontroller, der ikke indeholder noget testkemikalie, både med og uden den specifikke inhibitor, N-allylthiourinstof.
7. Iltoptagelse som følge af abiotiske processer kan påvises ved at bestemme hastigheden i blandinger af testkemikalie, syntetisk spildevandssubstrat og vand, idet aktiveret slam udelades.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Testkemikaliet identifikation (fortrinsvis CAS-nummer), navn (IUPAC), renhed, vandopløselighed, damptryk, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Normalt kan flygtige kemikalier ikke testes korrekt, medmindre der træffes særlige forholdsregler (se punkt 21).

(¹) Rådets direktiv 91/271/EØF af 21. maj 1991 om rensning af byspildevand, (EFT L 135 af 30.5.1991, s. 40).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

9. Testmetoden kan anvendes på vandopløselige, tungt opløselige og flygtige kemikalier. Der er dog ikke altid muligt at opnå EC_{50} -værdier med kemikalier med begrænset opløselighed, og der kan kun opnås gyldige resultater med flygtige kemikalier, hvis størstedelen (> 80 %) af testkemikallet er til stede i reaktionsblandingen ved udløbet af eksponeringsperioden/-perioderne. Yderligere analytiske støttestandarder skal forelægges for at præcisere EC_x -koncentrationen, når der er usikkerhed om testkemikallets stabilitet eller flygtighed.

REFERENCEKEMIKALIER

10. Referencekemikalier skal testes periodisk, for at sikre at testmetoden og -betingelserne er pålidelige, og for at kontrollere følsomheden af hvert parti aktiveret slam, der er brugt som mikrobielt inokulum på eksponeringsdagen. Kemikallet 3,5-dichlorphenol (3,5-DCP) anbefales som hæmmende referencekemikalie, da det vides at hæmme respiration og bruges i mange typer hæmnings-/toksicitetstest (4). Også kobber-(II)-sulfatpentahydrat kan bruges som referencekemikalie til hæmning af samlet respiration (9). N-methylanilin kan bruges som specifik nitrifikationshæmmer (4).

VALIDITETSKRITERIER OG REPRODUCERBARHED

11. Iltoptagelseshastigheden for blindkontrollerne (uden testkemikalie eller referencekemikalie) må ikke være under 20 mg ilt pr. gram aktiveret slam (tørvægt af opslået faststof) pr. time. Hvis hastigheden er lavere, skal testen gentages med vasket aktiveret slam eller med slam fra en anden kilde. Variationskoefficienten for iltoptagelseshastigheden i kontrolreplikater må ikke overstige 30 % ved den endelige tests afslutning.
12. I den internationale ringtest, der blev tilrettelagt af ISO (4) i 2004, og hvor der blev anvendt aktiveret slam fremstillet af husholdningsspildevand, viste EC_{50} for 3,5-DCP sig at ligge i intervallet 2 mg/l til 25 mg/l for samlet respiration, 5 mg/l til 40 mg/l for heterotrof respiration og 0,1 mg/l til 10 mg/l for respiration ved nitrifikation. Hvis EC_{50} for 3,5-DCP ikke ligger i det forventede område, skal testen gentages med aktiveret slam fra en anden kilde. EC_{50} for kobber-(II)-sulfatpentahydrat bør ligge i området 53-155 mg/l for den samlede respiration (9).

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testbeholdere og -apparat

13. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:
- a) Testbeholdere — f.eks. 1 000 ml bægerglas, som skal indeholde 500 ml reaktionsblanding (se 5 i figur 1)
 - b) Celle og tilbehør til måling af koncentrationen af opløst ilt, en passende iltelektrode, en indkapslet celle, som skal indeholde prøven, uden headspace og med en skriver (f.eks. 7, 8, 9 i figur 1 i tillæg 2); alternativt kan der bruges en BOD-kolbe med en passende muffeadapter til forsegling af iltelektroden på kolbens hals (se figur 2 i tillæg 3). For at forhindre tab af væske, der fortrænges, når iltelektroden indsættes, tilrådes det først at indsætte en tragt eller et glastrør gennem muffen eller bruge beholdere med tragtformet åbning. I begge tilfælde bør der anvendes en magnetomrører eller en anden omrøringsmetode, f.eks. en selvomrørende sonde
 - c) Magnetomrørere og stangmagneter, som er overtrukket med inert materiale, til brug i målekammeret og/eller testbeholderne
 - d) Beluftsapparatur: Komprimeret luft ledes om nødvendigt gennem et passende filter for at fjerne støv og olie og gennem vaskeflasker, der indeholder vand, for at fuge luften. Beholderens indhold bør beluftes med pasteuriseret pipetter eller beluftsapparater, der ikke adsorberer kemikalier. En orbitalryster, der kører med orbitale hastigheder på mellem 150 og 250 omdr./min., med kolber med en kapacitet på f.eks. 2 000 ml kan bruges til at dække slammets iltforbrug og løse problemer med kemikalier, der frembringer stærk skumning, er flygtige og derfor går tabt eller er vanskeligt dispergerbare, når de beluftes ved luftgennembobling. Testsystemet er typisk et antal bægerglas, der beluftes kontinuerligt i sekvenser (f.eks. med intervaller på ca. 10-15 minutter) og derefter underkastes en sekventiel analyse. Der kan også anvendes validerede instrumenter, der giver mulighed for samtidig beluftning og måling af iltforbrugshastigheden i blandingerne

- e) pH-meter
- f) Centrifuge, almindelig bordcentrifuge til slam med en kapacitet på 10 000 m/s².

Reagenser

14. Der bør anvendes reagenser af analysekvalitet i hele testen.

Vand

15. Der bør kun bruges destilleret eller deioniseret vand, som indeholder under 1 mg/l opløst organisk kulstof, medmindre ledningsvand uden chlor er specificeret.

Syntetisk spildevand

16. Substratet skal fremstilles således, at det indeholder følgende bestanddele i de angivne mængder:

— pepton	16 g
— kødekstrakt (eller et sammenligneligt planteekstrakt)	11 g
— urinstof	3 g
— natriumchlorid (NaCl)	0,7 g
— calciumchloriddihydrat (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— dikaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— destilleret eller deioniseret vand til 1 liter	

17. Denne opløsnings pH skal være $7,5 \pm 0,5$. Hvis det fremstillede substrat ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4 °C, dog ikke længere end en uge og under forhold, som ikke ændrer sammensætningen. Det skal bemærkes, at 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«, 11. juni 1976, med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.
18. Alternativt kan substratets komponenter steriliseres særskilt forud for opbevaringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt, kort tid før testen udføres. Substratet skal blandes grundigt inden brug, og pH skal om nødvendigt justeres til $7,5 \pm 0,5$.

Testkemikalie

19. Der skal fremstilles en stamopløsning til de let vandopløselige teststoffer, dog kun op til den maksimale vandopløselighed (udfældning accepteres ikke). Stoffer med ringe vandopløselighed, blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed og adsorptive stoffer skal afvejes direkte i testbeholderne. I disse tilfælde kan brug af stamopløsninger være et alternativ, hvis opløste koncentrationer af testkemikalierne bestemmes analytisk i testbeholderne (inden tilsætning af aktiveret slam). Hvis der fremstilles Water Accommodated Fractions (WAF — den andel af stoffet, der opløses i vandet), er det desuden afgørende at foretage en analytisk bestemmelse af de opløste koncentrationer af testkemikalierne i testbeholderne. Det bør undgås at bruge organiske opløsningsmidler og dispergeringsmidler/emulgatorer for at forbedre opløseligheden. Sonikering af stamopløsninger og suspensioner inden omrøring, f.eks. natten over, er mulig, når der foreligger tilstrækkelige oplysninger om testkemikaliet's stabilitet under sådanne betingelser.
20. Testkemikaliet kan have skadelig indvirkning på pH i testsystemet. De testkemikaliebehandlede blandingers pH skal bestemmes inden forsøgsopsætningen i et indledende forsøg, for at konstatere om det er nødvendigt at justere pH inden den endelige test og igen på dagen for den endelige test. Opløsninger/suspensioner af testkemikalie i vand bør om nødvendigt neutraliseres inden tilsætning af inokulum. Eftersom neutralisering kan ændre kemikaliet's kemiske egenskaber, kan der dog, afhængigt af undersøgelsens formål, foretages yderligere test for at vurdere testkemikaliet's virkning på slammet uden pH-justering.

21. Flygtige kemikaliers toksiske virkning, navnlig i test, hvor systemet gennembobles, kan give forskellige effektniveauer, der forekommer som følge af tab af stof i eksponeringsperioden. Der bør udvises forsigtighed med sådanne stoffer ved at foretage stofspecifikke analyser af kontrolblandinger, som indeholder stoffet, og ændre beluftningssystemet.

Referencekemikalie

22. Hvis 3,5-dichlorphenol bruges som referencekemikalie, skal der fremstilles en opløsning af 1,00 g 3,5-dichlorphenol i 1 000 ml vand (15). Varmt vand og/eller sonikering bør bruges til at fremskynde opløsningen og bringe opløsningen op til volumen, når den er afkølet til stuetemperatur. Det skal dog sikres, at referencekemikallet ikke har ændret sig strukturelt. Opløsningens pH skal kontrolleres og om nødvendigt justeres med NaOH eller H_2SO_4 til pH 7-8.
23. Hvis der bruges kobber(II)-sulfatpentahydrat som referencekemikalie, bruges koncentrationer på 58 mg/l, 100 mg/l og 180 mg/l (en faktor på 1,8). Stoffet afvejes direkte i testbeholderne (29/50/90 mg med henblik på et samlet volumen på 500 ml). Det opløses derefter med 234 ml autoklaveret ledningsvand. Kobber(II)-sulfatpentahydrat er let opløseligt. Når forsøget påbegyndes, tilsættes 16 ml syntetisk spildevand og 250 ml aktiveret slam.

Specifik nitrifikationshæmmer

24. Der bør fremstilles en stamopløsning på 2,32 g/l af N-allylthiourinstof (ATU). Tilsætningen af 2,5 ml af denne stamopløsning til en inkubationsblanding med et slutvolumen på 500 ml giver en slutkoncentration på 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), som vides at være tilstrækkelig (4) til at forårsage 100 % nitrifikationshæmning i nitrificerende aktiveret slam, som indeholder 1,5 g/l opslæmmet faststof.

Abiotisk kontrol

25. Under visse sjældne betingelser kan et testkemikalie med stærkt reducerende egenskaber forårsage et målbart abiotisk iltforbrug. I sådanne tilfælde er abiotiske kontroller nødvendige for at skelne mellem testkemikaliets abiotiske optagelse og mikrobiel respiration. Abiotiske kontroller kan fremstilles ved at udelade inokulum fra testblandingerne. Abiotiske kontroller uden inokulum kan også anvendes, når der udføres underbyggende analytiske målinger for at bestemme den opnåede koncentration i testens eksponeringsfase, f.eks. når der bruges stamopløsninger af kemikalier med ringe vandopløselighed med komponenter med forskellig vandopløselighed. I specifikke tilfælde kan det være nødvendigt at fremstille en abiotisk kontrol med steriliseret inokulum (f.eks. ved autoklivering eller tilsætning af steriliserende toksiske stoffer). Visse kemikalier producerer eller forbruger kun ilt, hvis overfladearealet er stort nok til reaktion, selv om de normalt kræver en langt højere temperatur eller et langt højere tryk hertil. I denne henseende skal der især fokuseres på peroxy-stoffer. Et steriliseret inokulum giver et stort overfladeareal.

Inokulum

26. Til almindelig anvendelse bør aktiveret slam indsamles fra beluftningstankens udløb eller i nærheden af tankens udløb i et velfungerende spildevandsrensningsanlæg, der primært modtager husholdningsspildevand. Afhængigt af testens formål kan der også anvendes andre passende kilder til aktiveret slam, f.eks. slam fremstillet i laboratoriet, i passende opslæmmet faststof-koncentrationer på 2 g/l til 4 g/l. Slam fra forskellige rensningsanlæg vil dog sandsynligvis have forskellige karakteristika og forskellig følsomhed.
27. Slammet kan bruges, som det er, men grove partikler bør fjernes ved kortvarig bundfældning, f.eks. 5-15 minutter, og dekantering af det øverste lag af finere slampartikler eller sigtning (f.eks. maskestørrelse på 1 mm²). Alternativt kan slammet homogeniseres i en blender i ca. 15 sekunder eller derover, men der skal udvises forsigtighed i forhold til de forskydningskræfter og temperaturændringer, der kan forekomme ved lange blandingsperioder.

28. Det er ofte nødvendigt at vaske slammet, f.eks. hvis den endogene respirationshastighed er lav. Slammet skal først centrifugeres i en periode for at producere en klar supernatant og en masse af faststof fra spildevandet, f.eks. i 10 minutter ved ca. 10 000 m/s². Supernatantvæsken kasseres, og slammet genopslættes i ledningsvand uden chlor under omrystning, hvorefter vaskevandet fjernes ved gencentrifugering og kasseres. Vaske- og centrifugeringsprocessen gentages om nødvendigt. Tørmassen af et kendt volumen genopslættes slam bestemmes, og slammet koncentrerer ved fjernelse af væske eller yderligere fortynding i ledningsvand uden chlor for at opnå den nødvendige koncentration af slamfaststoffer på 3 g/l. Det aktiverede slam bør beluftes kontinuerligt (f.eks. 2 l/minut) ved testtemperaturen og om muligt bruges på indsamlingsdagen. Hvis det ikke er muligt, bør slammet dagligt tilføres syntetisk spildevand (50 ml syntetisk spildevand/l aktiveret slam) i yderligere to dage. Slammet bruges herefter til testen, og resultaterne accepteres som gyldige, hvis der ikke er forekommet nogen betydelig ændring i dets aktivitet, vurderet ved dens endogene heterotrofe respirationshastighed og respirationshastighed ved nitrifikation.
29. Der kan opstå problemer, hvis der forekommer skumdannelse under inkuberingen i en sådan grad, at skummet og slamfaststofferne, som bæres på skummet, fortrænges fra beluftningsbeholderne. Det forekommer, at skumdannelse blot skyldes tilstedeværelse af syntetisk spildevand, men skumdannelse bør forventes, hvis testkemikaliets er eller indeholder et overfladeaktivt stof. Tab af slamfaststoffer fra testblandingerne vil medføre kunstigt nedsat respirationshastighed, som fejlagtigt kan fortolkes som et resultat af hæmning. Derudover koncentrerer beluftningen af opløsningen med overfladeaktivt middel det overfladeaktive middel i skumlaget; tab af skum fra testsystemet vil sænke eksponeringskoncentrationerne. Skumdannelsen kan kontrolleres med enkle mekaniske metoder (f.eks. lejlighedsvis manuel omrøring med en glasstav) eller ved at tilføje et antiskummiddel uden overfladeaktivt middel baseret på silikoneemulsion og/eller bruge rystekolbemetoden. Hvis problemet hænger sammen med tilstedeværelsen af det syntetiske spildevand, bør spildevandets sammensætning ændres ved at tilsætte et reagens mod skumdannelse ved en hastighed på 50 µl/l. Hvis testkemikaliets forårsager skumdannelse, skal den mængde, der er nødvendig for afhjælpning heraf, bestemmes ved den maksimale testkoncentration, og derefter skal alle individuelle beluftningsbeholdere behandles på samme måde (herunder beluftningsbeholdere, f.eks. beholdere med blindkontroller og referencekemikalie, uden skumdannelse). Hvis der bruges antiskummidler, må der ikke være nogen interaktion med inokulum og/eller testkemikalie.

TESTFREMGANGSMÅDE

30. Hæmningen for tre forskellige iltoptagelser kan bestemmes: samlet, kun heterotrof og som følge af nitrifikation. Normalt bør målingen af hæmningen af den samlede iltoptagelse være tilstrækkelig. Virkningerne på den heterotrofe iltoptagelse som følge af iltning af organisk kulstof og iltning af ammonium skal bestemmes, når der er et specifikt krav om sådanne to særskilte endepunkter for et bestemt kemikalie, eller (frivilligt) for at forklare atypiske dosis/respons-kurver i forbindelse med hæmning af den samlede iltoptagelse.

Testbetingelser

31. Testen skal udføres ved en temperatur på 20 °C ± 2 °C.

Testblandinger

32. Testblandinger (F_T som i tabel 1), der indeholder vand, syntetisk spildevand og testkemikaliets, fremstilles for at opnå forskellige nominelle koncentrationer af testkemikaliets (tabel 1 indeholder et eksempel på volumener af bestanddele). pH justeres om nødvendigt til $7,5 \pm 0,5$; blandingerne fortyndes med vand, og inokulummet tilsættes med henblik på at opnå lige store endelige volumener i beholderne og påbegynde beluftningen.

Referenceblandinger

33. Blandinger (F_R) fremstilles med referencekemikaliets, f.eks. 3,5-dichlorphenol, i stedet for testkemikaliets på samme måde som testblandingerne.

Blindkontroller

34. Blindkontroller (F_B) fremstilles ved begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden i test, hvor testbægerglassene er opstillet sekventielt i intervaller. I test gennemført med udstyr, der giver mulighed for samtidig måling af iltforbruget, bør der indgå mindst to blindkontroller i hvert parti til samtidig analyse. Blindkontroller indeholder et tilsvarende volumen aktiveret slam og syntetisk substrat, men intet test- eller referencekemikalie. De fortyndes med vand til samme volumen som test- og referenceblandingerne.

Abiotisk kontrol

35. Der fremstilles om nødvendigt — f.eks. hvis et testkemikalie vides eller formodes at have stærkt reducerende egenskaber — en blanding F_A med henblik på måling af det abiotiske iltforbrug. Blandingen skal indeholde samme mængde testkemikalie og syntetisk spildevand og have samme volumen som testblandingerne, men indeholder ikke aktiveret slam.

Generel fremgangsmåde og målinger

36. Testblandingerne, referenceblandingerne, blindkontrollerne og de abiotiske kontroller inkuberes ved testtemperaturen under betingelser med tvungen beluftning (0,5 til 1 l/min.) for at holde koncentrationen af opløst ilt over 60-70 % af mætningen og holde slammet i suspension. Det er også nødvendigt at omrøre kulturerne for at holde slammet i suspension. Inkuberingen anses for at begynde med den første kontakt mellem inokulummet af aktiveret slam og de øvrige bestanddele af den færdige blanding. Efter endt inkubering, dvs. efter den angivne eksponeringstid på normalt tre timer, udtages der prøver for at måle hastigheden, hvormed koncentrationen af opløst ilt aftager i den celle, der er udformet til formålet (figur 2 i tillæg 3), eller i en helt fuld BOD-kolbe. Den måde, hvorpå inkuberingerne begynder, afhænger også af det anvendte udstyrs kapacitet til at måle iltforbrugshastigheden. Hvis udstyret f.eks. omfatter en enkelt iltsonde, foretages målingerne individuelt. I dette tilfælde fremstilles de forskellige blandinger, der skal bruges til testen i syntetisk spildevand, men uden inokulum, og de nødvendige portioner slam tilsættes til de enkelte beholdere i serien. Hver inkubering påbegyndes successivt med passende intervaller på f.eks. 10-15 minutter. Alternativt kan målingssystemet omfatte flere sonder, hvilket giver mulighed for flere samtidige målinger; i givet fald kan inokulum tilsættes samtidig til passende grupper af beholdere.
37. Koncentrationen af aktiveret slam i alle blandinger — testblanding, referenceblanding og blindkontrolblanding (men ikke den abiotiske kontrol) — er nominelt 1,5 g/l opslæmmede faststoffer. Iltforbruget måles efter tre timers eksponering. Der udføres yderligere 30-minutters eksponeringsmålinger efter behov som beskrevet i punkt 5.

Slammets nitrifikationspotentiale

38. Der fremstilles blandinger (F_B) som blindkontrolblandingerne og de yderligere »kontrolblandinger« (F_N), men som også indeholder 11,6 mg/l N-allylthiourinstof, for at afgøre om slammet nitrificerer og med hvilken hastighed. Blandingerne beluftes og inkuberes ved $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i tre timer. Herefter måles iltoptagelseshastigheden, og iltoptagelsen som følge af nitrifikation beregnes.

Testdesign

Test til bestemmelse af dosisinterval

39. Der anvendes om nødvendigt en indledende test til at bestemme det koncentrationsområde for testkemikaliets, der er nødvendigt i en endelig test til bestemmelse af hæmningen af iltforbrug. Alternativt kan fraværet af testkemikaliets hæmning af iltforbruget i en indledende test indikere, at en endelig test er unødvendig, men der skal gennemføres tre forsøg i den indledende test ved den højeste testede koncentration (typisk 1 000 mg/l, men afhængigt af datakrav).

Tabel 1

Eksempler på blandinger til den indledende test

Reagens	Oprindelig koncentration				
Stamopløsning af testkemikalie	10 g/l				
Stamopløsning af syntetisk substrat	Se afsnit 16.				
Stamopløsning af aktiveret slam	3 g/l opslæmmede faststoffer				
Komponenter i blandinger	Dosering i testbeholdere ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Stamopløsning af testkemikalie (ml) (punkt 19-21)	0,5	5	50	0	50
Stamopløsning af syntetisk spildevand (ml) (punkt 16)	16	16	16	16	16
Stamopløsning af aktiveret slam (ml) (punkt 26-29)	250	250	250	250	0
Vand (punkt 15)	233,5	229	184	234	434
Blandingernes samlede volumen (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrationer i blandingen					
Testsuspension (mg/l) Aktiveret slam	10	10	1 000	0	1 000
(opslæmmede faststoffer) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) Der anvendes samme fremgangsmåde med referencekemikallet til indholdet i kolbe F_{R1-3}

40. Testen udføres med mindst tre koncentrationer af testkemikallet, f.eks. 10 mg/l, 100 mg/l og 1 000 mg/l med en blindkontrol og om nødvendigt mindst tre abiotiske kontroller med de højeste koncentrationer af testkemikallet (se eksempel i tabel 1). Ideelt har den laveste koncentration ingen virkning på iltforbruget. Iltoptagelseshastigheden og, hvis det er relevant, nitrifikationshastigheden beregnes; herefter beregnes hæmningen i procent. Afhængigt af testens formål kan man dog også blot bestemme en grænsekonzentrations toksicitet, f.eks. 1 000 mg/l. Hvis der ikke forekommer nogen statistisk signifikant toksisk virkning ved denne koncentration, er det ikke nødvendigt at gennemføre yderligere test ved højere eller lavere koncentrationer. Det skal bemærkes, at stoffer med ringe vandopløselighed, blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed og adsorptive stoffer skal afvejes direkte i testbeholderne. I dette tilfælde erstattes det volumen, der er forbeholdt stamopløsningen af teststof, med fortyndingsvand.

Endelig test

Hæmning af samlet iltoptagelse

41. Testen udføres ved en række koncentrationer, der er udledt af den indledende test. I de fleste tilfælde anbefales seks kontroller og fem behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie med fem replikater for at opnå både NOEC og EC_x (f.eks. EC₅₀). Det er ikke nødvendigt at gentage den abiotiske kontrol, hvis der ikke forekom iltoptagelse i den indledende test, men hvis der forekommer signifikant optagelse, foretages abiotisk kontrol for hver enkelt koncentration af testkemikalie. Slammets følsomhed kontrolleres med referencekemikallet 3,5-dichlorphenol. Slammets følsomhed kontrolleres for hver testserie, da følsomheden vides at svinge. Der udtages i alle tilfælde prøver fra testbeholderne efter tre timer, og om nødvendigt efter yderligere 30 minutter, med henblik på måling af iltoptagelseshastigheden i iltelektrodecellen. Den specifikke respirationshastighed i kontrol- og testblandingerne beregnes på grundlag af de indsamlede data; hæmningen i procent beregnes derefter ud fra ligning 7 nedenfor.

Sondring mellem hæmning af heterotrof respiration og nitrifikation

42. Brugen af den specifikke nitrifikationsinhibitor, ATU, giver mulighed for direkte vurdering af testkemikaliers inhibitoriske virkninger på den heterotrofe iltning og for beregning af virkningerne på nitrifikationshastigheden ved at trække iltoptagelseshastigheden med ATU fra den samlede optagelseshastighed (uden ATU). Der fremstilles to sæt reaktionsblandinger i henhold til de testdesign for EC_x eller NOEC, der er beskrevet i punkt 41, men ATU tilsættes desuden til hver blanding i et sæt til en slutkoncentration på 11,6 mg/l, som har vist sig helt at hæmme nitrifikation i slam med koncentrationer af opslæmmede faststoffer på op til 3 000 mg/l (4). Iltoptagelseshastigheden måles efter eksponeringsperioden; disse direkte værdier repræsenterer kun den heterotrofe respiration, og forskellene mellem disse og den tilsvarende samlede respirationshastighed repræsenterer nitrifikation. Derefter beregnes de forskellige hæmningsgrader.

Målinger

43. Efter eksponeringsperioden/-perioderne overføres en prøve fra den første beluftningsbeholder til iltelektrodecellen (figur 1 i tillæg 2), og koncentrationen af opløst ilt måles straks. Hvis et system med flere elektroder er tilgængeligt, kan målingerne foretages samtidig. Det er afgørende, at omrøringen (ved hjælp af en overtrukket magnet) foregår ved samme hastighed, som når elektroden kalibreres, med henblik på at sikre, at sonden reagerer med minimal forsinkelse på ændringer i iltkoncentrationerne, og give mulighed for regelmæssige og reproducerbare iltmålinger i målebeholderen. Normalt er visse iltelektroders system med en selvomrørende sonde tilstrækkeligt. Cellen bør skylles med vand mellem målingerne. Alternativt kan prøven fyldes i en BOD-kolbe (figur 2 i tillæg 3) udstyret med en magnetomrører. En iltsonde med en muffeadapter indsættes derefter i kolbens hals, og magnetomrøreren startes. I begge tilfælde måles koncentrationen af opløst ilt regelmæssigt og registreres i en periode, normalt 5-10 minutter eller indtil iltkoncentrationen falder til under 2 mg/l. Elektroden fjernes, blandingen hældes tilbage i beluftningsbeholderen, og beluftningen og omrøringen fortsættes, hvis det er nødvendigt med måling efter længere eksponeringsperioder.

Kontrol af testkemikaliekoncentrationen

44. Til nogle formål kan det være nødvendigt at måle testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne. Det skal bemærkes, at hvis der bruges stamopløsninger af:

- stoffer med ringe vandopløselighed,
- blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed eller
- stoffer med god vandopløselighed, men hvor koncentrationen af stamopløsning ligger tæt på den maksimale vandopløselighed,

er den opløste andel ukendt, og den reelle koncentration af testkemikaliets, som overføres til testbeholderne, er ikke kendt. Der er brug for en analytisk vurdering af testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne for at bestemme eksponeringen. For at forenkle proceduren foretages den analytiske vurdering inden tilsætning af inokulummet. Fordi kun opløste andele overføres til testbeholderne, kan de målte koncentrationer være meget lave.

45. For at undgå tidskrævende og dyre analyser anbefales det blot at afveje testkemikaliets direkte i testbeholderne og bruge den oprindelige afvejede nominelle koncentration i efterfølgende beregninger. Det er ikke nødvendigt at sondre mellem opløste, uopløste og adsorberede andele af testkemikaliets, fordi alle disse andele forekommer under faktiske betingelser i et spildevandsrensingsanlæg, og andelen kan variere afhængigt af spildevandets sammensætning. Formålet med testmetoden er at give et realistisk skøn over en ikke-hæmmende koncentration, og metoden er ikke hensigtsmæssig til detaljeret undersøgelse af, hvilke andele der bidrager til hæmningen af organismerne i det aktiverede slam. Endelig bør adsorptive stoffer også afvejes direkte i testbeholderne, og der bør anvendes beholdere i silancoatet glas for at minimere tab ved adsorption.

DATA OG RAPPORTERING

Beregning af iltoptagelseshastighederne

46. Iltoptagelseshastighederne beregnes på grundlag af gennemsnittet af de målte værdier, f.eks. den lineære del af kurverne over iltkoncentration som funktion af tid, hvilket begrænser beregningerne til iltkoncentrationer mellem 2,0 mg/l og 7,0 mg/l, eftersom højere og lavere koncentrationer i sig selv har indvirkning på forbrugshastighederne. Udsving ind i koncentrationsområder under eller over disse værdier er af og til uundgåelige og nødvendige, f.eks. når respirationen er voldsomt hæmmet og dermed meget langsom, eller hvis aktiveret slam respirerer meget hurtigt. Det kan accepteres, hvis optagelseskurvens forlængede dele er lige, og deres gradienter ikke ændrer sig, når de passerer 2,0 mg/l- eller 7,0 mg/l O₂-grænserne. Eventuelle buede dele af kurven indikerer, at målingssystemet stabiliserer sig, eller at optagelseshastigheden ændrer sig, og må derfor ikke bruges til beregning af respirationshastigheden. Iltoptagelseshastigheden udtrykkes i milligram pr. liter pr. time (mg/l/t.) eller milligram pr. gram tørsлам pr. time (mg/g/t.). Iltforbrugshastigheden, R, i mg/l/t. kan beregnes eller interpoleres fra den lineære del af den registrerede kurve over iltfald i henhold til ligning 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad 1)$$

hvor:

Q₁ er iltkoncentrationen i begyndelsen af den udvalgte del af den lineære fase (mg/l)

Q₂ er iltkoncentrationen i slutningen af den udvalgte del af den lineære fase (mg/l)

Δ_t er tidsrummet mellem disse to målinger (min).

47. Den specifikke respirationshastighed (R_s) udtrykkes som den mængde ilt, der forbruges pr. gram slam (tørvægt) pr. time (mg/g/t.) i henhold til ligning 2:

$$R_s = R/SS \quad 2)$$

hvor SS er koncentrationen af opslæmmede faststoffer i testblandingen (g/l).

48. De forskellige indekser for R, der kan kombineres, er:

S specifik hastighed

T samlet respirationshastighed

N hastighed som følge af respiration ved nitrifikation

H hastighed som følge af heterotrof respiration

A hastighed som følge af abiotiske processer

B hastighed baseret på blindprøver (gennemsnit)

Beregning af iltoptagelseshastigheden som følge af nitrifikation

49. Forholdet mellem samlet respiration (R_T), respiration ved nitrifikation (R_N) og heterotrof respiration (R_H) er givet ved ligning 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad 3)$$

hvor:

R_N er iltoptagelsen som følge af nitrifikation (mg/l/t.)

R_T er den målte hastighed for blindkontrollens iltoptagelse uden ATU (F_B) (mg/l/t.)

R_H er den målte hastighed for blindkontrollens iltoptagelse med ATU (F_N) (mg/l/t.).

50. Dette forhold gælder for blindværdier (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), abiotiske kontroller (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) og prøver med testkemikalier (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/g/t.). Den specifikke respirationshastighed beregnes på grundlag af:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad 4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad 5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad 6)$$

51. Hvis R_N er uden betydning (f.eks. < 5 % af R_T i blindkontroller) i en indledende test, må det antages, at den heterotrofe iltoptagelse er lig med den samlede optagelse, og at der ikke forekommer nitrifikation. En alternativ kilde til aktiveret slam ville være nødvendig, hvis testene skulle anvendes til at vurdere virkningerne på heterotrofe og nitrificerende mikroorganismer. Der udføres en endelig test, hvis der konstateres hæmmede iltoptagelseshastigheder med forskellige testkemikaliekoncentrationer.

Beregning af hæmningen i procent

52. Hæmningen i procent, I_T , af det samlede iltforbrug ved hver koncentration af testkemikallet er givet ved ligning 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100 \% \quad 7)$$

53. Tilsvarende er hæmningen i procent af den heterotrofe iltoptagelse, I_H , ved hver koncentration af testkemikallet givet ved ligning 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100 \% \quad 8)$$

54. Endelig er hæmningen i procent af iltoptagelsen som følge af nitrifikation, I_N , ved hver koncentration givet ved ligning 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad 9)$$

55. Hæmningen i procent af iltoptagelsen afbildes mod logaritmen for testkemikaliekoncentrationen (hæmningskurve, se figur 3 i tillæg 4). Hæmningskurver afbildes for hver beluftningsperiode på tre timer eller yderligere efter 30 min. Den testkemikaliekoncentration, der hæmmer iltoptagelsen med 50 % (EC_{50}), skal beregnes eller interpoleres på grundlag af kurven. Hvis der foreligger passende data, kan man beregne eller interpolere 95 % konfidensgrænser for EC_{50} , kurvens hældning og værdier, som er egnede til at markere begyndelsen af hæmningsintervallet (f.eks. EC_{10} eller EC_{20}) og slutningen af hæmningsintervallet (f.eks. EC_{80} eller EC_{90}).

56. Det skal bemærkes, at det i lyset af den variabilitet, der ofte konstateres i resultaterne, i mange tilfælde kan være vanskeligt også at udtrykke resultaterne i størrelsesorden, f.eks.:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \quad 1 \text{ mg/l til } 10 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \quad 10 \text{ mg/l til } 100 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

Fortolkning af resultaterne

EC_x

57. EC_x -værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for parameteren, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Kärber-metoden eller simpel interpolation (11)). En EC_x -værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x -værdi skal middelværdierne for hver behandling (x) underkastes regressionsanalyse.

Beregning af NOEC

58. Hvis NOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er det nødvendigt med statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater). Passende statistiske metoder anvendes i overensstemmelse med OECD Document on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliets sammenlignet med kontrollerne ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0,05$.

Testrapport

59. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

- generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, renhed
- testkemikaliet fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. $\log K_{ow}$, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og eventuelt oplysninger om testkemikaliet skæbne, f.eks. adsorption til aktiveret slam)

Testsystem

- kilde, driftsforhold i spildevandsrensningsanlægget og indløbet hertil, koncentration, forbehandling og vedligeholdelse af det aktiverede slam

Testbetingelser

- testtemperatur, pH under testen og eksponeringsfasens/-fasernes varighed

Resultater

- kontrollernes specifikke iltforbrug ($\text{mg O}_2/\text{g slam} \times \text{t.}$)
- alle målte data, hæmningskurve(r) og metode til beregning af EC_{50}
- EC_{50} og om muligt 95 % konfidensgrænser, eventuelt EC_{20} , EC_{80} ; eventuelt NOEC og anvendt statistisk metode, hvis EC_{50} ikke kan bestemmes
- resultater for samlet hæmning og, hvis det er relevant, for heterotrof hæmning og hæmning ved nitrifikation
- abiotisk iltoptagelse i eventuel fysisk-kemisk kontrol
- referencekemikaliet navn og resultater med dette kemikalie
- alle observationer og afgivelser fra standardproceduren, som kan have haft indflydelse på resultatet.

LITTERATUR

- (1) D. Brown, H. R. Hitz og L. Schäfer (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test, *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
 - (2) E. F. King og H. A. Painter (1986), Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results, *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
 - (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
 - (4) ISO (2007), ISO 8192 Water Quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, Den Internationale Standardiseringsorganisation.
 - (5) D. J. Bealing (2003), Document ISO/TC147/WGI/N.183, Den Internationale Standardiseringsorganisation.
 - (6) H. A. Painter og K. Jones (1963), The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms, *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
 - (7) H. A. Painter (1986), Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge, *Toxicity Assessment* 1:515-524.
 - (8) B. Robra (1976), *Wasser/Abwasser* 117, 80.
 - (9) S. Fiebig og U. Noack (2004), The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
 - (10) ISO (1995), ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, Den Internationale Standardiseringsorganisation.
 - (11) OECD 2006, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
-

*Tillæg 1***Definitioner**

I denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

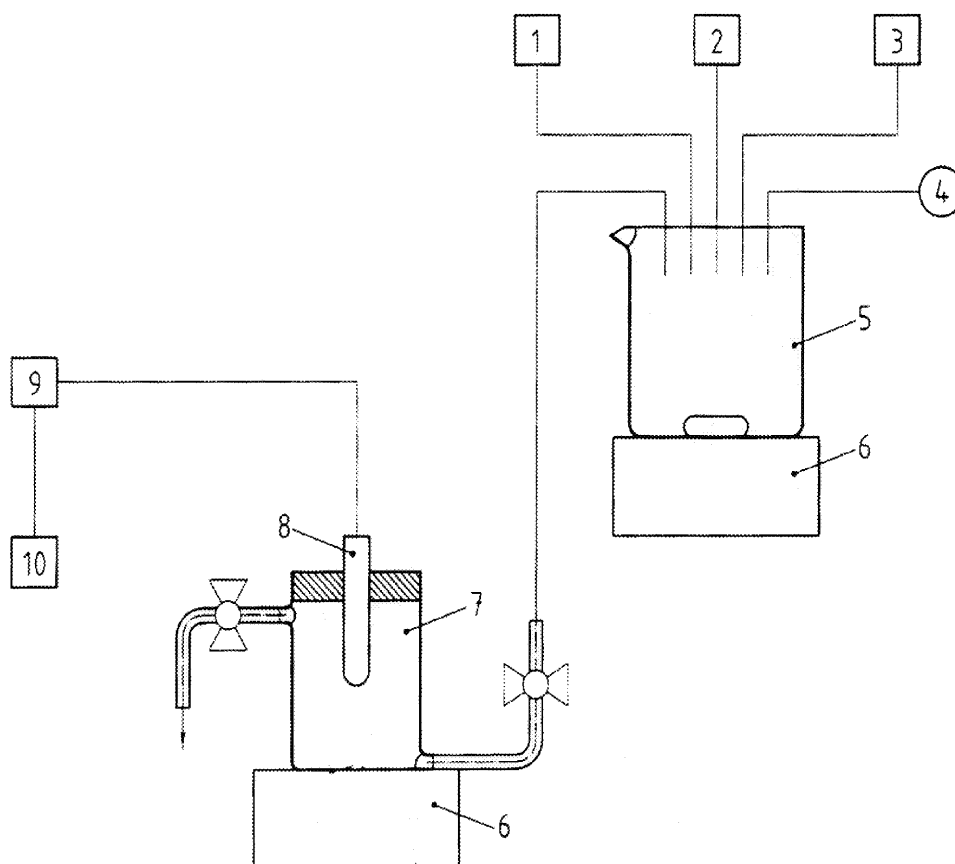
EC_x (effekt-koncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC₅₀ er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testen endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode.

NOEC (nuleffekt-koncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Fig. 1: Eksempel på måleenhed

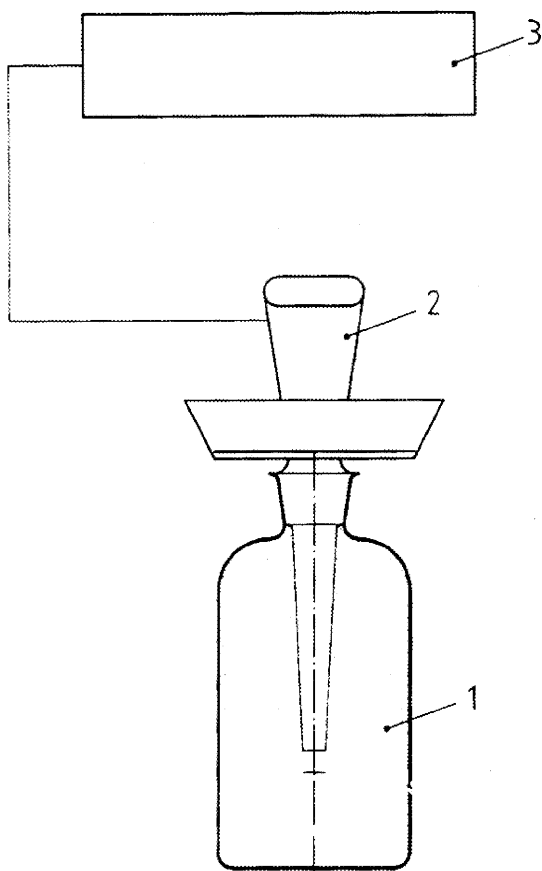


Signaturforklaring

1 aktiveret slam	6 magnetomrører
2 syntetisk substrat	7 celle til iltmåling
3 testkemikalie	8 iltelektrode
4 luft	9 instrument til iltmåling
5 blandebeholder	10 skriver

Tillæg 3

Fig. 2: Eksempel på måleenhed med en BOD-kolbe

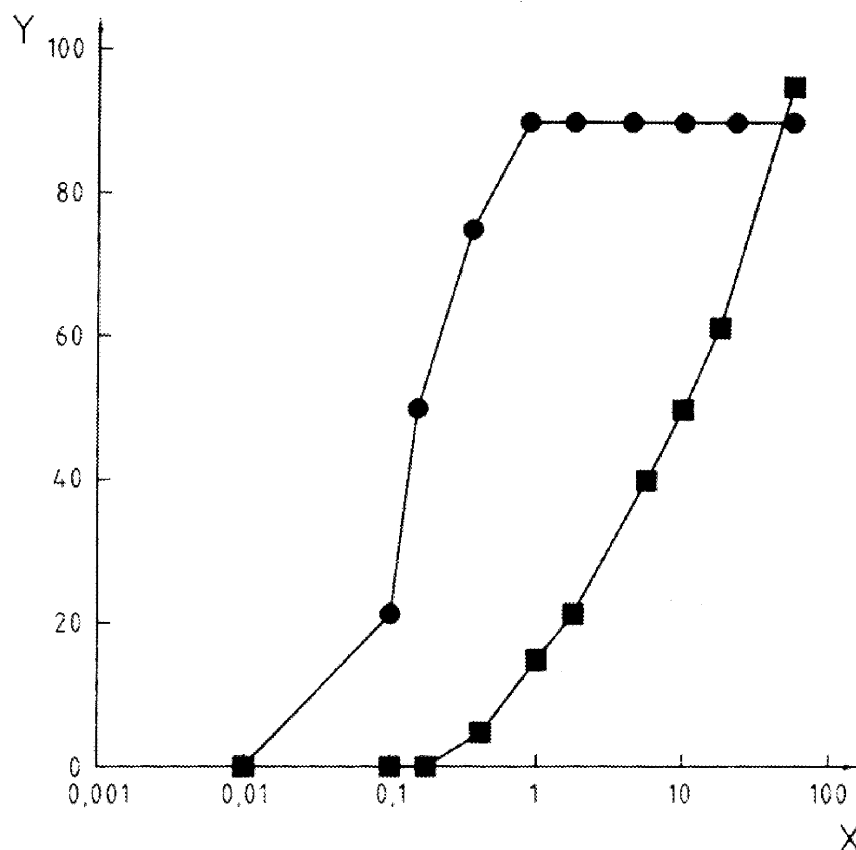


Signaturforklaring

- 1 Testbeholder
- 2 iltelektrode
- 3 instrument til iltmåling

Tillæg 4

Fig. 3: Eksempler på hæmningskurver



Signaturforklaring

X koncentration af 3,5-dichlorphenol (mg/l)

Y hæmning (%)

■ hæmning af heterotrof respiration med nitrificerende slam

● hæmning af nitrifikation med nitrificerende slam»

5) Kapitel C.26 affattes således:

»C.26 LEMNA SP. VÆKSTHÆMNINGSTEST

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 221 (2006). Den anvendes til at vurdere kemikaliers toksicitet for akvatiske ferskvandsplanter af slægten Lemna (andemad). Den er baseret på eksisterende metoder (1)(2)(3)(4)(5)(6), men der er foretaget ændringer, som afspejler den senere tids forskning og drøftelser vedrørende en række vigtige punkter. Testmetoden er blevet valideret ved en international ringtest (7).

2. I denne testmetode beskrives toksicitetstestning med *Lemna gibba* og *Lemna minor*, der begge har været genstand for omfattende undersøgelser og er omhandlet i ovennævnte standarder. Taksonomien for *Lemna* spp. er vanskelig, idet den kompliceres af, at der findes en bred vifte af fænotyper. Genetisk variation i *Lemna*s respons på giftstoffer kan forekomme, men de aktuelt foreliggende oplysninger om denne kilde til variation er utilstrækkelige som grundlag for at anbefale en bestemt klon til brug i nærværende testmetode. Det skal bemærkes, at testen ikke udføres axenisk, men nogle af testprocessens trin er foranstaltninger, der skal holde kontamineringen med andre organismer nede på et minimum.
3. Der gives en nærmere beskrivelse af testning med udskiftning af testopløsningen (semistatisk test og gennemstrømningstest) og uden udskiftning (statisk). Afhængigt af målsætningen for testen og myndighedernes krav anbefales det at overveje brug af den semistatiske metode og gennemstrømningsmetoden f.eks. til kemikalier, der hurtigt forlader opløsningen ved fordampning, fotonedbrydning, udfældning eller bionedbrydning. Nærmere anvisninger er givet i (8).
4. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

5. Eksponentielt voksende plantekulturer af slægten *Lemna* dyrkes som monokultur ved forskellige koncentrationer af testkemikaliets i syv dage. Testens formål er at kvantificere kemikalierelaterede virkninger på den vegetative vækst i dette tidsrum, baseret på vurdering af udvalgte målevariable. Bladantallet er den primære målevariabel. Der måles desuden mindst en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), da nogle kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end bladantallet. De kemikalierelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrollerne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af væksthastigheden, og som betegnes EC_x (f.eks. EC_{50}).
6. Testens endepunkt er hæmning af væksten, der er udtrykt som den logaritmiske stigning i målevariablen (den gennemsnitlige specifikke væksthastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke væksthastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af væksthastigheden, og denne betegnes E_rC_x (f.eks. E_rC_{50}).
7. I denne metode anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelser i visse lande. Udbyttet defineres som værdien af målevariablene ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variablene ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af udbyttet, og denne betegnes E_yC_x (f.eks. E_yC_{50}).
8. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Der skal foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliets i testsubstratet.
10. Af oplysninger om testkemikaliets, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, renhed, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, pK_a , K_{ow} , damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikaliets i løbet af testperioden. Derved fås en indikation af, om der skal træffes særlige skridt til at kontrollere sådanne tab. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse under testbetingelserne, dvs. med samme næringssubstrat, temperatur og belysning som i testen.

11. Når regulering af testsubstratets pH er særlig vigtig, f.eks. ved testning af metaller eller hydrolytisk ustabile kemikalier, anbefales det at tilsætte en buffer til næringssubstratet (se punkt 21). I (8) findes der yderligere vejledning i testning af kemikalier, hvis fysisk-kemisk egenskaber vanskeliggør testning.

TESTENS VALIDITET

12. For at testen er valid, skal fordoblingstiden for bladantallet i kontrollen være mindre end 2,5 dage (60 t.), tilnærmelsesvis svarende til en syvfoldning på syv dage eller en gennemsnitlig specifik væksthastighed på $0,275 \text{ d}^{-1}$. Med de testsubstrater og testbetingelser, der er beskrevet i denne testmetode, kan dette kriterium opfyldes ved at gennemføre testen under statiske betingelser (5). Kriteriet forventes desuden at kunne opfyldes under semistatiske forhold og med gennemstrømning. Beregningen af fordoblingstiden er vist i punkt 49.

REFERENCEKEMIKALIE

13. Til kontrol af testmetoden kan der testes et eller flere referencekemikalier, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (7). Det tilrådes, at testning af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testningsfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

14. Alt udstyr, der kommer i berøring med testsubstraterne, skal være udført helt i glas eller et andet kemisk inaktivt materiale. Glasapparatur, der anvendes til dyrkning og testning, skal være rensat for kemiske kontaminanter, der kan udvaskes i testsubstratet, og skal være sterilt. Testbeholderne skal være tilstrækkeligt vide til, at blade fra forskellige kolonier i kontrolbeholderne kan vokse uden at overlape hinanden ved testens slutning. Rødderne må gerne røre bunden af testbeholderen, men en mindste dybde på 20 mm og et mindste rumfang på 100 ml i hver testbeholder tilrådes. Valget af testbeholder er ikke afgørende, når blot disse krav er opfyldt. Bægerglas, krystallisationsskåle eller petriskåle af glas med passende mål har alle vist sig velegnede. Testbeholderne skal have låg, der nedsætter fordampning og utilsigtet kontaminering til et minimum og samtidig tillader det nødvendige luftskifte. Testbeholderne, og især disses låg, må ikke skygge eller ændre lysets spektrale sammensætning.
15. Kulturerne og testbeholderne må ikke opbevares sammen. Dette opnås bedst ved, at vækstkamre, inkubatorer eller lokaler er separate. Belysning og temperatur skal kunne reguleres og holdes på et konstant niveau (se punkt 35-36).

Testorganisme

16. Som testorganisme anvendes i denne test enten Lemna gibba eller Lemna minor. Tillæg 2 indeholder en kort beskrivelse af de arter af andemad, der er blevet anvendt til toksicitetstestning. Plantemateriale kan fås fra en kultursamling, fra et andet laboratorium eller i felten. Er planterne indsamlet i felten, skal de opbevares i mindst otte uger i kultur i samme substrat, som benyttes til testningen, før de anvendes. Indsamlingssteder for startkulturer i felten skal være fri for åbenlyse forureningskilder. Hvis de leveres fra et andet laboratorium eller en kultursamling, skal de opbevares på tilsvarende måde i mindst tre uger. Kilden til plantematerialet og den testede art og klon (hvis denne kendes) skal altid rapporteres.
17. Der skal anvendes monokulturer, som er fri for synlig kontaminering med andre organismer såsom alger og protozoer. Sunde planter af L. minor består af kolonier på mellem to og fem blade, mens sunde kolonier af L. gibba kan bestå af op til syv blade.
18. De testede planters kvalitet og ensartethed har stor indflydelse på testresultatet, hvorfor de bør udvælges nøje. Der skal anvendes unge, hurtigtvoksende planter uden synlige forandringer eller misfarvning (chlorose). Kulturer af god kvalitet er kendetegnet ved en høj andel af kolonier med mindst to blade. Et stort antal enkeltblade er tegn på miljøbelastning som f.eks. begrænset adgang til næringsstoffer, og plantemateriale fra sådanne kulturer bør ikke anvendes til testning.

Dyrkning

19. For at undgå at skulle vedligeholde kulturerne så ofte (f.eks. når Lemna-test ikke påtænkes anvendt i en periode), kan kulturerne opbevares ved reduceret belysning og temperatur (4-10 °C). En nærmere beskrivelse af dyrkningen er givet i tillæg 3. Hvis der er tydelige tegn på kontaminering med alger eller andre organismer, kan det være nødvendigt at udtage en delprøve af Lemna-blade, som overfladesteriliseres og derefter overføres til frisk substrat (se tillæg 3). I så fald kasseres resten af den kontaminede kultur.
20. Mindst syv dage før testning overføres et tilstrækkeligt antal kolonier aseptisk til frisk, sterilt substrat og dyrkes i 7-10 dage under testbetingelserne.

Testsubstrat

21. Der anbefales forskellige substrater til Lemna minor og Lemna gibba som beskrevet nedenfor. Det må nøje overvejes, om der skal anvendes pH-buffer i testsubstratet (MOPS (4-morpholinpropansulfonsyre, CAS-Nr.: 1132-61-2) i L. minor-substrat og NaHCO₃ i L. gibba-substrat), hvis det mistænkes for at kunne reagere med testkemikaliets og påvirke tegnene på dets toksicitet. Steinberg-substrat (9) er ligeledes acceptabelt, når blot validitetskriterierne er opfyldt.
22. Til dyrkning af og testning med L. minor anbefales en modificeret version af Lemna-næringssubstratet efter svensk standard (SIS). Sammensætningen af dette substrat er givet i tillæg 4.
23. Til dyrkning af og testning med L. gibba anbefales næringssubstratet 20X-AAP, som er beskrevet i tillæg 4.
24. Steinberg-substratet, som beskrives i tillæg 4, er også velegnet til L. minor og kan desuden bruges til L. gibba, når blot validitetskriterierne er opfyldt.

Testopløsninger

25. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningerne af testkemikaliets fremstilles normalt ved opløsning af kemikaliets i næringssubstrat.
26. Den højeste testede koncentration af testkemikaliets skal sædvanligvis ikke være større end kemikaliets vandopløselighed under testbetingelserne. Det skal dog bemærkes, at Lemna spp. flyder ovenpå og kan blive eksponeret for kemikalier, som samler sig i grænsefladen mellem vand og luft (f.eks. kemikalier, der er tungtopløselige i vand, hydrofobe eller overfladeaktive). Under sådanne omstændigheder vil eksponeringen skyldes andet materiale end det opløste materiale, og alt efter testkemikaliets egenskaber kan testkoncentrationerne være større end opløseligheden i vand. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliets ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikaliets til testsubstratet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne midler bør på enhver måde søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler må ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal dets slutkoncentration rapporteres og holdes så lav som mulig (≤ 100 µl/l), og der skal være samme koncentration af opløsnings- eller dispergeringsmiddel i alle behandlings- og kontrolgrupper. Nærmere anvisninger kan findes i (8).

Test- og kontrolgrupper

27. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til teststoffets toksicitet for Lemna, f.eks. fra en test til bestemmelse af dosisinterval. I den endelige toksicitetstest skal der normalt være mindst fem teststofkoncentrationer, der danner en geometrisk række. Kvotienten mellem testkoncentrationerne skal helst ikke være over 3,2, men kan dog være større, når koncentrationsresponskurven er flad. Anvendes færre end fem koncentrationer, skal dette begrundes. Der skal anvendes mindst tre replikater for hver testkoncentration.

28. Ved fastsættelse af området for testkoncentrationerne (i det indledende forsøg og/eller i den endelige toksicitetstest) skal følgende tages i betragtning:
- En EC_x -værdi skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den kan bestemmes med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC_{50} -værdi skal den højeste testkoncentration således være større end EC_{50} -værdien. Ligger EC_{50} -værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit.
 - Hvis målet er at bestemme en LOEC-/NOEC-værdi, skal den laveste testkoncentration være så lav, at væksten ikke er væsentligt lavere end i kontrollen. Desuden skal den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrollen. Er det ikke tilfældet, må testen gentages med et andet koncentrationsområde (medmindre den højeste koncentration svarer til opløselighedsgrænsen eller til den maksimalt krævede grænsekonzentration, f.eks. 100 mg/l).
29. Hver test skal omfatte kontroller med samme næringssubstrat, samme antal blade og kolonier og samme miljøbetingelser og procedurer som testbeholderne, men uden testkemikalie. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal der indgå en ekstra kontrolbehandling med samme koncentration af opløsnings-/dispergeringsmiddel som i testbeholderne med testkemikalie. Antallet af kontrolreplikater (og, i givet fald, prøver med opløsningsmiddel) skal mindst være lig antallet af beholdere for hver testkoncentration, og ideelt dobbelt så stort.
30. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal dog være mindst tre replikater af kontrollerne.

Eksposering

31. Kolonier bestående af 2 til 4 synlige blade overføres fra podekulturen i vilkårlig rækkefølge til testbeholderne under aseptiske betingelser. Hver testbeholder skal indeholde i alt 9 til 12 blade. Der skal være samme antal blade og kolonier i hver testbeholder. Erfaringerne med brugen af metoden og oplysninger fra ringtest har vist, at tre replikater pr. behandling med 9 til 12 blade som startværdi i hver replikat er tilstrækkeligt til at påvise væksthastighed mellem behandlingerne svarende til en hæmning på 4 til 7 %, beregnet som væksthastighed (10 til 15 %, beregnet som udbytte) (7).
32. Testbeholdernes placering i inkubatoren skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur. Desuden skal testen enten have blokdesign, eller også skal testbeholderne omplaceres vilkårligt ved hver observation (eller hyppigere).
33. Hvis en indledende stabilitetstest viser, at testkemikaliekoncentrationen ikke kan opretholdes (dvs. den målte koncentration kommer ned under 80 % af den målte startkoncentration) gennem hele testperioden (syv dage), anbefales et semistatisk testregime. Dette gennemføres ved, at kolonierne eksponeres for friskfremstillede test- og kontrolopløsninger mindst to gange i løbet af testen (f.eks. på dag 3 og 5). Hyppigheden af eksponeringen for frisk substrat afhænger af testkemikaliet's stabilitet. Meget ustabile eller flygtige kemikalier kan kræve hyppigere eksponering, for at koncentrationerne kan holdes tilnærmelsesvis konstante. I visse tilfælde kan det være nødvendigt at bruge en gennemstrømningsmetode (8)(10).
34. Eksposeringsscenariet ved påføring på bladene (spray) er ikke omhandlet i denne metode. Der henvises i stedet til (11).

Inkuberingsbetingelser

35. Belysningen skal være konstant og komme fra lysstofrør med »warm« eller »cool white« lys med en styrke, der vælges i området $85\text{--}135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, målt i det fotosyntetisk aktive spektrum (400–700 nm) i punkter med samme afstand fra lyskilden som bladene af *Lemna* (svarende til 6 500–10 000 lux). Lysstyrken over testområdet må ikke afvige mere end $\pm 15 \%$ fra den valgte lysstyrke. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevet.

36. Temperaturen i testbeholderne skal være $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Kontrolsubstratets pH må højst stige med 1,5 enhed under testen. Dog vil en afvigelse på mere end 1,5 enhed ikke gøre testen ugyldig, hvis det kan dokumenteres, at validitetskriterierne er opfyldt. I særlige tilfælde, f.eks. testning af ustabile kemikalier eller metaller, må der udvises ekstra opmærksomhed over for pH-afvigelse. Nærmere vejledning er givet i (8).

Varighed

37. Testen afsluttes syv dage efter, at planterne er overført til testbeholderne.

Målinger og analytiske bestemmelser

38. Ved testens begyndelse tælles og registreres antallet af blade i testbeholderne, idet der sørges for, at fremstående, klart synlige blade medtages. Antal blade med normalt og unormalt udseende bestemmes ved testens begyndelse, mindst hvert tredje døgn i løbet af eksponeringsperioden (dvs. mindst to gange i løbet af testperioden på syv dage) samt ved testens slutning. Ændringer i planternes udvikling, f.eks. i bladstørrelse, udseende, tegn på nekrose, chlorose eller opsvulmethed, opbrydning af kolonierne eller tab af disses flydeevne, samt i røddernes længde og udseende skal registreres. Særlige kendetegn ved testsubstratet (f.eks. uopløst materiale i testbeholderen eller algevækst på denne) skal ligeledes registreres.
39. Foruden at bladantallet registreres under testen, vurderes testkemikaliet virkninger på en (eller flere) af følgende målevariable:
- i) totalt bladareal
 - ii) tørvægt
 - iii) frisk vægt.
40. Bestemmelse af det totale bladareal har den fordel, at det kan bestemmes for hver testbeholder og kontrolbeholder både ved testens start, under testen og ved dens slutning. Den tørre og friske vægt bestemmes ved testens start på en prøve af pødekulturen, der er repræsentativ for den, der anvendes til at igangsætte testen, samt ved testens slutning med plantemateriale fra hver test- og kontrolbeholder. Hvis der ikke måles bladareal, er tørvægt at foretrække frem for frisk vægt.
41. Bestemmelse af totalt bladareal, tørvægt og frisk vægt kan foretages således:
- i) *Totalt bladareal:* Det totale bladareal af alle kolonier kan bestemmes ved billedanalyse: Der kan afbildes en silhuet af testbeholder og planter med et videokamera (idet beholderen anbringes på en lyskasse), og det resulterende billede digitaliseres. Derefter kan det totale bladareal i testbeholderen bestemmes ved kalibrering med flade former med kendt areal. Det skal sikres, at interferens udelukkes fra testbeholderens rand. En alternativ, men mere omstændelig metode er at fotokopiere testbeholdere og planter, klippe den resulterende silhuet af kolonierne ud og bestemme arealet med en bladareal-analysator eller ved hjælp af millimeterpapir. Også andre teknikker kan anvendes (f.eks. vejning af papiret svarende til silhuetten og sammenholdelse med et enhedsareal).
 - ii) *Tørvægt:* Alle kolonier indsamles fra hver testbeholder og skylles med destilleret eller deioniseret vand. De duppes fri for overskydende vand og tørres derefter ved 60 °C , til vægten er konstant. Eventuelle rodstumper skal medtages. Tørvægten skal angives med en nøjagtighed på mindst 0,1 mg.
 - iii) *Frisk vægt:* Alle kolonier overføres til på forhånd vejede rør af polystyren (eller andet inert materiale), hvis afrundede bund er forsynet med et lille hul (1 mm). Rørene centrifugeres derefter ved 3 000 omdr./min. i 10 minutter ved stuetemperatur. Rørene, der indeholder de nu tørrede kolonier, vejes igen, og den friske vægt beregnes ved fratrækning af vægten af de tomme rør.

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

42. Hvis testen udføres statistisk, skal pH for hver behandling måles ved testens start og slutning. Udføres testen semistatistisk, foretages pH-måling på hver portion »frisk« testopløsning før hver udskiftning foruden på de tilsvarende »brugte« opløsninger.

43. Lysintensiteten skal måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet i punkter med samme afstand til lyskilden som Lemna-bladene. Målingerne foretages mindst en gang i løbet af testen. Mindst en gang dagligt måles temperaturen af substratet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet.
44. Under testen bestemmes testkemikaliekoncentrationerne med passende intervaller. Mindstekravet i statistiske test er bestemmelse af koncentrationerne ved testens start og slutning.
45. I semistatistiske test, hvor testkemikaliekoncentrationen ikke forventes at forblive inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle friskfremstillede testopløsninger, og de samme opløsninger analyseres ved hver udskiftning (se punkt 33). For de test, hvor den målte startkoncentration af testkemikaliets ikke ligger inden for $\pm 20\%$ af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver testkemikaliekoncentrationen før udskiftning kun bestemmes på en testbeholderreplikant ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolerede beholdere for hver replikant).
46. For gennemstrømningstest vil det være hensigtsmæssigt med en prøvetagningsplan svarende til den, der er beskrevet for semistatistiske test, herunder analyse ved testens start, undervejs og ved testens slutning, men måling af »brugt« testopløsning er ikke hensigtsmæssig i dette tilfælde. I sådanne test skal flowhastigheden af fortyndingsmiddel og testkemikalie eller testkemikaliestamopløsning kontrolleres dagligt.
47. Hvis det kan konstateres, at testkemikaliekoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for $\pm 20\%$ af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end $\pm 20\%$, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (8).

Grænsetest

48. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikaliets er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier finder anvendelse på en grænsetest, bortset fra at antallet af behandlingsreplikater skal fordobles. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

DATA OG RAPPORTERING

Fordoblingstid

49. Til bestemmelse af fordoblingstiden (T_d) for bladantallet og forsøgets overensstemmelse med dette validitetskriterium (punkt 12) anvendes følgende formel på de data, der er indsamlet for kontrolbeholderne:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

hvor μ er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, der bestemmes som beskrevet i punkt 54-55.

Responsvariable

50. Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på den vegetative vækst af Lemna. I nærværende testmetode beskrives to responsvariable, da præferencer og myndighedskrav er forskellige i forskellige lande. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle lande, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariable a) og b).
- a) *Gennemsnitlig specifik væksthastighed*: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i bladantallet samt den logaritmiske ændring i en anden måleparameter (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) med tiden (udtrykt pr. dag) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Den kaldes undertiden relativ væksthastighed (12).
- b) *Udbytte*: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af ændringen i bladantallet og desuden ændringen i en anden måleparameter (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe indtil testens slutning.
51. Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og at forskellen mellem dem må have for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x -værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (E_yC_x) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte (E_yC_x), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik væksthastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for andemad i ikke-begrænsede kulturer, idet toksiciteten vurderes på grundlag af virkningerne på væksthastigheden og ikke afhænger af den absolutte størrelse af den specifikke væksthastighed af kontrollen, koncentrationsresponskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariabelen for udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variable. E_yC_x afhænger af den specifikke væksthastighed af de arter af andemad, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke væksthastighed, som kan variere mellem de forskellige arter og endda kloner. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer mellem forskellige arter af andemad, endsige forskellige kloner. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, indeholder nærværende testmetode toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse lande.
52. Beregningen af toksicitet skal baseres på bladantal og mindst en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), da visse kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end bladantallet. Denne virkning ville ikke blive opdaget ved beregning af bladantallet alene.
53. Bladantallet og eventuelle andre registrerede målevariable, dvs. totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt, samles i en tabel sammen med testkemikaliekoncentrationerne for hvert målepunkt. Den efterfølgende dataanalyse, f.eks. beregning af estimater for LOEC, NOEC eller EC_x , skal baseres på værdierne for de enkelte replikater og ikke beregnede gennemsnit for hver behandlingsgruppe.

Gennemsnitlig specifik væksthastighed

54. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i vækstvariablene — bladantal og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) — ved hjælp af nedenstående udtryk for hver replikat af kontrol og behandlingsprøve:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

hvor:

— μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

— N_i er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

- N_j er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j
- t er tidsrummet fra i til j .

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimer for variansen.

55. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed skal beregnes for hele testperioden (tiden »i« i ovenstående formel er testens starttid, og tiden »j« er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimer for variansen. Derudover foretages en trinvis beregning af væksthastigheden for at vurdere testkemikaliet virkninger i eksponeringsperioden (f.eks. ved betragtning af logaritmisk transformerede vækstkurver). Væsentlige forskelle mellem den trinvis beregnede væksthastighed og den gennemsnitlige væksthastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig. I så fald kan et forsigtigt skøn opstilles ved at sammenholde de specifikke væksthastigheder fra behandlede kulturer i det tidsrum, hvor hæmningen er maksimal, med de tilsvarende værdier for kontroller i samme tidsrum.
56. Hæmningen i procent af væksthastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

hvor:

- $\% I_r$: er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed
- μ_C : er gennemsnitsværdien af μ i kontrollen
- μ_T : er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen.

Udbytte

57. Virkningerne på udbyttet bestemmes på grundlag af to målevariable, bladantallet og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) i hver testbeholder ved testens start og slutning. For tørvægt og frisk vægt bestemmes startbiomassen på grundlag af en prøve af blade, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pøde testbeholderne (se punkt 20). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimer for variansen. Udbyttehæmningen i procent ($\% I_y$) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

hvor:

- $\% I_y$ er udbyttereduktionen i procent
- b_C er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen
- b_T er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen.

Optegning af koncentrationsresponskurver

58. Der afsættes koncentrationsresponskurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_r eller I_y , beregnet som vist i punkt 56 eller punkt 57) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

59. Estimerne for EC_x (f.eks. EC_{50}) baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed ($E_r C_x$), dels af udbytte ($E_y C_x$), der hver især er baseret på bladantal og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt). Dette skyldes, at der findes testkemikalier med forskellig virkning på bladantallet og på de øvrige målevariable. Som parametre for toksicitet er der derfor fire EC_x -værdier for hvert beregnet hæmningsniveau x : $E_r C_x$ (bladantal), $E_r C_x$ (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), $E_y C_x$ (bladantal) og $E_y C_x$ (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt).

Statistiske metoder

60. Målet er at formulere den kvantitative koncentrationsresponsammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene, til f. eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (13), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (13). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller biomasse. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x -værdier ud fra kontinuerte data findes i henvisning (14),(15) og (16).
61. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes sammenhængen mellem koncentration og respons til at beregne punktestimater for EC_x -værdier. Når det er muligt, skal 95 % konfidensgrænser bestemmes for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages på responsværdierne for de enkelte replikater, ikke på behandlingsgruppegennemsnit.
62. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimer og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (17).
63. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan være nyttig (18)(19)(20)(21). Det må vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (22). Hertil kan Levenes eller Bartlett's test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (16).
64. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater EC_x . Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne Lemna-test. Et område på 10 til 20 % synes imidlertid at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20} .

Rapportering

65. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed
- kemiske identifikationsdata (f.eks. CAS-nr.), herunder renhed (urenheder).

Testede arter:

- videnskabeligt navn, klon (hvis den kendes) og kilde.

Testbetingelser:

- den anvendte testmetode (statisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)
- startdato og varighed for testen
- testsubstrat
- beskrivelse af forsøgsdesign: testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, antal kolonier og blade pr. testbeholder ved testens start
- testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration
- metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler
- testtemperatur
- lyskilde, lysintensitet og -homogenitet
- test- og kontrolsubstraternes pH-værdi
- testkemikaliekoncentrationer og analysemetoder med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne)
- metoder til bestemmelse af bladantal og andre målevariable, f.eks. tørvægt, frisk vægt og bladareal
- alle fravigelser af nærværende testmetode.

Resultater:

- rådata: antal blade og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse
- gennemsnit og standardafvigelse for hver målevariabel
- vækstkurver for hver koncentration (brug af logaritmisk transformerede målevariable anbefales, se punkt 55)
- fordoblingstid/væksthastighed i kontrollen, baseret på bladantal
- beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikant, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne
- grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning
- estimer for toksicitetsendepunkter for responsvariablene, f.eks. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem
- hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)
- enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling
- ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

- (1) ASTM International (2003), Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3, E 1415-91 (Reapproved 1998), s. 733-742. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology, Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation (1996), XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, s. 10 ff.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute (1995), Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed, SS 02 82 13, s. 15 ff. (på svensk).
- (5) Environment Canada (1999), Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*, EPS 1/RM/37 — s. 120 ff.
- (6) Environment Canada (1993), Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation, Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) I. Sims, P. Whitehouse og R. Lacey (1999), The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test, Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003, WRc plc — Environment Agency.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (9) International Organization for Standardization. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (10) C. T. Walbridge (1977), A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.), Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108, september 1977.
- (11) W. L. Lockhart, B. N. Billeck og C. L. Baron (1989), Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate, *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.
- (12) D.B. Huebert og J.M. Shay (1993), Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) E. R. Christensen og N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.*, 19, 713-718.
- (14) N. Nyholm, P. S. Sørensen, K. O. Kusk og E. R. Christensen (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (17) T. J. Norberg-King (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

-
- (18) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- (19) C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20, 482-491.
- (20) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, 27: 103-117.
- (21) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, 28: 519-531.
- (22) P. Brain og R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner og forkortelser anvendes i denne testmetode:

Biomasse er tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test måles typisk surrogater for biomasse, f.eks. bladantal eller bladareal, og betegnelsen »biomasse« benyttes således også for sådanne surrogatmålinger.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Chlorose er gulning af bladvæv.

Klon er en organisme eller celle, der er opstået af en enkelt celle ved vegetativ formering. Individer fra samme klon er derfor genetisk identiske.

Koloni er en samling af moder- og datterblade (sædvanligvis 2 til 4), der sidder fast på hinanden. Betegnes undertiden en plante.

EC_x er den koncentration af testkemikalie opløst i testsubstratet, der medfører en væksthæmning på x % (f.eks. 50 %) af Lemna i løbet af en nærmere bestemt eksponeringsperiode (som udtrykkeligt skal angives, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis væksthastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for væksthastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. »E_rC (bladantal)«.

Gennemstrømningstest er en test, hvor testopløsningen udskiftes kontinuerligt.

Blad er en individuel/enkelt »bladlignende« struktur hos andemadplanten. Det er den mindste individuelle enhed, der kan formere sig.

Opsvulmethed er blade, der fremtræder udbulede eller opsvulmede.

Vækst er en stigning i en målevariabel i løbet af testperioden, f.eks. bladantal, tørvægt, vådvægt eller bladareal.

Væksthastighed (gennemsnitlig specifik væksthastighed) er den logaritmiske biomasseforøgelse i eksponeringsperioden.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) er den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikallet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning, der mindst svarer til den, der iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariable er enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. I denne metode er bladantal, bladareal, frisk vægt og tørvægt målevariable.

Monokultur er en kultur med en planteart.

Nekrose er dødt (dvs. hvidt eller gennemblødt) bladvæv.

Nuleffektkoncentration (No Observed Effect Concentration, NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

Fænotype er de observerbare kendetegn for en organisme, som er bestemt af samspillet mellem dens gener og dens omgivelser.

Responsvariable er variable, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af målte parametre, der beskriver biomassen ved forskellige beregningsmetoder. I nærværende testmetode er væksthastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som bladantal, bladareal, frisk vægt eller tørvægt.

Semistatisk test (udskiftningstest) er en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test er en testmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Endepunkt for en test er den generelle faktor, som testkemikaliet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne testmetode er endepunktet væksthæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testsubstrat er det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testsubstratet.

Udbytte er værdien af en målevariabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start.

Tillæg 2

Beskrivelse af *Lemna* spp.

Vandplanten med trivialnavnet andemad, *Lemna* spp., tilhører familien Lemnaceae, der omfatter en række arter, som er udbredt over hele verden og består af fire slægter. Deres respektive udseende og taksonomi er beskrevet udtømmende (1)(2). *Lemna gibba* og *L. minor* er repræsentative arter fra tempererede områder og finder almindelig anvendelse i toksicitetstest. Begge arter har flydende eller nedsænket skiveformet stilk (blad) og en meget tynd rod, der udgår fra midten af undersiden på hvert blad. *Lemna* spp. danner sjældent blomster, og planterne formerer sig vegetativt ved at skyde nye blade (3). De unge planter er blegere og har kortere rødder end de ældre planter og består af to-tre blade af forskellig størrelse. Lemnas enkle struktur, ukønnede formering og korte generationstid gør planten meget velegnet til laboratorietest (4)(5).

På grund af artsbetingede forskelle i følsomhed er sammenligning af følsomhed kun gyldig inden for samme art.

Eksempler på arter af *Lemna*, der er blevet anvendt til testning (henvisninger vedrørende de forskellige arter):

Lemna aequinoctialis: B. Eklund (1996), The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays, Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2, Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: N. A. Clark (1925), The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light, J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996), XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, s. 10 ff.

Swedish Standards Institute (SIS) (1995), Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed, SS 02 82 13, s. 15 ff. (på svensk).

Lemna gibba: ASTM International (2003), Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3, E 1415-91 (Reapproved 1998), s. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.

Lemna paucicostata: Y. Nasu og M. Kugimoto (1981), *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: J. R. Clark et al. (1981), Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*), Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: D. B. Huebert og J. M. Shay (1993), Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds, Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: T. C. Hutchinson og H. Czyrska (1975), Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds, Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Kilder til *Lemna*-arter

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tlf.: +1-416-978-3641
Fax: +1-416-978-5878
E-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
USA

Tlf.: +1 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SVERIGE
Tlf.: +46 8 674 7240
Fax: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Tyskland
E-mail: lemna@uba.de

LITTERATUR

- (1) W. S. Hillman (1961), The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature, *The Botanical Review*, 27:221-287.
- (2) E. Landolt (1986), Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*), Vol. 2, Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
- (3) G. Björndahl (1982), Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family), ISBN 82-991150-0-0, The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- (4) W. Wang (1986), Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed, *Environmental Pollution, Ser B*, 11:1-14.
- (5) W. Wang (1990), Literature review on duckweed toxicity testing, *Environmental Research*, 52:7-22.

*Tillæg 3***Opbevaring af stamkulturen**

Ved lavere temperatur (4-10 °C) kan stamkulturer holdes i længere tid uden at skulle gendannes. Næringssubstratet til Lemna kan være det samme som det, der anvendes ved testning, men andre næringsrige substrater kan anvendes til stamkulturer.

Med jævne mellemrum udtages et antal unge, lysegrønne planter og overføres aseptisk til nye dyrkningsbeholdere med frisk substrat. Under de her foreslåede køligere forhold kan dyrkning af subkulturer ske med op til tre måneders mellemrum.

Der skal anvendes kemisk rene (syrevaskede) og sterile dyrkningsbeholdere af glas samt aseptisk håndtering. Hvis en stamkultur bliver kontamineret med f.eks. alger eller svampe, må der foretages indgreb til at eliminere kontaminanten. For algers og de fleste andre kontaminanternes vedkommende kan dette opnås ved overfladesterilisation. Der udtages en prøve af det kontaminede plantemateriale, og rødderne klippes bort. Materialet omrystes derefter kraftigt med rent vand, efterfulgt af nedsenkning i en 0,5 % (v/v) opløsning af natriumhypochlorit i mellem 30 sekunder og 5 minutter. Plantematerialet skylles derefter med sterilt vand og overføres i et par portioner til dyrkningsbeholdere indeholdende frisk næringssubstrat. Mange af bladene vil dø som følge af denne behandling, specielt hvis der anvendes længere eksponeringsperioder, men nogle af de overlevende vil sædvanligvis være fri for kontaminering. Disse kan derefter bruges til podning af nye kulturer.

Tillæg 4

Substrater

Der anbefales forskellige næringssubstrater til *L. minor* og *L. gibba*. Til *L. minor* anbefales et modificeret substrat efter Swedish Standard (SIS), mens substratet 20X AAP anbefales til *L. gibba*. Nedenfor er sammensætningen af de to substrater angivet. Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Lemna-næringssubstrat efter Swedish Standard (SIS)

- Stamopløsning I-V steriliseres ved autoklaving (120 °C, 15 min.) eller ved membranfiltrering (porediameter ca. 0,2 µm).
- Stamopløsning VI (og valgfrit VII) steriliseres kun ved membranfiltrering og må ikke autoklaveres.
- Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Stamopløsning I-V skal kasseres efter seks måneder, mens holdbarheden for stamopløsning VI (og valgfrit VII) er en måned.

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløsningen (g/l)	Koncentration i færdigt substrat (mg/•l)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffer)	490	490	—	—

Til fremstilling af en liter SIS-substrat tilsættes følgende til 900 ml deioniseret vand:

- 10 ml stamopløsning I
- 5 ml stamopløsning II
- 5 ml stamopløsning III
- 5 ml stamopløsning IV
- 1 ml stamopløsning V
- 5 ml stamopløsning VI
- 1 ml stamopløsning VII (valgfrit)

Bemærk: Til visse testkemikalier kan der yderligere være brug for en stamopløsning VII (MOPS-buffer) (se punkt 11).

pH justeres til $6,5 \pm 0,2$ med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til en liter med deioniseret vand.

20X AAP-næringssubstrat

Stamopløsninger fremstilles i sterilt, destilleret eller deioniseret vand.

Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Under disse betingelser vil stamopløsningerne have en holdbarhed på mindst 6-8 uger.

Der fremstilles fem næringssubstrat-stamopløsninger (A1, A2, A3, B og C) til 20X-AAP-substrat, idet der anvendes kemikalier af reagenskvalitet. Næringssubstratet fremstilles ved, at der tilsættes 20 ml af hver næringssubstrat-stamopløsning til ca. 850 ml deioniseret vand. pH justeres til $7,5 \pm 0,1$ med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til en liter med deioniseret vand. Substratet filtreres gennem et membranfilter med en porediameter på ca. 0,2 μm over i en steril beholder.

Det næringssubstrat, der skal bruges til testningen, skal fremstilles 1-2 dage før brug, for at pH kan stabiliseres. Næringssubstratets pH skal kontrolleres før brug og om nødvendigt justeres igen med 0,1 M eller 1 M NaOH eller HCl som beskrevet ovenfor.

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløsning (g/•l) (*)	Koncentration i færdigt substrat (mg/•l) (*)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/•l) (*)
A1	NaNO_3	26	510	Na; N	190; 84
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	240	Mg	58,08
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	290	S	38,22
A3	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløsning (g/l) (*)	Koncentration i færdigt substrat (mg/l) (*)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

(*) Medmindre noteret

NB: Den teoretisk mest passende endelige bicarbonatkoncentration (som vil overflødig gøre nævneværdig pH-justering) er 15 mg/l, ikke 300 mg/l. Den traditionelle brug af 20X-AAP-substrat og ringtesten i forbindelse med denne vejledning er imidlertid baseret på 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse og R. Lacey (1999), The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test, Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRC plc — Environment Agency).

STEINBERG-substrat (efter ISO 20079)

Koncentrationer og stamopløsninger

Det modificerede Steinberg-substrat anvendes i ISO 20079 til *Lemna minor* alene (da der deri kun tillades brug af *Lemna minor*), men også med *Lemna gibba* er der opnået gode testresultater.

Til fremstilling af substratet skal der anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Næringssubstratet fremstilles af stamopløsninger eller af det 10-dobbelte koncentrerede substrat, som har den maksimale koncentration af substrat uden udfældning.

Tabel 1

pH-stabiliseret STEINBERG-substrat (modificeret efter Altenburger)

Komponent		Næringssubstrat	
Makronæringsstoffer	Molvægt	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Komponent		Næringssubstrat	
Mikronæringsstoffer	Molvægt	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatrium-dihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2

Stamopløsninger (makronæringsstoffer)

1. Makronæringsstoffer (50 gange koncentreret)	g/l
Stamopløsning 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Stamopløsning 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Stamopløsning 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabel 3

Stamopløsninger (mikronæringsstoffer)

2. Mikronæringsstoffer (1 000 gange koncentreret)	mg/l
Stamopløsning 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Stamopløsning 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Stamopløsning 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Mikronæringsstoffer (1 000 gange koncentreret)	mg/l
Stamopløsning 7:	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180,0
Stamopløsning 8:	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	760,00
EDTA-dinatrium-dihydrat	1 500,00

- Stamopløsning 2 og 3 og 4 til 7 kan pooles hver for sig (idet de nødvendige koncentrationer tages i betragtning).
- For at få opnå længere holdbarhed autoklaveres stamopløsningerne ved 121 °C i 20 min., eller sterilfiltreres (0,2 µm) som alternativ. Brug af sterilfiltrering (0,2 µm) tilrådes kraftigt til stamopløsning 8.

Fremstilling af den endelige koncentration af STEINBERG-substratet (modificeret)

- Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 900 ml deioniseret vand for at undgå udfældning.
- Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3).
- pH skal være 5,5 +/- 0,2 (justeres ved tilsætning af mindst mulig NaOH-opløsning eller HCl).
- Der fyldes op med vand til 1 000 ml.
- Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklaverings (ved 121 °C i 20 min.).

Fremstilling af det 10-dobbelte koncentrerede STEINBERG-substrat (modificeret) til midlertidig opbevaring

- Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 30 ml vand for at undgå udfældning.
- Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3). Der fyldes op med vand til 100 ml.
- Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklaverings (ved 121 °C i 20 min.).
- Substratets pH (i den endelige koncentration) skal være 5,5 ± 0,2.

6) Følgende kapitler C.31 til C.46 indsættes:

»C.31. LANDPLANTETEST: FRØPLANTESPIRINGS- OG FRØPLANTEVÆKSTTEST

INDLEDNING

- Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 208 (2006). Testmetoderne bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling og deres anvendelse til lovgivningsformål. Denne opdaterede testmetode har til formål at vurdere kemikaliers potentielle virkninger på frøplantespiring og -vækst. Den omfatter således ikke kroniske virkninger eller virkninger på reproduktionen (dvs. frøsætning, blomsterdannelse, frugtmodning). Der skal tages højde for eksponeringsbetingelser og egenskaber for det kemikalie, der skal testes, for at sikre at der anvendes passende testmetoder (f.eks. bør der tages højde for virkningerne af pH-værdien og associerede modioner i forbindelse med testning af metaller/metalforbindelser) (1). Denne testmetode omhandler ikke planter, der eksponeres for dampe fra kemikalier. Denne testmetode anvendes til testning af almindelige kemikalier, biocider og plantebeskyttelsesmidler (også kendt som pesticider). Den er udviklet på grundlag af eksisterende metoder (2)(3)(4)(5)(6)(7). Andre henvisninger med relevans for plantetestning blev også taget i betragtning (8)(9)(10). De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

2. Testen vurderer virkningerne på højerestående planters frøplantespiring og tidlige vækst efter eksponering for testkemikaliet i jord (eller en anden passende jordmatrix). Frø bringes i kontakt med jord, der er behandlet med testkemikaliet, og vurderes med hensyn til virkninger efter normalt 14-21 dage efter fremspiring af 50 % af frøplanterne i kontrolgruppen. De målte endepunkter er visuel bedømmelse af frøplantespiring, tørvægt for skud (alternativt vådvægt for skud) og i visse tilfælde skudhøjde samt en vurdering af synlige skadelige virkninger på forskellige dele af planten. Disse målinger og observationer sammenlignes med målinger og observationer for ubehandlede kontrolplanter.
3. Afhængigt af den forventede eksponeringsvej indarbejdes testkemikaliet enten i jorden (eller eventuelt i en syntetisk jordmatrix) eller påføres på jordoverfladen, hvilket svarer til kemikaliet potentielle eksponeringsvej. Indarbejdelse i jorden sker ved at behandle bulkjord. Efter tilsætning fyldes jorden i pletter, og frø af den angivne planteart plantes i jorden. Påføring af kemikaliet på jordoverfladen sker på pottejord, hvori frøene allerede er plantet. Testenhederne (kontroller og behandlet jord plus frø) placeres derefter under betingelser, der er egnede til at fremme planternes spiring/vækst.
4. Testen kan udføres for at bestemme dosis/respons-kurven eller ved en enkelt koncentration/mængde som en grænsetest i henhold til formålet med undersøgelsen. Hvis resultater fra den enkle test af koncentrationen/mængden overstiger et vist toksicitetsniveau (f.eks. hvis der observeres virkninger, som overstiger x %), udføres der en test til bestemmelse af dosisinterval med henblik på at bestemme en øvre og nedre grænse for toksicitet efterfulgt af flere test af koncentration/mængde med henblik på en dosis/respons-kurve. Der bruges en passende statistisk analyse til at opnå en effektiv koncentration EC_x eller effektiv tilsat mængde ER_x (f.eks. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) for det eller de mest følsomme betragtede parametre. Nuleffekt-koncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) kan også beregnes i testen.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

5. Følgende oplysninger er nyttige til identifikation af den forventede vej til eksponering for kemikaliet og til design af testen: strukturformel, renhed, vandopløselighed, opløselighed i organiske opløsningsmidler, 1-octanol/vand-fordelingskoefficient, sorptionsadfærd i jord, damptryk, kemisk stabilitet i vand og lys og bionedbrydelighed.

TESTENS VALIDITET

6. Hvis en test skal betragtes som valid, skal følgende resultatkrav opfyldes af kontrollerne:
 - frøplantespiringen er mindst 70 %
 - frøplanterne udviser ikke synlige fytotoksiske virkninger (f.eks. chlorose, nekrose, visnen, deformation af blade og stilke), og planterne udviser kun variation i vækst og morfologi, som er normal for den specifikke art
 - den gennemsnitlige overlevelse for de fremspirede kontrolfrøplanter er mindst 90 % i hele undersøgelsens varighed
 - miljøforholdene for en specifik art er identiske, og vækstsustreter indeholder samme mængde jordmatrix, bæremedium eller substrat fra samme kilde.

REFERENCEKEMIKALIE

7. Et referencekemikalie kan testes med regelmæssige intervaller, for at kontrollere at udførelsen af testen og de specifikke testplanters respons og testbetingelserne ikke har ændret sig signifikant over tid. Alternativt kan historisk måling af biomasse eller vækst for kontroller bruges til at vurdere testsystemet i specifikke laboratorier og bruges som en foranstaltning til intern kvalitetskontrol i laboratorier.

BESKRIVELSE AF METODEN

Naturlig jord — syntetisk substrat

8. Planter kan dyrkes i potter med sandet jord (sandy loam), silt- og lerholdigt sandjord (loamy sand) eller sandet lerjord (sandy clay loam), der indeholder op til 1,5 % organisk kulstof (ca. 3 % organisk stof). Kommerciel pottjord eller syntetisk jordblanding, der indeholder op til 1,5 % organisk kulstof, kan også bruges. Lerjord bør ikke bruges, hvis testkemikallet vides at have høj affinitet for ler. Markjord sigtes til en partikelstørrelse på 2 mm for at gøre jorden ensartet og fjerne grove partikler. Den endelige fremstillede jords type og tekstur, % organisk kulstof, pH og saltindhold samt elektrisk konduktivitet anføres i rapporten. Jorden skal være klassificeret i henhold til et standardklassifikationsskema (11). Jorden kan pasteuriseres eller varmebehandles for at mindske jordpatogens virkning.
9. Naturlig jord kan vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne og øge variabiliteten på grund af forskellige fysisk-kemiske egenskaber og mikrobielle populationer. Disse variable ændrer vandkapaciteten, evnen til kemisk binding, iltningen og indholdet af næringsstoffer og sporstoffer. Ud over variationerne i disse fysiske faktorer vil der også være variationer i de kemiske egenskaber, såsom pH and redoxpotentiale, som kan påvirke testkemikallets biotilgængelighed (12)(13)(14).
10. Syntetiske substrater bruges typisk ikke til testning af plantebeskyttelsesmidler, men de kan bruges til testning af almindelige kemikalier, i tilfælde hvor det ønskes at minimere den naturlige jords variabilitet og gøre testresultaterne mere sammenlignelige. Anvendte substrater bør bestå af inerte materialer, der minimerer interaktionen med testkemikallet, opløsningsmidlet eller begge. Surt vasket kvartssand, mineraluld og glaspellets (f.eks. 0,35 til 0,85 mm i diameter) har vist sig at være egnede inerte materialer, der adsorberer testkemikallet minimalt (15), hvilket sikrer, at kemikallet er maksimalt tilgængeligt for frøplanten ved optagelse gennem rødderne. Uegnede substrater er f.eks. vermiculit, perlit eller andre stærkt absorberende materialer. Der tilføres næringsmidler, for at sikre at planterne ikke stresses som følge af mangel på næringsstoffer, hvilket om muligt vurderes ved kemisk analyse eller visuel vurdering af kontrolplanterne.

Kriterier for udvælgelse af testarter

11. Der bør sikres en tilstrækkelig bred udvælgelse af arter, f.eks. ud fra deres taksonomiske mangfoldighed i planteriget, fordeling, abundans, artsspecifikke livscykluskarakteristika og område for deres naturlige forekomst, således at der udvikles et responsområde (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Følgende karakteristika for de eventuelle testarter bør tages i betragtning i forbindelse med udvælgelsen:
 - arterne har ensartede frø, som er umiddelbart tilgængelige fra pålidelige standardfrøkilder, og som producerer konstant, pålidelig og ensartet spiring samt ensartet frøplantevækst
 - planten er egnet til testning i laboratorium og kan give pålidelige og reproducerbare resultater i og på tværs af testfaciliteter
 - testarternes følsomhed skal stemme overens med responser hos planter i miljøet, der eksponeres for kemikallet
 - de har i en vis udstrækning være brugt i tidligere toksicitetstest, og deres brug i f.eks. herbicidbioassays, screening for tungmetaller, salt- eller mineralbelastningstest eller allelopatiundersøgelser indikerer følsomhed over for en lang række stressfaktorer
 - de er forenelige med testmetodens dyrkningsbetingelser
 - de opfylder testens validitetskriterier.

Nogle af de testarter, der historisk har været brugt mest, er opført på listen i tillæg 2, og potentielle vilde arter er opført på listen i tillæg 3.

12. Det antal arter, der skal testes, afhænger af de relevante lovgivningskrav og er derfor ikke angivet i testmetoden.

Applikation af testkemikaliet

13. Kemikaliet skal tilsættes i et passende substrat (f.eks. vand, acetone, ethanol, polyethylenglycol, gummi arabicum, sand). Blandinger (formulerede produkter eller formuleringer), som indeholder aktive bestanddele og forskellige adjuvanter, kan også testes.

Indarbejdelse i jord/syntetisk substrat

14. Kemikalier, der er vandopløselige eller opslæmmede i vand, kan tilsættes til vand, hvorefter opløsningen blandes med jord ved hjælp af en passende blander. Denne type test kan være velegnet, hvis eksponeringen for kemikaliet foregår gennem jord eller jordporevand, og kemikaliet mistænkes for at blive optaget gennem rødderne. Jordens vandholdende evne bør ikke overstiges med tilsætningen af testkemikaliet. Det tilsatte volumen vand skal være det samme for hver testkoncentration, men skal udelukkende forhindre, at jorden klumper sammen som et agglomerat.
15. Kemikalier med lav vandopløselighed opløses i et egnet flygtigt opløsningsmiddel (f.eks. acetone, ethanol) og blandes med sand. Opløsningsmidlet kan derefter fjernes fra sandet ved hjælp af en luftstrøm under konstant blanding af sandet. Det behandlede sand blandes med forsøgsjorden. Der klargøres en anden kontrol, som kun tilsættes sand og opløsningsmiddel. Der tilsættes lige dele sand, iblandet opløsningsmiddel, som fjernes, til alle behandlingsniveauer og den anden kontrol. Når der er tale om faste, uopløselige testkemikalier, blandes tør jord og kemikaliet i en passende blander. Herefter tilsættes jorden til potterne, og frøene sås straks.
16. Når der anvendes et syntetisk substrat i stedet for jord, kan kemikalier, der er opløselige i vand, opløses i næringsopløsningen umiddelbart inden testens begyndelse. Kemikalier, der ikke er opløselige i vand, men som kan opslæmmede i vand med et opløsningsmiddel som bærestof, tilsættes med bærestoffet til næringsopløsningen. Vanduopløselige kemikalier, for hvilke der ikke forefindes noget ikke-toksisk vandopløseligt bærestof, opløses i et passende flygtigt opløsningsmiddel. Opløsningen blandes med sand eller glaspellets, anbringes i et roterende vakuumapparat og inddampes, hvilket giver en ensartet belægning af kemikalie på sand eller pellets. En afvejet mængde pellets ekstraheres med det samme organiske opløsningsmiddel, og kemikaliet analyseres, inden potterne fyldes.

Overfladepåføring

17. Når der er tale om plantebeskyttelsesmidler, påføres testkemikaliet ofte ved sprøjtning på jordoverfladen. Alt udstyr, der anvendes til testene, herunder udstyr til klargøring og tilførsel af testkemikaliet, skal være udformet således, at test med udstyret kan udføres nøjagtigt og giver en reproducerbar dækning. Dækningen skal være ensartet på alle jordoverflader. Det skal sikres, at kemikalier ikke adsorberer til eller reagerer med udstyr (f.eks. plastslanger og lipofile kemikalier eller staldele og -elementer). Testkemikaliet sprøjtes på jordoverfladen, idet påføring med en almindelig marksprøjte efterlignes. Generelt bør sprøjtemængden ligge inden for det interval, der er normal praksis inden for landbruget, og volumenerne (mængden af vand osv.) anføres i rapporten. Der vælges en dysetype, som giver ensartet dækning af jordoverfladen. Hvis der påføres opløsningsmidler og bærestoffer, klargøres en anden gruppe af kontrolplanter, som kun modtager opløsningsmidlet/bærestoffet. Det er ikke nødvendigt i forbindelse med plantebeskyttelsesmidler, der testes som formuleringer.

Kontrol af koncentrationen/mængden af testkemikalie

18. Påføringskoncentrationerne/-mængderne skal kontrolleres under anvendelse af passende analytisk kontrol. Når der er tale om opløselige kemikalier, kan kontrollen af alle testkoncentrationer/-mængder bekræftes ved analyse af den testopløsning, der har den højeste koncentration, med dokumentation af efterfølgende fortynding og brug af kalibreret udstyr (f.eks. kalibreret analyseudstyr i glas, kalibreret sprøjteudstyr til påføring). Når der er tale om uopløselige kemikalier, skal kontrol af forbindelser foregå ved vejning af det testkemikalie, der tilsættes til jorden. Hvis der stilles krav om påvisning af homogenitet, kan analyse af jorden være nødvendig.

FREM GANGSMÅDE

Testdesign

19. Frø af samme art plantes i potter. Antallet af frø, der plantes pr. potte, afhænger af art, pottestørrelse og testens varighed. Antallet af planter pr. potte bør være således, at der sikres hensigtsmæssige vækstbetingelser, og planterne ikke kommer til at stå for tæt i testperioden. Den maksimale plantetæthed er på ca. 3-10 frø pr. 100 cm² afhængigt af frøenes størrelse. Det anbefales f.eks. at anvende en til to majs-, sojabønne-, tomat-, agurke- eller sukkerroeanter pr. beholder på 15 cm; tre raps- eller ærteplanter pr. beholder på 15 cm og 5-10 løgfrø, hvedefrø eller andre små frø pr. beholder på 15 cm. Antallet af frø og replikatter (replikaten defineres som en potte, og planter i samme potte udgør derfor ikke en replikat) bør være tilstrækkeligt til optimal statistisk analyse (21). Det skal bemærkes, at variabiliteten vil være større for testarter, hvor der bruges færre store frø pr. potte (replikat), end for testarter, hvor det er muligt at bruge et større antal små frø pr. potte. Denne variabilitet kan minimeres ved at plante samme antal frø i hver potte.
20. Der bruges kontrolgrupper, for at sikre at de observerede virkninger kun er knyttet til eller kan tilskrives eksponeringen for testkemikaliets. En hensigtsmæssig kontrolgruppe skal på alle måder være identisk med testgruppen, bortset fra eksponeringen for testkemikaliets. Inden for en given test skal alle testplanter, herunder kontrollerne, være fra samme kilde. For at forhindre bias stilles der krav om vilkårlig tildeling af test- og kontrolpotter.
21. Frø belagt med et insekticid eller et fungicid (dvs. »behandlede« frø) bør undgås. Visse tilsynsmyndigheder tillader dog brug af visse ikke-systemiske kontaktfungicider (f.eks. captan, thiram) (22). Hvis frøbårne patogener er et problem, kan frøene dyppes kortvarigt i en svag 5 %-hypochloritopløsning og efterfølgende skylles grundigt i rindende vand og tørres. Afhjælpende behandling med andre plantebeskyttelsesmidler er ikke tilladt.

Testbetingelser

22. Testbetingelserne skal ligne de betingelser, der er nødvendige for testarternes og -varieteternes normale vækst (tillæg 4 indeholder eksempler på testbetingelser). De spirende planter skal opbevares i henhold til god praksis for havebrug i kamre med kontrolleret miljø, klimakamre eller drivhuse. Når der bruges sådanne vækstrum, omfatter en sådan praksis normalt kontrol og registrering med passende hyppighed (f.eks. dagligt) af temperatur, luftfugtighed, kuldioxidkoncentration, lys (intensitet, bølgelængde, fotosyntetisk aktiv stråling) og lysperiode, vanding osv. for at sikre fornuftig plantevækst som bedømt ved kontrolplanterne af de udvalgte arter. Temperaturen i drivhuse skal kontrolleres ved hjælp af ventilations-, varme- og/eller kølesystemer. Følgende betingelser anbefales generelt ved testning i drivhus:

— temperatur: 22 °C ± 10 °C

— fugtighed: 70 % ± 25 %

— lysperiode: mindst 16 timers lys

— lysintensitet: 350 ± 50 µE/m²/s. Det kan være nødvendigt med supplerende belysning, hvis intensiteten falder til under 200 µE/m²/s, bølgelængde 400-700 nm, bortset fra visse arter, der har mindre behov for lys.

Miljøforholdene skal overvåges og registreres under undersøgelsen. Planterne dyrkes i ikke-porøse plastpotter eller glaserede potter med en bakke eller underskål under potten. Potterne kan flyttes med jævne mellemrum for at minimere variabiliteten i planternes vækst (som følge af forskelle i testbetingelserne i vækstrummet). Potterne skal være store nok til at tillade normal vækst.

23. Jorden kan tilsættes næringsstoffer efter behov for at bevare en fornuftig vækstkraft. Behovet og tidspunkterne for tilsætning af næringsstoffer kan vurderes ved iagttagelse af kontrolplanterne. Bundvanding af testbeholdere (f.eks. ved at bruge glasfibervæger) anbefales. Topvanding kan dog bruges indledende for at fremme frøspiring og letter desuden kemikaliets bevægelse ned i jorden, når det påføres på jordoverfladen.

24. De specifikke vækstbetingelser skal være egnede til testarterne og det undersøgte testkemikalie. Kontrolplanter og behandlede planter skal opbevares under samme miljøforhold, men der skal træffes passende forholdsregler for at forhindre krydseksponering (f.eks. for flygtige kemikalier) mellem forskellige behandlinger og kontrolplanters eksponering for testkemikaliets.

Testning ved en enkelt koncentration/mængde

25. Med henblik på at bestemme den passende koncentration/mængde af et kemikalie til udførelse af en test ved en enkelt koncentration eller mængde (provokations-/grænsetest) skal der tages højde for en række faktorer. I forbindelse med almindelige kemikalier er der bl.a. tale om kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. I forbindelse med plantebeskyttelsesmidler skal der tages højde for testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og anvendelsesmønster, dets maksimale koncentration eller spredemængde, antal påføringer pr. sæson og/eller persistens. For at bestemme om et almindeligt kemikalie har fytotoksiske egenskaber, kan det være hensigtsmæssigt at teste ved et maksimalt niveau på 1 000 mg/kg tør jord.

Test til bestemmelse af dosisinterval

26. Om nødvendigt kan en indledende test til bestemmelse af dosisinterval udføres, for at finde ud af hvilke koncentrationer/mængder, der skal testes i dosis/respons-hovedundersøgelsen. I forbindelse med den indledende test skal der være stor afstand mellem testkoncentrationerne/-mængderne (f.eks. 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg tør jord). I forbindelse med plantebeskyttelsesmidler kan koncentrationerne/mængderne være baseret på den anbefalede eller maksimale koncentration eller spredemængde, f.eks. 1/100, 1/10, 1/1 af den anbefalede/maksimal koncentration eller spredemængde.

Testning ved flere koncentrationer/mængder

27. Formålet med testen ved flere koncentrationer/mængder er at fastlægge et dosis/respons-forhold og bestemme en EC_x - eller ER_x -værdi for spiring, biomasse og/eller visuelle virkninger sammenlignet med ikke-eksponerede kontroller i henhold til tilsynsmyndighedernes krav.
28. Antallet af og afstanden mellem koncentrationerne eller mængderne skal være tilstrækkelig til at fastlægge et pålideligt dosis/respons-forhold og en regressionsligning og beregne EC_x eller ER_x . De udvalgte koncentrationer/mængder skal omfatte de EC_x - eller ER_x -værdier, som skal bestemmes. Hvis der f.eks. skal bestemmes en EC_{50} -værdi, vil det være ønskeligt at teste ved mængder, som har en virkning på 20-80 %. For at opnå dette er det anbefalede antal testkoncentrationer/-mængder mindst fem i en geometrisk serie plus ikke-behandlet kontrol med en afstandsfaktor, som ikke overstiger tre. Der skal være mindst fire replikater og i alt 20 frø pr. behandlings- og kontrolgruppe. Det kan være nødvendigt med flere replikater af visse planter med lav spireevne eller varierende vækstformer for at øge testens statistiske styrke. Hvis der bruges et større antal testkoncentrationer/-mængder, kan antallet af replikater reduceres. Hvis NOEC skal beregnes, kan det være nødvendigt med flere replikater for at opnå den ønskede statistiske styrke (23).

Observationer

29. Under observationsperioden, dvs. 14-21 dage efter at 50 % af kontrolplanterne (også eventuelle kontrolplanter med opløsningsmiddel) har spiret, iagttages planterne hyppigt (mindst ugentligt og om muligt dagligt), for at konstatere om der forekommer spiring og visuel fytotoksicitet og dødelighed. Ved testens afslutning registreres målingen af den procentvise spiring og de overlevende planters biomasse samt synlige skadelige virkninger på forskellige dele af planten. Sidstnævnte omfatter abnormiteter i de spirede frøplanter udseende, hæmmet vækst, chlorose, misfarvning, dødelighed og påvirkning af planternes udvikling. Slutbiomassen kan måles ved hjælp af de overlevende planters endelige gennemsnitlige tørvægt for skud ved at høste skuddet ved jordoverfladen og tørre det til konstant vægt ved 60 °C. Alternativt kan slutbiomassen måles ved hjælp af vådvægt for skud. Skuddets højde kan være et andet endepunkt, hvis tilsynsmyndighederne kræver det. Der kan anvendes et ensartet scoringssystem for visuelle skader til evaluering af de observerbare toksiske responser. Eksempler på kvalitative og kvantitative visuelle bedømmelser findes i henvisning (23) (24).

DATA OG RAPPORTERING

Statistisk analyse*Test ved en enkelt koncentration/mængde*

30. Data for hver planteart analyseres ved hjælp af en passende statistisk metode (21). Effektniveauet ved testkoncentrationen/-mængden anføres i rapporten, eller det anføres, at der ikke er opnået en given effekt ved testkoncentrationen/-mængden (eksempel: $< x$ % effekt observeret ved koncentration eller mængde y)

Test ved flere koncentrationer/mængder

31. Et dosis/respons-forhold beregnes ved hjælp af en regressionsligning. Der kan bruges forskellige modeller: Logit-, probit-, Weibull-, Spearman-Kärber- og Trimmed Spearman-Kärber-metoderne kan f.eks. være hensigtsmæssige metoder til beregning af EC_x eller ER_x (f.eks. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) og værdiens konfidensgrænser som kvantale data. I forbindelse med frøplanternes vækst (vægt og højde) som kontinuerte endepunkter kan EC_x eller ER_x og værdiens konfidensgrænser beregnes ved hjælp af en passende regressionsanalyse (f.eks. Bruce-Versteegs ikke-lineære regressionsanalyse (25)). R^2 skal om muligt være 0,7 eller højere for de mest følsomme arter, og de anvendte testkoncentrationer/-mængder skal omfatte effekter på 20-80 %. Hvis NOEC skal beregnes, foretrækkes anvendelse af stærke statistiske test, som udvælges på grundlag af datafordeling (21)(26).

Testrapport

32. Testrapporten skal indeholde en præsentation af resultaterne af undersøgelsen og en detaljeret beskrivelse af testbetingelserne, en grundig diskussion af resultaterne samt analyser af dataene og de konklusioner, der er draget af analyserne. Rapporten skal indeholde et resume i tabelform og et sammendrag af resultaterne. Rapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- kemisk identifikation, relevante egenskaber for det testede kemikalie (f.eks. $\log P_{ow}$, vandopløselighed, damptryk og oplysninger om skæbne og adfærd i miljøet, hvis de foreligger)
- oplysninger om klargøring af testopløsningen og kontrol af testkoncentrationer, jf. punkt 18.

Testede arter:

- oplysninger om testorganismer: arter/sorter, plantefamilier, videnskabelige og generiske navne, kilder og frøets historie beskrevet så udførligt som muligt (dvs. leverandørens navn, spiringsprocent, frøstørrelse, klasse, parti- eller batchnummer, frøår eller vækstsæson, hvor det er indsamlet, dato for spiringsbedømmelse), levedygtighed osv.
- antal testede mono- og di-cotyledon-arter
- begrundelse for valg af art
- beskrivelse af opbevaring, behandling og vedligeholdelse af frø.

Testbetingelser:

- testfacilitet (f.eks. vækstkammer, klimakammer eller drivhus)
- beskrivelse af testsystem (f.eks. pottedimensioner, pottemateriale og jordmængde)
- jordegenskaber (tekstur eller jordtype: jordpartikelfordeling og -klassifikation, fysisk- kemiske egenskaber, herunder % organisk stof, % organisk kulstof og pH)
- klargøring af jord/substrat (f.eks. jord, syntetisk jord, sand mv.) inden testen
- beskrivelse af eventuelt næringssubstrat

- anvendelse af testkemikaliet: beskrivelse af anvendelsesmetode, beskrivelse af udstyr, eksponeringshastighed og -mængde, herunder kontrol af kemikaliet, beskrivelse af kalibreringsmetode og beskrivelse af miljøforhold under anvendelsen
- vækstbetingelser: lysintensitet (f.eks. fotosynteseaktiv solindstråling), lysperiode, maks./min. temperaturer, vandingstidspunkter og -metode, gødning
- antal frø pr. potte, antal planter pr. dosis, antal replikater (potter) pr. eksponeringsmængde
- type og antal kontroller (negative og/eller positive kontroller, eventuel opløsningsmiddelkontrol)
- testens varighed.

Resultater:

- tabel over alle endepunkter for hver replikat, testkoncentration/-mængde og art
- spiringer, antal og procent, sammenlignet med kontroller
- biomassebestemmelse (tørvægt eller vådvægt for skud) af planterne som procentdel af kontrollerne
- skudhøjde for planterne som procentdel af kontrollerne, hvis målt
- procent visuelle skader og kvalitativ og kvantitativ beskrivelse af visuelle skader (chlorose, nekrose, visnen, deformation af blade og stilke samt ingen virkninger) forårsaget af testkemikaliet sammenlignet med kontrolplanterne
- beskrivelse af den bedømmelsesskala, der bruges til at vurdere visuelle skader, hvis der foretages en visuel bedømmelse
- ved undersøgelser med en enkelt mængde skal skaderne anføres i rapporten i procent
- EC_x - eller ER_x -værdier (f.eks. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) og tilhørende konfidensgrænser. Når der foretages regressionsanalyser anføres standardfejl for regressionsligningen og standardfejl for individuelle vurderinger af parametre (f.eks. hældning, skæring)
- NOEC-værdier (og LOEC-værdier), hvis de er beregnet
- beskrivelse af de anvendte statistiske metoder og forudsætninger
- grafisk visning af data og dosis/respons-forhold for testarterne.

Afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

- (1) G. Schrader, K. Metge og M. Bahadır (1998), Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods, *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1993), ISO 11269-1, Soil Quality — Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.
- (3) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995), ISO 11269-2, Soil Quality — Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM) (2002), E 1963-98, Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA (1982), FIFRA, 40CFR, Part 158.540, Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA (1996), OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850, Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background — Non-target Plant Testing
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity

- 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence)
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201 (1982), Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1 (1993), Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) C. Boutin, K. E. Freemark og C. J. Keddy (1993), Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation, Technical Report Series No. 145, Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.
- (9) R. Forster, U. Heimbach, C. Kula og P. Zwerger (1997), Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna), Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) B. Hale, J. C. Hall, K. Solomon og G. Stephenson (1994), A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) L. J. Audus (1964), Herbicide behaviour in the soil, in: L. J. Audus ed., *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, kapitel 5, s. 163-206.
- (13) M. L. Beall Jr. og R. G. Nash (1969), Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) G. D. Beetsman, D. R. Kenney og G. Chesters (1969), Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1987), Environmental Assessment Technical Handbook, Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, s. 14 ff., FDA, Washington, DC.
- (16) R. A. McKelvey, J. P. Wright, J. L. Honegger og L. W. Warren (2002), A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing, Pest Management Science vol. 58:1161-1174.
- (17) C. Boutin, N. Elmegaard og C. Kjær (2004), Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment, Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) C. Boutin og C. A. Rogers (2000), Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases, Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) C. Boutin og J. L. Harper (1991), A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats, J. Ecol. 9:155-271.
- (20) C. Boutin, H.-B. Lee, T. E. Peart, S. P. Batchelor og R. J. Maguire (2000), Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species, Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OECD (2006), Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Series on Testing and Assessment No 54, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.
- (22) K. K. Hatzios og D. Penner (1985), Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants, Rev. Weed Sci. 1:1-63.

-
- (23) P. B. Hamill, P. B. Marriage og G. Friesen. (1977), A method for assessing herbicide performance in small plot experiments, *Weed Science* 25:386-389.
- (24) R. E. Frans og R. E. Talbert (1992), Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response, in: B. Truelove (Ed.), *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
- (26) Kapitel C.33 i dette bilag: Formeringstest — regnorme (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

Tillæg 1

Definitioner

Aktiv bestanddel (eller aktivstof) er et materiale, der er beregnet til at sikre en specifik biologisk effekt (f.eks. insektbekæmpelse, plantesygdomsbekæmpelse eller ukrudtsbekæmpelse i behandlingsområdet), kaldes også aktiv bestanddel/aktivstof af teknisk kvalitet.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Plantebeskyttelsesmidler eller pesticider er materialer med en specifik biologisk aktivitet, som bruges bevidst til at beskytte planter mod skadegørere (f.eks. svampesygdomme, insekter og konkurrerende planter).

EC_x-koncentration med x % effekt eller ER_x-mængde med x % effekt er den koncentration eller mængde, der forårsager en uønsket ændring på x % i det endepunkt for en test, der måles i forhold til kontrollen (eksempelvis ville en reduktion på 25 % eller 50 % i frøplantespining, skudvægt eller endeligt antal planter eller en stigning på 25 % eller 50 % i visuelle skader give en værdi på henholdsvis EC₂₅/ER₂₅ eller EC₅₀/ER₅₀).

Spiring er, når skuddet eller kimbladet viser sig over jordoverfladen.

Formulering er det kommercielt formulerede produkt, der indeholder den aktive bestanddel — kaldes også det endelige præparat ⁽¹⁾ eller »typical end-use product« (TEP).

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste koncentration af testkemikaliets, hvor der observeres en virkning. I denne test har LOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen og er højere end NOEC-værdien.

Planter, der ikke er målarter: De planter, der ikke tilhører målgruppen. Ved plantebeskyttelsesmidler er der sædvanligvis tale om planter uden for behandlingsområdet.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Fytotoksicitet: Skadelige afvigelser (ved måling og visuelle bedømmelse) fra planternes normale mønster for udseende og vækst som reaktion på et givet kemikalie.

Replikat er den forsøgsenhed, der repræsenterer kontrolgruppen og/eller behandlingsgruppen. I disse undersøgelser defineres potten som replikaten.

Visuel bedømmelse: Bedømmelse af visuelle skader baseret på iagttagelse af plantetæthed, vækstkraft, misdannelse, chlorose, nekrose og generelt udseende sammenlignet med en kontrol.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

⁽¹⁾ Endeligt præparat: det kommercielt tilgængelige formulerede produkt, som indeholder det aktive kemikalie (den aktive bestanddel).

Tillæg 2

Liste over arter, der historisk har været anvendt til plantetestning

Familie	Art	Generisk navn
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Gulerod
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Solsikke
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Salat
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Gul sennep
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kinakål
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Kål
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Majroe
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Havekarse
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Radise
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Sukkerroe
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Almindelig agurk
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (G. soja)	Sojabønne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Mungbønne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Havebønne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Almindelig ært
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Bukkehornsfør
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Kællingetand
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Rødkløver
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Fodervikke
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Hør
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Boghvede
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tomat

Familie	Art	Generisk navn
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Løg
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Havre
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Byg
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Almindelig rajgræs
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Ris
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Rug
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum, durra
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Hvede
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Majs

Liste over potentielle vilde arter

OECD — vilde arter, der kan anvendes til testning af toksicitet for planter.

Bemærk: Nedenstående tabel indeholder oplysninger om 52 vilde arter (henvisninger er anført i parentes for hver art). De angivne spiringshastigheder stammer fra offentliggjort litteratur og er blot angivet som generel vejledning. Individuelle erfaringer kan variere afhængigt af frøkilden og andre faktorer.

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (hvas randfrø)	A, B forstyrrede områ- der, hække, græsarealer (16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	kold stratificering (7, 14, 18, 19) modning kan være nødvendig (19) spiring hæmmes af mørke (1, 19) ingen særlig behandling (5)	POST (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (almindelig tusindfryd)	P græsarealer, agerjord, græsplæner (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (18, 19) ingen særlig be- handling (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (kornblomst)	A marker, vejkanter, åbne områder (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	ingen særlig behandling (2, 4)	POST (2, 4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (sort knopurt)	P marker, vejkanter, åbne områder (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	modning kan være nød- vendig (18, 19) spiring hæmmes af mørke (19) ingen særlig behandling (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (lægealant)	P fugtige, forstyrrede om- råder (16)	1-1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		ingen særlig behandling (4)	POST (4)	A, F	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (stivhåret borst)	P marker, vejkanter, for- styrrede områder (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (17, 18, 19) in- gen særlig behandling (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (håret solhat)	B, P forstyrrede områder (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	ingen særlig behandling (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (canadisk gyldenris)	P græsarealer, åbne områ- der (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 4)	14-21 (11)	blandes med lige dele sand, og gennemblød i 500 ppm Ga i 24 timer (11) ingen særlig be- handling (4)	POST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (almindelig brodfrø)	A marker, åbne områder (16)	25-61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		spiring kan hæmmes af mørke (1) gennemblø- des i varmt vand i 12 ti- mer (29)	PRÆ & POST (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (tornet brodfrø)	A åbne områder (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 6)		ardannelse (14) ingen særlig behandling (6)	PRÆ & POST (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (skræppe-brodfrø)	A marker, åbne områder (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		ingen særlig behandling (6, 14, 21)	PRÆ & POST (6, 21, 28, 31)	A	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (engkarse)	P marker, vejkanter, græs- splæner (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) ingen særlig behandling (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (trævelekrone)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	modning kan være nød- vendig (18) ingen særlig behandling (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (hvidmelet gåsefod)	A markkanter, forstyrrede områder (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	behandling varierer af- hængigt af frøfarve (19) dvaletilstand ved tør op- bevaring (19) spiring hæmmes af mørke (1, 18, 19) kold stratifice- ring (18) ingen særlig behandling (14, 34)	PRÆ & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (prikbladet perikon)	P marker, agerjord, åbne områder (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (1, 18, 19) ingen særlig behandling (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (vedbendpragtsnerle)	A vejkanter, åbne områder, kornmarker (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) ingen særlig behandling (6, 21)	PRÆ & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (rund fladaks)	P agerjord, græsarealer, vejkanter (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (6, 10, 14)	PRÆ & POST (6, 28, 31)	B	7

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (almindelig kællingetand)	P græsarealer, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	ardannelse (14, 19) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (18, 19) ingen særlig be- handling (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (kassia, sicklepod)	A fugtige skove (16)	23-28 9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6, 9)		frø gennemblødes i vand i 24 timer (9) ardannelse (14) frøenes levedygtighed varierer afhængigt af farve (1) ingen særlig behandling (6)	POST (6, 9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (hamp)	A alluvial jord (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		frø gennemblødes i vand i 24 timer (9) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) in- gen særlig behandling (21)	PRÆ & POST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (rødkløver)	P marker, vejkanter, ager- jord (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	ardannelse (14, 18) modning kan være nød- vendig (19) spiring ikke påvirket af strålingsin- tensitet (1, 19) ingen særlig behandling (5)	POST 5)	A, E, F	
LAM IAC E AE <i>Leonurus cardiaca</i> (almindelig hjertespan)	P åbne områder (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 4)		ingen særlig behandling (4, 14)	POST 4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (grøn mynte)	P fugtige områder (16)	2,21 4)		0 4)		ingen særlig behandling 4)	POST 4)	F	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (almindelig katteurt)	P forstyrrede områder (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		ingen særlig behandling (2, 4, 14)	POST (2, 4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (almindelig brunelle)	P agerjord, græsarealer, forstyrrede områder (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) bedre spiring med større frø (1) ingen særlig behandling (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (lægegaltetand)	P græsarealer, markkanter (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	ingen særlig behandling (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilón theophrasti</i> (kinajute)	A marker, åbne områder (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	ardannelse (14) ingen særlig behandling (5, 10, 21)	PRÆ & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (tornet sida)	A marker, vejkanter (16)	3.8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		ardannelse (14) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) in- gen særlig behandling (6, 21)	PRÆ & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (kornvalmue)	A marker, agerjord, for- styrrede områder (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	kold stratificering og ar- dannelse (1, 19, 32) ingen særlig behandling (4, 14, 29)	POST 4)	A, D, E, F, G	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (almindelig hvene)	græsplæner, græsarealer (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	spiring hæmmes af mørke (1, 17-19) ingen særlig behandling (10)	POST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (agerrævehale)	A marker, åbne områder (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	ardannelse (14) behandles med 101 mg/l KNO ₃ (14) varm stratificering (1) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (34)	PRÆ & POST (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (flyvehavre)	A dyrkede områder, åbne områder (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	ardannelse (7, 32) mørke hæmmer spiring (1) kold stratificering (1, 18) ingen særlig behandling (6, 10, 14)	PRÆ & POST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (taghejre)	A marker, vejkanter, agerjord (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		modningsperiode (1, 7, 32) spring hæmmes af lys (1) ingen særlig behandling (14)	PRÆ & POST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (almindelig kamgræs)	P marker, vejkanter, åbne områder (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (19) ingen særlig behandling (14, 29)	POST (5)	A	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (blodhirse)	A marker, græsplæner, åbne områder (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	ardannelse, kold stratifi- cering og modning (1, 7, 14, 32) behandles med 101 mg/l KNO ₃ (14) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (21)	PRÆ & POST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (almindelig hanespore)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		ardannelse (7, 32) spi- ring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) in- gen særlig behandling (3, 14, 21)	PRÆ & POST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (canadisk hundekvik)	P bredområder, forstyr- rede områder (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	ingen særlig behandling (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (engsvingel)	P marker, fugtige områder (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	ingen særlig behandling (10, 19)	POST (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (liden byg)	A græsarealer, vejkanter, åbne områder (16)	3,28 (14)				varm stratificering (1) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1)	PRÆ (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (engrottehal)	P græsarealer, agerjord, forstyrrede områder (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	spiring hæmmes af mørke (19) spiring ikke påvirket af strålingsin- tensitet (17) ingen særlig behandling (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (snerlepileurt)	A åbne områder, vejkanter (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		kold stratificering i 4-8 uger (1, 2, 4, 20, 29) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1)	PRÆ & POST (1, 2, 20, 28, 31)	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (knudet pileurt)	A fugtig jord (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) spiring hæmmes af mørke (18) kold stratifi- cering (1) ingen særlig behandling (5)	PRÆ & POST (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (pennsylvansk pileurt)	A marker, åbne områder (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		kold stratificering i 4 uger ved 0-5 °C (1, 29) spiring hæmmes af mørke (1)	PRÆ (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (ferskenpileurt)	A forstyrrede områder, agerjord (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	ardannelse, kold stratifi- cering, Ga-behandling (14) kold stratificering, modning (17-19) spi- ring hæmmes af mørke (19) ingen særlig be- handling (13)	POST (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (kruset skræppe)	P agerjord, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) mod- ning kan være nødven- dig (18) ingen særlig be- handling (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (rød arve)	A agerjord, åbne områder, forstyrrede områder (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	kold stratificering, Ga- behandling (1, 14, 18, 19, 32) spiring kræver lys (1) ingen særlig be- handling (2, 4)	POST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (bidende ranunkel)	P agerjord, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	ingen særlig behandling (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (febernellikero)	P hække, fugtige områder (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) varm stratificering (1) ingen særlig behandling (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (burrester)	A agerjord, fugtige områ- der, forstyrrede områder (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	kold stratificering (1, 18, 19) spiring ikke på- virket af strålingsintensit- et (18, 19) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (6, 14)	PRÆ & POST (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (hvid snorre)	P levende hegn, åbne om- råder (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		ingen særlig behandling (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (almindelig fingerbøl)	B, P hække, åbne områ- der (16, 19)	0,1 -0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (1, 17-19) ingen særlig behandling (4, 22-26)	POST (4, 22-26)	D, G, F	

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ⁽¹⁾ og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ⁽²⁾	Plantedybde (mm) ⁽³⁾	Tid til spiring (dage) ⁽⁴⁾	Særlige behandlinger ⁽⁵⁾	Toksicitets- test ⁽⁶⁾	Leverandør af frø ⁽⁷⁾	Andre henvis- ninger ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (storkronet ærenpris)	A agerjord, åbne områder, forstyrrede områder (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) kold stratificering (18) ingen særlig behandling (14)	PRÆ & POST (28)	A	32

⁽¹⁾ A = enårige (Annuals), B = toårige (Biennials), P = flerårige (Perennials).

⁽²⁾ Henvisning 11, 14 og 33 henviser til det forhold mellem lys (L = light) og mørke (D = darkness), der er nødvendigt for spiring. Henvisning 3, 6, 9, 10, 13 og 20 henviser til vækstbetingelser i drivhuse.

⁽³⁾ 0 mm indikerer, at frøene blev sået på jordoverfladen, eller at frøene har brug for lys for at kunne spire.

⁽⁴⁾ Det angivne antal er det antal dage, inden for hvilket en procentdel af frøene spirede i henhold til den angivne henvisning, f.eks. tre dage (50 %) spiring (henvisning 19).

⁽⁵⁾ Varigheden af modning og/eller stratificering ikke altid tilgængelig. Bortset fra krav om kuldebehandling er temperaturbetingelser ikke angivet, eftersom der er begrænset temperaturkontrol i forbindelse med testning i drivhus. De fleste frø spirer ved de almindelige temperaturudsving, der er i drivhuse.

⁽⁶⁾ Indikerer, at arter blev anvendt i en test af herbiciders toksicitet for planter før (PRÆ) og/eller efter (POST) spiring.

⁽⁷⁾ Et eller flere eksempler på kommercielle leverandører af frø.

⁽⁸⁾ To alternative anvendte henvisninger.

Angivne leverandører af frø

Leverandør-ID	Leverandørinformation
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344-4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586-3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431-7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873-3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 (0)1256 6022668 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274-7333 www.thompson-morgan.com

ANGIVNE KILDER:

- (1) C. C. Baskin og J. M. Baskin (1998), Seeds, Academic Press, Toronto.
- (2) L. G. Blackburn og C. Boutin (2003), Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®), Ecotoxicology, 12:271-285.
- (3) C. Boutin, H.-B. Lee, T. Peart, P. S. Batchelor og R. J. Maguire (2000), Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species, Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.
- (4) C. Boutin, N. Elmegaard og C. Kjær (2004), Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment, Ecotoxicology, 13:349-369.
- (5) V. Breeze, G. Thomas og R. Butler (1992), Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides, Annals of Applied Biology, 121:669-677.
- (6) R. A. Brown og D. Farmer (1991), Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides, in: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang og M. A. Lewis, eds., American Society for Testing & Materials, Philadelphia, s. 197-208.

- (7) D. D. Buhler og M. L. Hoffman (1999), *Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants*, Weed Science Society of America, K. Lawrence.
- (8) A. R. Clapham, T. G. Tutin og E. F. Warburg (1981), *Excursion flora of the British Isles*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- (9) P. A. Clay og J. L. Griffin (2000), Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications, *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) J. F. H. Cole og L. Canning (1993), Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants, *BCPC — Weeds*, s. 151-156.
- (11) M. Fiely (Ernst Conservation Seeds) (2004), personlig samtale (www.ernstseed.com).
- (12) J. S. Fletcher, F. L. Johnson og J. C. McFarlane (1990), Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment, *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) J. S. Fletcher, T. G. Pfleeger, H. C. Ratsch og R. Hayes (1996), Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants, *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) S. Flynn, R. M. Turner og J. B. Dickie (2004), *Seed Information Database* (release 6.0, Oct 2004), Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid).
- (15) J. Franzaring, C. Kempenaar og L. J. M. van der Eerden (2001), Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species, *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) H. A. Gleason og A. Cronquist (1991), *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada*, 2nd ed., New York Botanical Garden, Bronx, NY, USA.
- (17) J. P. Grime (1981), The role of seed dormancy in vegetation dynamics, *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) J. P. Grime, G. Mason, A. V. Curtis, J. Rodman, S. R. Band, M. A. G. Mowforth, A. M. Neal og S. Shaw (1981), A comparative study of germination characteristics in a local flora, *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) J. P. Grime, J. G. Hodgson og R. Hunt (1988), *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*, Unwin Hyman Ltd., London.
- (20) C. Kjær (1994), Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.), *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) T. E. Klingaman, C. A. King og L. R. Oliver (1992), Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity, *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) R. H. Marrs, C. T. Williams, A. J. Frost og R. A. Plant 1989, Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest, *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) R. H. Marrs, A. J. Frost og R. A. Plant (1991), Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure, *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) R. H. Marrs, A. J. Frost og R. A. Plant (1991), Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms, *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) R. H. Marrs, A. J. Frost, R. A. Plant og P. Lunnis (1993), Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift, *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

-
- (26) R. H. Marrs og A. J. Frost (1997), A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities, *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
- (27) E. J. P. Marshall og J. E. Bernie (1985), Herbicide effects on field margin flora, *BCPC — Weeds*, s. 1021-1028.
- (28) R. A. McKelvey, J. P. Wright og J. L. Honegger (2002), A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing, *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
- (29) S. Morton (Herbiseed) (2004), personlig samtale (<http://www.herbiseed.com>).
- (30) USDA, NRCS (2004), The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>), National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- (31) USEPA (1999), One-Liner Database, [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
- (32) R. H. Webster (1979), Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes, Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford, England.
- (33) A. L. White og C. Boutin (National Wildlife Research Centre, Environment Canada) (2004), personlig samtale.
- (34) P. Zwerger og W. Pestemer (2000), Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test, *Z. PflKrankh, PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.
-

Tillæg 4

Eksempler på passende vækstbetingelser for visse plantearter

Følgende betingelser har vist sig egnet til ti plantearter og kan bruges som retningslinjer for test i vækstkamre — også med visse andre arter:

Kuldioxidkoncentration: 350 ± 50 ppm

Relativ fugtighed: 70 ± 5 % i lyse perioder og 90 ± 5 % i mørke perioder

Temperatur: $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ om dagen, $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ om natten

Lysperiode: 16 timers lys/8 timers mørke, idet der forudsættes en gennemsnitlig bølgelængde på 400-700 nm

Lys: lysstyrke på $350 \pm 50\text{ }\mu\text{E/m}^2/\text{s}$, målt øverst i kammeret.

Plantearterne er følgende:

- tomat (*Solanum lycopersicon*)
 - agurk (*Cucumis sativus*)
 - havesalat (*Lactuca sativa*)
 - sojabønne (*Glycine max*)
 - hvidkål (*Brassica oleracea* var. *capitata*)
 - gulerod (*Daucus carota*)
 - almindelig havre (*Avena sativa*)
 - almindeligt rajgræs (*Lolium perenne* L.)
 - majs (*Zea mays*)
 - løg (*Allium cepa*).
-

C.32. FORMERINGSTEST — ENCHYTRAEIDER**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 220 (2004). Den er beregnet til vurdering af kemikaliers virkninger på reproduktionen hos enchytraeider, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, i jord. Den er hovedsagelig baseret på en metode, der er udviklet af Umweltbundesamt, Tyskland (1), og som er blevet ringtestet (2). Andre metoder til testning af kemikaliers toksicitet for enchytraeider og regnorme er også taget i betragtning (3)(4)(5)(6)(7)(8).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Jordboende annelider af slægten *Enchytraeus* er økologisk relevante arter til økotoksikologisk testning. Enchytraeider forekommer ganske vist ofte i jord med regnorme, men de er også ofte hyppigt forekommende i jord uden regnorme. Enchytraeider kan både bruges i laboratorietest og i tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg. Fra et praktisk synspunkt er mange *Enchytraeus*-arter lette at håndtere og avle, og deres generationstid er betydeligt kortere end regnormens. Varigheden af en formeringstest med enchytraeider er derfor kun 4-6 uger, mens den for regnorme (*Eisenia fetida*) er otte uger.
3. Grundlæggende oplysninger om enchytraeiders økologi og økotoksikologi i jordmiljøet kan findes i (9)(10)(11)(12).

PRINCIP FOR TESTEN

4. Voksne enchytraeider udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliets blandet i syntetisk jord. Testen kan inddeles i to trin: a) en test til bestemmelse af dosisinterval, såfremt der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger, hvori dødeligheden er det primære endepunkt, der vurderes efter to ugers eksponering, og b) en endelig formeringstest, hvor forældredyrets samlede antal unger og forældredyrets overlevelse vurderes. Den endelige tests varighed er seks uger. Efter de første tre uger fjernes de voksne orme, og morfologiske ændringer registreres. Efter yderligere tre uger tælles ungerne, der klækkes af de kokoner, de voksne orme har frembragt. Reproduktionen for de dyr, der blev eksponeret for testkemikaliets, sammenlignes med reproduktionen for kontrollen/kontrollerne for at fastlægge i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) ved at bruge en regressionsmodel til at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage x % reduktion i reproduktionen. EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker (f.eks. EC_{10} , EC_{50}), således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

5. Testkemikaliet vandopløselighed, $\log K_{ow}$, fordelingskoefficient mellem jord og vand (f.eks. kapitel C.18 eller C.19 i dette bilag) og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliet skæbne i jord, såsom fotolyse- og hydrolysehastighed, er ønskelige.
6. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilførselsmåden for testkemikaliets variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-/vandfordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

TESTENS VALIDITET

7. Hvis en test skal være valid, skal følgende resultatkrav opfyldes af kontrollerne:
 - Dødeligheden blandt voksne orme må ikke overstige 20 % ved afslutningen af testen til bestemmelse af dosisinterval og efter de første tre uger af formeringstesten.
 - Under forudsætning af at der blev brugt ti voksne orme pr. beholder ved opstilling af testen, skal der gennemsnitligt mindst være frembragt 25 unger pr. beholder ved testens afslutning.
 - Variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal unger må ikke overstige 50 % ved formeringstestens afslutning.

Hvis en test ikke opfylder ovenstående validitetskriterier, skal den afsluttes, medmindre der kan fremlægges en begrundelse for at fortsætte testen. Begrundelsen skal fremgå af testrapporten.

REFERENCEKEMIKALIE

8. Et referencekemikalie bør enten testes med jævne mellemrum eller eventuelt indgå i hver test, for at kontrollere at testorganismernes respons ikke har ændret sig signifikant over tid. Et egnet referencekemikalie er carbendazim, som har vist sig at påvirke enchytraeiders overlevelse og formeringsevne (13)(14), men der kan også anvendes andre kemikalier, hvis toksicitetsdata er velkendte. En formulering af carbendazim, som er kendt under handelsnavnet Derosal™, og som leveres af AgrEvo Company (Frankfurt, Tyskland) og indeholder 360 g/l (32,18 %) aktiv bestanddel, blev brugt i en ringtest (2). Den EC₅₀-værdi for formering, der blev bestemt i ringtesten, lå i området 1,2 ± 0,8 mg aktiv bestanddel/kg tørmasse (2). Hvis en positiv toksisk standard er inkluderet i testserien, anvendes der en koncentration, og antallet af replikater skal være det samme som i kontrollerne. Hvis der anvendes carbendazim, anbefales test af 1,2 mg aktivt stof/kg tørvægt (testet som en flydende formulering).

BESKRIVELSE AF TESTEN

Udstyr

9. Testbeholderne skal være udført helt i glas eller et andet kemisk inert materiale. Glas (f.eks. volumen: 0,20-0,25 liter; diameter: ≈ 6 cm) er egnede. Beholderne bør have gennemsigtige låg (f.eks. glas eller polyethylen), der er designet til at reducere vandfordampning, samtidig med at der kan ske en gasudveksling mellem jord og atmosfære. Lågene bør være gennemsigtige for at sikre lysgennemtrængelighed.
10. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:
- tørreskab
 - stereomikroskop
 - pH-meter og fotometer
 - egnede nøjagtige vægte
 - passende udstyr til temperaturkontrol
 - passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne har låg)
 - inkubator eller lille rum med klimaanlæg
 - pincetter, kroge eller spiraler
 - fremkalderkar.

Klargøring af den syntetiske jord

11. Den syntetiske jord, der bruges i testen (5)(7), har følgende sammensætning (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):
- 10 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel); det anbefales at kontrollere, at jord klargjort med et frisk parti sphagnum er egnet til dyrkning af ormene, inden den bruges i en test
 - 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

- ca. 0,3-1,0 % calciumcarbonat (CaCO_3 , pulveriset, analysekvalitet) for at få en pH på $6,0 \pm 0,5$. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art
- ca. 70 % lufttørret kvartssand (afhængigt af den nødvendige mængde CaCO_3), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm .

Det anbefales at påvise egnetheden af syntetisk jord til at dyrke ormene og til at opfylde testvaliditetskriterierne, før jorden anvendes i en endelig test. Det anbefales især at foretage en sådan kontrol, for at sikre at udførelsen af testen ikke kompromitteres, hvis den syntetiske jords organiske kulstofindhold reduceres, f.eks. ved at sænke sphagnumindholdet til 4-5 % og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliets adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for ormene forøges. Det er blevet påvist, at *Enchytraeus albidus* kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold end det nævnte (f.eks. 2,7 %) (15), og erfaringer — omend begrænsede — viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv.

Bemærk: Når der bruges naturlig jord i supplerende test (f.eks. på efterfølgende trin), skal det også dokumenteres, at jorden er egnet, og at validitetskriterierne er opfyldt.

12. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblender). Dette gøres, mindst en uge inden testen påbegyndes. Den blandede jord opbevares i to dage for at ækvilibrere den/stabilisere surhedsgraden. Til bestemmelse af pH anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid (CaCl_2) i forholdet 1:5 (se (16) og tillæg 3). Hvis jorden er mere syreholdig end det krævede område (se punkt 11), kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde CaCO_3 . Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af mere af blandingen i henhold til punkt 11, men uden CaCO_3 .
13. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2. En eller to dage før testens start fugtes den tørre syntetiske jord på forhånd ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Ved testens start opdeles den fugtede jord i portioner svarende til antallet af testkoncentrationer (og eventuelt referencekemikalie) og kontroller, der benyttes til testen. Vandindholdet justeres til 40-60 % af den maksimale vandholdende evne ved tilsætning af testkemikalieopløsningen og/eller ved tilsætning af destilleret eller deioniseret vand (se punkt 19-21). Vandindholdet bestemmes ved testens begyndelse og slutning (ved tørring til konstant vægt ved 105 °C) og skal ligge inden for det optimale område for ormenes overlevelse. Jordens vandindhold kan bestemmes omtrentlig ved forsigtigt at presse jorden i hånden. Hvis vandindholdet er korrekt, viser små vanddråber sig mellem fingrene.

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

14. Den anbefalede testart er *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (hvid kompostorm), som tilhører familien Enchytraeidae (orden: Oligochaeta, række: Annelida). *E. albidus* er en af de største arter af enchytraeider, og der er registreret individer på op til 35 mm i længden (17)(18). *E. albidus* findes i hele verden på marine, limniske og terrestriske levesteder, primært i organiske materialer under nedbrydning (tang og kompost) og sjældent i engområder (9). Dens brede økologiske tolerance og visse morfologiske variationer kan tyde på, at arten omfatter forskellige racer.
15. *Enchytraeus albidus* sælges som fiskefoder. Det bør undersøges, om bestanden er kontamineret af andre, normalt mindre arter (1)(19). Hvis kontaminering forekommer, bør alle orme skylles med vand i en petriskål. Store voksne individer af *Enchytraeus albidus* udvælges derefter (ved hjælp af et stereomikroskop) for at starte en ny bestand. Alle andre orme kasseres. *E. albidus* kan let dyrkes i en lang række organiske materialer (se tillæg 4). Ormens livscyklus er kort, da den når sin modenhed mellem 33 dage (ved 18 °C) og 74 dage (ved 12 °C) (1). Kun bestande, der har været i laboratoriet i mindst fem uger (en generation) uden problemer, bør anvendes i en test.

16. Andre arter af Enchytraeus-slægten kan også anvendes, f.eks. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 eller *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (se tillæg 5). Hvis andre arter af Enchytraeus anvendes, skal de identificeres klart, og begrundelsen for valget af art skal anføres i rapporten.
17. De dyr, der bruges til test, er voksne orme. De skal have æg (hvide pletter) i bælteområdet, og de skal have omtrent samme størrelse (ca. 1 cm i længden). Synkronisering af dyrkningskulturen er ikke nødvendig.
18. Hvis enchytraeiderne ikke dyrkes i den samme jordtype og under samme betingelser (herunder fodring) som for den endelige test, skal de akklimatiseres i mindst 24 timer og op til tre dage. Et større antal voksne individer end det, der er nødvendigt for udførelsen af testen, akklimatiseres for at give mulighed for afvisning af skadede individer eller individer, der er uegnede af andre årsager. Ved afslutningen af akklimatiseringsperioden udvælges kun orme med æg, som ikke udviser unormal adfærd (f.eks. forsøger at slippe væk fra jorden), til testen. Ormene udtages omhyggeligt med pincet, krog eller spiral og anbringes i en petriskål, der indeholder en lille mængde ferskvand. Kunstigt fremstillet ferskvand, jf. kapitel C.20 i dette bilag (*Daphnia magna* formeringstest), foretrækkes til dette formål, eftersom deioniseret eller demineraliseret vand eller ledningsvand kan være skadeligt for ormene. Ormene undersøges i et stereomikroskop, og eventuelle orme uden æg frasorteres. Eventuelle mider eller springhaler, der måtte have inficeret kulturerne, frasorteres omhyggeligt. Sunde orme, der ikke bruges til testen, returneres til stamkulturen.

Klargøring af testkoncentrationer

Vandopløseligt testkemikalie

19. En opløsning af testkemikaliets klarlægges i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Det anbefales at bruge en passende mængde vand for at opnå det nødvendige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (se punkt 13). Hver opløsning af testkemikaliets blandes grundigt med et parti forhåndsfugtet jord, før det tilsættes til testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliets opløses i det mindst mulige volumen af et egnet bærestof (f.eks. acetone). Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Bærestoffet sprøjtes på eller blandes med en lille mængde, f.eks. 2,5 g, fint kvartssand. Bærestoffet fjernes ved afdampning i et stinkskab i mindst en time. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding overføres til testbeholderne.
21. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes 2,5 g fintformalet kvartssand pr. testbeholder med testkemikaliets for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der klarlægges også en passende kontrolgruppe.
22. Kemikalier bør normalt ikke testes ved koncentrationer på over 1 000 mg/kg tørmasse jord. Det kan dog i overensstemmelse med en specifik tests mål være nødvendigt at teste ved højere koncentrationer.

UDFØRELSE AF TESTEN

Testgrupper og kontrolgrupper

23. For hver testkoncentration anbringes en mængde testjord svarende til 20 g tørvægt i testbeholderen (se punkt 19-20). Kontroller uden testkemikaliets klarlægges også. Hver beholder tilsættes foder i overensstemmelse med fremgangsmåden i punkt 29. Ormene fordeles vilkårligt, således at der er ti i hver testbeholder.

Ormene overføres forsigtigt til hver testbeholder og placeres på jordoverfladen ved hjælp af f.eks. en pincet, en krog eller en spiral. Antallet af replikater for testkoncentrationer og for kontroller afhænger af det anvendte testdesign (se punkt 34). Testbeholderne placeres vilkårligt i testinkubatoren, og disse placeringer randomiseres på ny en gang om ugen.

24. Hvis der bruges et bærestof til tilførsel af testkemikaliet, testes en kontrolserie indeholdende kvartssand påsprøjtet eller iblandet opløsningsmidlet ud over testserierne. Koncentrationen med opløsnings- eller dispergeringsmiddel skal være den samme som den, der bruges i testbeholderne med testkemikaliet. En kontrolserie indeholdende kvartssand (2,5 g pr. beholder) bør testes for kemikalier, der kræver administration i overensstemmelse med fremgangsmåden i punkt 21.

Testbetingelser

25. Testtemperaturen er $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. For at sikre at ormene ikke forlader jorden, udføres testen under kontrollerede lys-/mørkecykluser (helst 16 timers lys og 8 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholderens område.
26. For at kontrollere jordfugtigheden vejes beholderne i begyndelsen af testen og efterfølgende en gang om ugen. Vægttab erstattes ved tilsætning af en passende mængde deioniseret vand. Det skal bemærkes, at vandtabet kan reduceres ved at opretholde en høj luftfugtighed ($> 80\%$) i testinkubatoren.
27. Fugtindholdet og pH måles i begyndelsen og slutningen af både den indledende test og den endelige test. Målinger foretages i kontrollen og behandlede (alle koncentrationer) jordprøver, der er klargjort og opbevaret på samme måde som testkulturerne, men uden orme. Foder tilsættes kun til disse jordprøver i begyndelsen af testen for at fremme mikrobiel aktivitet. Den tilsatte mængde foder skal være den samme som den, der tilsættes til testkulturerne. Det er ikke nødvendigt at tilsætte yderligere foder til beholderne under testen.

Fodring

28. Der kan bruges foder, som er i stand til at opretholde populationen af enchytraeider. Valsede havregryn, om muligt autoklaveret inden brug for at forebygge mikrobiel kontaminering (opvarmning er også hensigtsmæssig), har vist sig at være egnet foder.
29. Foder gives først ved at blande 50 mg formalede valsede havregryn i jorden i hver beholder, inden ormene tilsættes. Derefter tilsættes der foder ugentligt frem til dag 21. Der tilsættes ikke foder på dag 28, da de voksne individer er blevet fjernet på dette trin, og deres afkom har brug for forholdsvis lidt supplerende foder efter dette tidspunkt. Fodring under testen omfatter 25 mg formalede valsede havregryn pr. beholder, som forsigtigt anbringes på jordoverfladen for at undgå at skade ormene. For at undgå svampevækst skal havreflagerne begraves i jorden ved at dække dem med små mængder jord. Hvis foder ikke bliver spist, skal rationen reduceres.

Design af testen til bestemmelse af dosisinterval

30. Når det er nødvendigt, udføres der en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg (tørvægt af jord). En replikat pr. behandling og kontrol er tilstrækkelig.
31. Varigheden af den indledende test er to uger. Ved afslutningen af testen vurderes dødeligheden for ormene. En orm registreres som død, hvis den ikke reagerer på en mekanisk påvirkning af bagenden. Andre oplysninger end dødelighed kan også være afgørende for fastlæggelsen af koncentrationsområdet i den endelige test. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres derfor også sammen med tilstedeværelsen af eventuelt afkom. Sidstnævnte kan bestemmes ved anvendelse af farvningsfremgangsmåden i tillæg 6.

32. LC_{50} kan bestemmes omtrentligt ved at beregne det geometriske gennemsnit af dødelighedsdataene. Ved fastlæggelsen af koncentrationsområdet for den endelige test antages virkningerne på reproduktionen at være lavere end LC_{50} med højst en faktor 10. Der er dog tale om en empirisk sammenhæng, som ikke nødvendigvis er den samme i alle specifikke tilfælde. Yderligere observationer foretaget i den indledende test, såsom forekomsten af afkom, kan bidrage til at præcisere det koncentrationsområde for testkemikallet, der skal bruges til den endelige test.
33. Med henblik på nøjagtig bestemmelse af LC_{50} anbefales det at udføre testen med mindst fire replikater af hver af testkemikaliekoncentrationerne og et tilstrækkeligt antal koncentrationer til at give mindst fire statistisk signifikante forskellige gennemsnitsresponses ved disse koncentrationer. Der bruges et tilsvarende antal koncentrationer og replikater til eventuelle kontroller.

Design af den endelige formeringstest

34. Der foreslås tre design på grundlag af anbefalingerne som følge af en ringtest (2):
- For at fastlægge NOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.
 - For at bestemme EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) skal der testes mindst fem koncentrationer, og EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation. Der anbefales mindst fire replikater for hver testkoncentration og fire kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.
 - En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og EC_x . Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.
35. Der bruges ti voksne orme pr. testbeholder (se punkt 23). Foder tilsættes ved begyndelsen af testen og herefter en gang om ugen (se punkt 29) frem til og med dag 21. På dag 21 undersøges jordprøverne omhyggeligt med hænderne, levende voksne orme observeres og tælles, og ændringer i adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres. Alle voksne orme fjernes derefter fra testbeholderne og testjorden. Testjord, der indeholder eventuelle kokoner, der måtte være frembragt, inkuberes i yderligere tre uger under samme testbetingelser, bortset fra at fodring kun finder sted på dag 35 (25 mg formalede valsede havregryn pr. beholder).
36. Efter seks uger tælles de nyudklækkede orme. Denne metode, som er baseret på Rose Bengal-farvning (se tillæg 6), anbefales, men andre vådekstraktions- og vådflotationsteknikker (uden varme) (se tillæg 6) har også vist sig at være egnede (4)(10)(11)(20). Bengal Rose-farvning anbefales, fordi vådekstraktion fra et jordsubstrat kan hæmmes af turbiditet forårsaget af opslæmmede lerpartikler.

Grænsetest

37. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til bestemmelse af dosisinterval (dvs. 1 000 mg/kg), kan formeringstesten udføres som en grænsetest med 1 000 mg/kg, for at påvise at NOEC for formering er større end denne værdi.

Resume og tidsplan for testen

38. De enkelte trin i testen kan opsummeres som følger:

Tidspunkt	Test til bestemmelse af dosisinterval	Endelig test
Dag – 7 eller tidligere	— Klargør syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele)	— Klargør syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele)
Dag – 5	— Kontroller den syntetiske jords pH — Mål jordens maksimale vandholdende evne	— Kontroller den syntetiske jords pH — Mål jordens maksimale vandholdende evne
Dag – 5 til – 3	— Sorter orme med henblik på akklimatisering	— Sorter orme med henblik på akklimatisering
Dag – 3 til 0	— Akklimatiser orme i mindst 24 timer	— Akklimatiser orme i mindst 24 timer
Dag – 1	— Fugt den syntetiske jord, og fordel den i partier	— Fugt den syntetiske jord, og fordel den i partier
Dag 0	— Klargør stamopløsninger — Tilsæt testkemikalie — Afvej testsubstrat i testbeholdere — Ibland foder — Tilsæt orme — Mål jordens pH og fugtindhold	— Klargør stamopløsninger — Tilsæt testkemikalie — Afvej testsubstrat i testbeholdere — Ibland foder — Tilsæt orme — Mål jordens pH og fugtindhold
Dag 7	— Kontroller jordens fugtindhold	— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 14	— Bestem dødelighed for voksne individer — Bestem antal unger — Mål jordens pH og fugtindhold	— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 21		— Observer de voksne individers adfærd — Fjern voksne individer — Bestem dødelighed for voksne individer — Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 28		— Kontroller jordens fugtindhold — Ingen fodring

Tidspunkt	Test til bestemmelse af dosisinterval	Endelig test
Dag 35		— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 42		— Tæl unger — Mål jordens pH og fugtindhold

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

39. Tillæg 7 indeholder en oversigt, men testmetoden giver ingen endelig statistisk vejledning i analyse af testresultaterne.
40. I testen til bestemmelse af dosisinterval er det primære endepunkt dødelighed. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres dog også sammen med tilstedeværelsen af eventuelle unger. Der bruges normalt probabilistisk analyse (21) eller logistisk regression til at bestemme LC_{50} . I tilfælde hvor denne analysemetode er uegnet (f.eks. hvis der er færre end tre koncentrationer med delvis dødelighed) kan der bruges alternative metoder. Disse metoder kan omfatte glidende gennemsnit (22), Trimmed Spearman-Kärber-metoden (23) eller simpel interpolation (f.eks. geometrisk gennemsnit af LC_0 og LC_{100} som beregnet ved kvadratroden af LC_0 ganget med LC_{100}).
41. I den endelige test er endepunktet for testen frugtbarhed (dvs. antal unger). Som i testen til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade dog anføres i den endelige rapport. I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit og standardafvigelsen pr. behandling og pr. kontrol for at beregne reproduktionen.
42. Hvis der er foretaget en variansanalyse, kan standardafvigelsen, s , og frihedsgraderne, df , erstattes af henholdsvis det samlede variansestimater fra variansanalysen og frihedsgraderne herfra — forudsat at variansen ikke afhænger af koncentrationen. I dette tilfælde bruges kontrollernes og behandlingernes individuelle varianser. Disse værdier beregnes normalt med kommerciel statistisk software, der bruger resultater pr. beholder som replikater. Hvis det skønnes mere hensigtsmæssigt at samle data for de negative kontroller og opløsningsmiddelkontrollerne end at teste dem hver for sig, skal de testes, for at konstatere at de ikke er signifikant forskellige (punkt 45 og tillæg 7 indeholder beskrivelser af egnede test).
43. Yderligere statistisk testning og følgeslutning afhænger af, hvorvidt replikativ værdierne er normalt fordelt og er homogene med hensyn til varians.

Beregning af NOEC

44. Anvendelse af stærke statistiske test foretrækkes. Der bør bruges oplysninger fra f.eks. tidligere erfaring med ringtest eller andre historiske oplysninger om, hvorvidt data er nogenlunde normalt fordelt. Varianshomogenitet (homoskedasitet) er mere afgørende. Erfaringer viser, at variansen ofte stiger med stigende gennemsnit. I disse tilfælde kan transformation af data medføre homoskedasitet. En sådan transformation bør dog være baseret på erfaring med historiske data snarere end på data, der undersøges. Med homogene data udføres flere t-test, såsom Williams' test ($\alpha = 0,05$, ensidet) (24)(25) eller i visse tilfælde Dunnetts test (26)(27). Det skal bemærkes, at t-værdierne i tabellen — i tilfælde af ulige replikation — skal korrigeres i henhold til Dunnett og Williams. Nogle gange stiger/falder responserne ikke regelmæssigt på grund af stor variation. I dette tilfælde, hvor der er tale om en kraftig afvigelse fra monotoni, er Dunnetts test mere velegnet. Hvis der er afvigelser fra homoskedasitet, kan det være fornuftigt at undersøge mulige virkninger på varians nærmere, for at beslutte om

der kan bruges t-test uden at miste betydelig styrke (28). Alternativt kan der bruges flere U-test, f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm (29), eller når dataene udviser heteroskedasticitet, men ellers svarer til et underliggende monotont dosis/respons-forhold, en anden ikke-parametrisk test [f.eks. Jonckheere-Terpstra (30)(31) eller Shirley (32)(33)], som generelt ville være at foretrække frem for t-test justeret for forskel i varians (se også figuren i tillæg 7).

45. Er der udført en grænsetest, og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan den parvise Student-t-test bruges eller alternativt Mann-Whitney-U-testen (29).

Beregning af EC_x

46. For at beregne enhver EC_x -værdi bruges middelværdierne pr. behandling til regressionsanalyse (lineær eller ikke-lineær), når der er opnået et passende dosis/respons-forhold. For ormenes vækst som en kontinuerlig respons kan EC_x -værdier estimeres ved hjælp af passende regressionsanalyse (35). Blandt egnede forhold for kvantale data (dødelighed/overlevelse) og afkom er normale sigmoidforhold, logistiske forhold eller Weibull-forhold, som omfatter to til fire parametre, hvoraf nogle også kan modellere hormetiske responser. Hvis et dosis/respons-forhold blev bestemt ved lineær regressionsanalyse, bør en signifikant r^2 (determinationskoefficient) og/eller hældning findes ved regressionsanalyse, inden EC_x bestemmes ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den ligning, der er fundet ved regressionsanalyse. 95 % konfidensgrænser beregnes ifølge Fieller (nævnt i Finney (21)) eller andre moderne passende metoder.
47. Alternativt modelleres responsen som en procentdel eller andel af modelparametre, hvilket fortolkes som kontrollernes gennemsnitsrespons. I disse tilfælde kan den normale (logistiske, Weibull-) sigmoidkurve ofte let tilpasses til resultaterne ved hjælp af den probabilistiske regressionsmetode (21). I disse tilfælde skal vægtningsfunktionen justeres for metrisk respons, jf. Christensen (36). Hvis der er konstateret hormese, bør den probabilistiske analyse erstattes af en logistisk funktion med fire parametre eller Weibull-funktion tilpasset med den ikke-lineære regressionsmetode (36). Hvis et passende dosis/respons-forhold ikke kan tilpasses til dataene, kan der bruges andre metoder til at bestemme EC_x , og værdiens konfidensgrænser, f.eks. glidende gennemsnit i henhold til Thompson (22) og Trimmed Spearman-Kärber-metoden (23).

TESTRAPPORT

48. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber og, når det er relevant, relevante fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. opløselighed i vand, damptryk)
- kemisk identifikation af testkemikallet ifølge IUPAC-nomenklaturen, CAS-nummer, parti, batch, strukturformel og renhed
- prøvens udløbsdato.

Testede arter:

- anvendte testdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser.

Testbetingelser:

- bestanddele og klargøring af den syntetiske jord
- tilsætningsmetode for testkemikallet
- beskrivelse af testbetingelserne, herunder temperatur, fugtindhold, pH osv.
- fuldstændig beskrivelse af forsøgsdesign og fremgangsmåder.

Testresultater:

- dødelighed for voksne orme efter to uger og antal unger ved afslutningen af testen til bestemmelse af dosisinterval
- dødelighed for voksne orme efter tre ugers eksponering og fuld fortegnelse over afkom ved afslutningen af den endelige test
- eventuelle observerede fysiske eller patologiske symptomer og adfærdsændringer hos testorganismerne
- LC₅₀, NOEC og/eller EC_x (f.eks. EC₅₀, EC₁₀) for formering, hvis nogle af værdierne er udtrykt med konfidensintervaller, og en graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning heraf, samt alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

Afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

- (1) J. Römbke (1989), Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen, Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) J. Römbke og T. Moser (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99, s. 150 + s. 223 ff.
- (3) W. Westheide og D. Bethge-Beilfuss (1991), The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, in: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects, Ed.: G. Esser og D. Overdieck, s. 497-508. Amsterdam Elsevier,
- (4) E. Dirven-Van Breemen, R. Baerselmann og J. Notenboom (1994), Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek, RIVM Rapport Nr. 719102025. s. 46 ff.
- (5) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (6) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1, ISO, Genève.
- (7) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.
- (8) S. Rundgren og A. K. Augustsson (1998), Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877), in: H. Løkke og C. A. M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests, John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) K. Kasprzak (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, Pedobiologia 23, 217-232.
- (10) J. Römbke (1995), Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 7, 246-249.
- (11) W. Dunger og H. J. Fiedler (1997), Methoden der Bodenbiologie, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) W. A. M. Didden (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, Pedobiologia 37, 2-29.
- (13) H. Becker (1991), Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung, UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 3, 19-24.
- (14) J. Römbke og A. Federsmidt (1995), Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) J. Römbke, F. Riepert og R. Achazi (2000), Enchytraeen als Testorganismen, in: Toxikologische Beurteilung von Böden. S. Heiden, R. Erb, W. Dott og A. Eisentraeger (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

-
- (17) A. W. Bell (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*, Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- (18) C. O. Nielsen og B. Christensen (1959), The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species, Natura Jutlandica 8-9, 1-160.
- (19) V. Bouguenec og N. Giani (1987), Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*, Ann. Limnol. 23, 9-22.
- (20) J. Korinkova og J. Sigmund (1968), The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (21) D. J. Finney (1971), Probit Analysis (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.
- (22) D. J. Finney (1978), Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (24) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.
- (25) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.
- (26) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (27) C. W. Dunnett (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control, Biometrics 20, 482-491.
- (28) N. van der Hoeven (1998), Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?, Ecotoxicology 7: 355-361.
- (29) S. Holm (1979), A simple sequentially rejective multiple test procedure, Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (30) A. R. Jonckheere (1954), A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (31) T. J. Terpstra (1952), The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (32) E. A. Shirley (1979), The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (33) D. A. Williams (1986), A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (34) R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research, 2nd edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- (35) E. R. Christensen (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18, 213-221.
- (36) P. H. Van Ewijk og J. A. Hoekstra (1993), Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present, Ecotox, Environ. Safety 25, 25-32.
-

Tillæg 1

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

EC_x (effekt-koncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. I denne test udtrykkes effekt-koncentrationerne som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC₀ (ikke-dødelig koncentration) er den koncentration af et testkemikalie, der ikke dræber nogen af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC₅₀ (dødelig koncentration 50 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 50 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₅₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC₁₀₀ (dødelig koncentration 100 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 100 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₁₀₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrollen har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$). I denne test udtrykkes LOEC som en masse testkemikalie pr. tørmasse testjord. Alle testkoncentrationer over LOEC bør normalt udvise en effekt, der er statistisk forskellig fra kontrollen. Eventuelle afvigelser fra ovenstående i forbindelse med identifikation af LOEC skal begrundes i testrapporten.

NOEC (nuleffekt-koncentration, No Observed Effect Concentration) er den højeste testkemikaliekoncentration umiddelbart under LOEC, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Reproduktionsrate er det gennemsnitlige antal unger, der er produceret pr. antal voksne individer i løbet af testperioden.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Tillæg 2

Bestemmelse af den maksimale vandholdende evne**Bestemmelse af den syntetiske jords vandholdende evne**

Følgende metode har vist sig at være hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2.

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet anordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, og røret placeres herefter — efter påfyldning af vand — på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintformalet kvartssand i en lukket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

KILDER:

ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.

*Tillæg 3***Bestemmelse af jordens pH**

Følgende metode til bestemmelse af en jordprøves pH er baseret på beskrivelsen i ISO 10390 (Soil Quality — Determination of pH).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sin mængde af enten 1 M kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid (CaCl₂) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes derefter grundigt i fem minutter. Efter omrystning henstår suspensionen i mindst to timer, men ikke over 24 timer. Væskefasens pH måles herefter ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

KILDER:

ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

Tillæg 4

Dyrkningsbetingelser for *Enchytraeus Sp.*

Enchytraeider af arten *Enchytraeus albidus* (og andre *Enchytraeus*-arter) kan dyrkes i store plastkasser (f.eks. 30 × 60 × 10 cm) fyldt med en 1:1 blanding af syntetisk jord og naturlig, uforurenet havejord. Kompostmateriale skal undgås, da det kan indeholde toksiske kemikalier, f.eks. tungmetaller. Fauna fjernes fra jorden inden brug (f.eks. ved dybfrysning). Et substrat, som udelukkende består af syntetisk jord, kan også bruges, men reproduktionen kan være lavere end den, der opnås med blandet jordsubstrat. Det substrat, der bruges til dyrkning, skal have en pH på $6,0 \pm 0,5$.

Kulturen opbevares i mørke ved en temperatur på $15-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Temperaturer på over 23 °C skal undgås. Jorden bør være fugtig, men ikke våd. Det korrekte fugtindhold i jorden er opnået, når små vanddråber viser sig mellem fingrene, når jorden presses forsigtigt sammen. Iltfattige betingelser skal undgås, ved at sikre at låg på dyrknings-beholdere tillader passende gasudveksling med atmosfæren. Jorden skal brydes omhyggeligt hver uge for at fremme beluftning.

Ormene kan fodres med valsede havregryn. Havregrynene opbevares i lukkede beholdere og autoklaveres eller opvarmes inden brug for at undgå infektion med melmider (f.eks. *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) eller rovmider (f.eks. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Efter varmebehandling formales foderet, så det nemt kan strøs ud på jordoverfladen. Fra tid til anden kan de valsede havregryn suppleres med vitaminer, mælk og torskelevertran. Andre egnede foderkilder er bagegær og fiskefoderet »TetraMin«.

Fodring finder sted ca. to gange om ugen. En passende mængde valsede havregryn strøs ud på jordoverfladen eller iblandes omhyggeligt i substratet, når jorden brydes for at fremme beluftning. Den absolutte mængde uddelt foder afhænger af antallet af orme i substratet. Som hovedregel øges mængden af foder, hvis alt foderet er spist inden for en dag efter fodring. Omvendt reduceres mængden af foder, hvis der stadig er foder på overfladen på tidspunktet for den anden fodring (en uge senere). Foder med svampevækst fjernes og erstattes. Efter tre måneder flyttes ormene til et frisk fremstillet substrat.

Dyrkningsbetingelserne anses for tilfredsstillende, hvis ormene: a) ikke forsøger at forlade jordsubstratet, b) bevæger sig hurtigt gennem jorden, c) har en blank overflade uden fastsiddende jordpartikler, d) er mere eller mindre hvide, e) forekommer i forskellige aldre i kulturene og f) formerer sig løbende.

Tillæg 5

Gennemførelse af test med andre *Enchytraeus*-arter**Valg af art**

Der kan bruges andre arter end *E. albidus*, men testmetoden og validitetskriterierne skal tilpasses i overensstemmelse hermed. Eftersom mange *Enchytraeus*-arter er umiddelbart tilgængelige og let kan holdes i laboratoriet, er det vigtigste kriterium for at vælge andre arter end *E. albidus* økologisk relevans og desuden sammenlignelig følsomhed. Der kan også være formelle årsager til at skifte art. I lande hvor *E. albidus* ikke forekommer og ikke kan importeres (f.eks. på grund af karantænemæssige begrænsninger), vil det f.eks. være nødvendigt at bruge en anden *Enchytraeus*-art.

Eksempler på egnede alternative arter

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide og Graefe 1992): I de senere år er denne art ofte blevet anvendt i økotoksikologiske undersøgelser på grund af ukompliceret formering og testning. Den er dog lille, og det gør den vanskeligere at håndtere end *E. albidus* (især på trin forud for brug af farvningsfremgangsmåden). Det er ikke med sikkerhed dokumenteret, at *E. crypticus* findes i det fri, og den er kun blevet beskrevet fra dyrkede regnorme-bestande. Dens økologiske behov kendes derfor ikke.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Navnet dækker sandsynligvis over en gruppe nært beslægtede arter, som det er morfologisk vanskeligt at skelne imellem. Det frarådes at bruge denne art til testning, før de individer, der bruges i en test, kan identificeres som arter. *E. buchholzi* findes sædvanligvis i enge og forstyrrede områder, f.eks. vejkanter.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Denne art var oprindeligt kendt som *E. »minutus«*, men er for nylig blevet beskrevet (1). Den blev først fundet af U. Graefe (Hamburg) i en eng tæt på St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Tyskland). *E. luxuriosus* er ca. halvt så stor som *E. albidus*, men større end de andre arter, der er beskrevet her; den kan derfor være et godt alternativ til *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen og Christensen 1963): Der har indtil nu været beretninger om denne art i mineraljord i Tyskland og Spanien, hvor den er almindelig, men normalt ikke særligt hyppigt forekommende. Sammenlignet med andre små arter af denne slægt er den forholdsvis let at identificere. Man ved intet om dens adfærd i laboratorietest eller dens følsomhed over for kemikalier. Den har dog vist sig at være let at dyrke (*E. Belotti*, personlig samtale).

Dyrkningsbetingelser

Alle førnævnte *Enchytraeus*-arter kan dyrkes i samme substrater som *E. albidus*. Deres mindre størrelse betyder, at dyrkningsbeholderne kan være mindre, og at der kan bruges samme foder, men at rationsstørrelsen skal justeres. Disse arters livscyklus er kortere end *E. albidus*' livscyklus, og de skal fodres oftere.

Testbetingelser

Testbetingelserne er generelt de samme som dem, der gælder for *E. albidus*, bortset fra at:

- testbeholderne kan (men skal ikke nødvendigvis) være mindre
- varigheden af formeringstesten kan (men skal ikke nødvendigvis) være kortere, dvs. fire i stedet for seks uger; varigheden af den indledende test bør dog ikke ændres
- brug af farvningsfremgangsmåden i lyset af ungernes begrænsede størrelse på det kraftigste anbefales til tælling
- kriteriet om »antal unger pr. testbeholder i kontrollen« bør ændres til »50«.

LITTERATUR

- 1) R. M. Schmelz og R. Collado (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida), *Carolina* 57, 93-100.
-

Tillæg 6

Detaljeret beskrivelse af ekstraktionsteknikker

Bengal Rose-farvning

Denne metode, der oprindeligt blev udviklet inden for limnisk økologi (1), blev først foreslået til tælling af unger af enchytraeider i Enchytraeidae-formeringstesten af W. de Coen (Universiteit Gent, Belgien). En ændret version (Bengal Rose blandet med formaldehyd i stedet for ethanol) blev udviklet uafhængigt af RIVM Bilthoven (2)(3).

Ved afslutningen af den endelige test (dvs. efter seks uger) overføres jorden i testbeholderne til en lav beholder. En Bellaplast-beholder eller et fremkalderkar med ribbet bund er velegnet til dette formål, sidstnævnte fordi »ribberne« begrænser ormenes bevægelse i observationsområdet. Ungerne fikseres med ethanol (ca. 5 ml pr. replikat). Beholderne fyldes derefter med vand til et lag på 1-2 cm. Et par dråber (200 til 300 µl) Bengal Rose (1 % opløsning i ethanol) tilsættes (0,5 % eosin er et alternativ), og de to komponenter blandes grundigt. Efter 12 timer får ormene en rødlig farve og bør være nemme at tælle, fordi de ligger på substratets overflade. Alternativt kan substratet/alkoholblandingen skylles gennem en sigte (maskestørrelse: 0,250 mm), inden ormene tælles. Med denne fremgangsmåde vil kaolinit, tørv og noget af sandet blive skyllet ud, og de rødligt farvede orme vil være nemmere at se og tælle. Brugen af linser med lys (linsestørrelse på mindst 100 × 75 mm med en forstørrelsesfaktor på 2 til 3) vil også lette tællingen.

Farvningsteknikken reducerer tælltiden til et par minutter pr. beholder, og som hovedregel skal det være muligt for en person at vurdere alle beholderne fra en test på højst to dage.

Vådekstraktion

Vådekstraktionen bør indledes umiddelbart efter afslutningen af testen. Jorden fra hver testbeholder anbringes i plastsigter med en maskestørrelse på ca. 1 mm. Sigterne ophænges i plastskåle uden at røre bunden. Skålene fyldes forsigtigt op med vand, indtil prøverne i sigterne er helt under vandoverfladen. For at sikre en genfindingsprocent på over 90 % af ormene bør der anvendes en ekstraktionsperiode på tre dage ved 20 °C ± 2 °C. Ved afslutningen af ekstraktionsperioden fjernes sigterne, og vandet (bortset fra en lille mængde) dekanteres langsomt, idet det så vidt muligt undgås at forstyrre sedimentet i bunden af skålene. Plastskålene omrystes derefter let for at suspendere sedimentet i det overliggende vand. Vandet overføres til en petriskål, og når jordpartiklerne er bundfældet, kan enchytraeider identificeres, fjernes og tælles med et stereomikroskop og tænger af blødt stål.

Flotation

En metode baseret på flotation er beskrevet i et notat af R. Kuperman (4). Efter fiksering af indholdet i en testbeholder med ethanol oversvømmes jorden med Ludox (AM-30-siliciumdioxid, 30 vægtprocent suspension i vand) op til 10-15 mm over jordoverfladen. Efter grundig blanding af jorden med flotationsmiddel i 2-3 minutter kan de unger, der flyder på overfladen, let tælles.

Litteratur

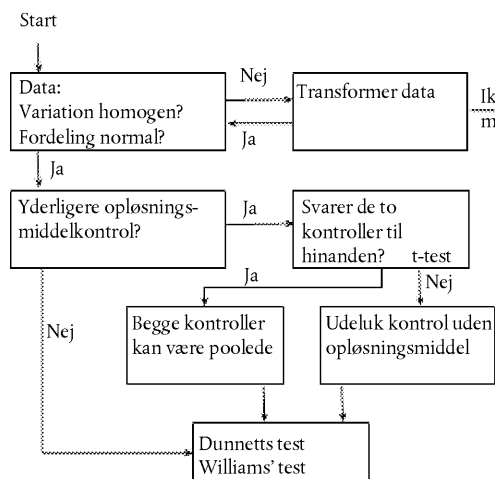
- (1) J. Korinkova og J. Sigmund (1968), The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (2) E. Dirven-Van Breemen, R. Baerselmann og J. Notenboom (1994), Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek, RIVM Rapport Nr. 719102025. s. 46 ff.

-
- (3) L. Posthuma, R. Baerselmann, R. P. M. Van Veen og E. M. Dirven-Van Breemen (1997), Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils, *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
 - (4) C. T. Phillips, R. T. Checkai og R. G. Kuperman (1998), An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil, SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA, Abstract Book No. PMP069, s. 157.
-

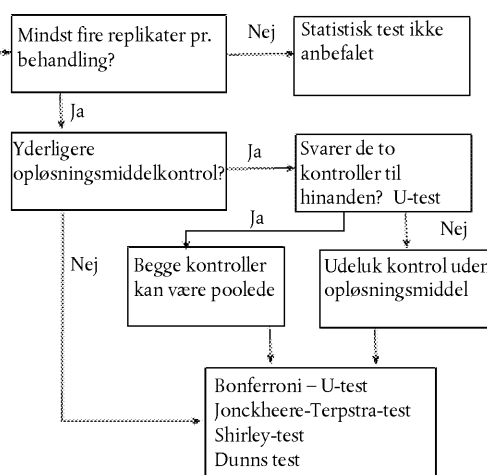
Tillæg 6

Oversigt over den statistiske vurdering af data (bestemmelse af NOEC)

Parametriske test



Ikke-parametriske test



C.33. FORMERINGSTEST (EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 222 (2004). Den er beregnet til vurdering af virkningerne af kemikalier i jorden på reproduktionen (og andre subletale endepunkter) hos regnormearten *Eisenia fetida* (Savigny 1826) eller *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Testen har været genstand for en ringtest (3). Der findes en testmetode for testen for akut toksicitet for regnorme (4). Der er offentliggjort en række andre internationale og nationale vejledninger til test for akut og kronisk toksicitet for regnorme (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* betragtes som en repræsentant for jordbundsfauna og især regnorme. Der foreligger baggrundsinformation om regnormes økologi og deres brug i økotoxikologisk testning (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Voksne orme udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliets enten blandet i jord eller, når der er tale om pesticider, tilsat i eller på jorden med fremgangsmåder, der stemmer overens med kemikaliets anvendelsesmønstre. Tilsætningsmetoden er specifik for testens formål. Testkoncentrationsintervallet vælges, således at det dækker koncentrationer, der sandsynligvis har både subletale og letale virkninger over en periode på otte uger. Dødelighed og vækstvirkninger hos de voksne orme bestemmes efter fire ugers eksponering. De voksne orme fjernes derefter fra jorden, og indvirkningen på reproduktionen vurderes efter yderligere fire uger ved at tælle antallet af unger i jorden. Reproduktionen for de orme, der blev eksponeret for testkemikaliets, sammenlignes med reproduktionen i kontrollen/kontrollerne for at fastlægge i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) ved at bruge en regressionsmodel til at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage x % reduktion i reproduktionen. EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker (f.eks. EC_{10} , EC_{50}), således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation (definitioner er anført i tillæg 1).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Følgende oplysninger om testkemikaliets bør foreligge med henblik på design af passende testprocedurer:
 - vandopløselighed
 - $\log K_{ow}$
 - damptryk
 - og om muligt oplysninger om skæbne og adfærd i miljøet (f.eks. fotolyse- og hydrolyse-hastighed, hvis det er relevant for anvendelsesmønstrene).
5. Denne testmetode kan anvendes på alle kemikalier uanset deres opløselighed i vand. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, der her defineres som kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-/vandfordelingskoefficienten er større end en, eller på kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.
6. I denne testmetode tages der ikke hensyn til eventuel nedbrydning af testkemikaliets i løbet af testperioden. Det kan således ikke antages, at eksponeringskoncentrationerne bevarer de oprindelige værdier i hele testen. Det anbefales i givet fald at foretage en kemisk analyse af testkemikaliets ved begyndelsen og afslutningen af testen.

REFERENCEKEMIKALIE

7. NOEC og/eller EC_{50} for et referencekemikalie skal bestemmes, for at give sikkerhed for at laboratorietestbetingelserne er tilstrækkelige og kontrollere, at testorganismernes respons ikke ændrer sig statistisk over tid. Det tilrådes, at testning af et referencekemikalie finder sted mindst en gang årligt eller, når testningsfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie. Carbendazim eller benomyl er egnede referencekemikalier, der har vist sig at påvirke reproduktionen (3). Der skal observeres signifikante effekter ved a) 1-5 mg aktiv bestanddel/kg tørmasse eller b) 250-500 g/ha eller 25-50 mg/m². Hvis en positiv toksisk standard er inkluderet i testserien, anvendes der en koncentration, og antallet af replikater skal være det samme som i kontrollerne.

TESTENS VALIDITET

8. Følgende kriterier skal være opfyldt i kontrollerne, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:
- Hver replikat (som indeholder ti voksne individer) skal have frembragt ≥ 30 unger ved afslutningen af testen.
 - Variationskoefficienten for reproduktion skal være ≤ 30 %.
 - Dødeligheden for voksne individer i testens fire første uger skal være ≤ 10 %.

Hvis en test ikke opfylder ovenstående validitetskriterier, skal den afsluttes, medmindre der kan fremlægges en begrundelse for at fortsætte testen. Begrundelsen skal fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF TESTEN

Udstyr

9. Der bruges testbeholdere af glas eller et andet kemisk inert materiale med en kapacitet på 1-2 liter. Beholderne skal have et tværsnitsareal på ca. 200 cm², således at der opnås en dybde for det fugtige substrat på ca. 5-6 cm, når der tilsættes 500-600 g tørmasse substrat. Beholderens låg skal give mulighed for gasudveksling mellem substratet og atmosfæren og adgang til lys (f.eks. kan låget være perforeret og gennemsigtigt) og samtidig forhindre orme i at slippe ud. Hvis den anvendte mængde testsubstrat er væsentligt større end 500-600 g pr. testbeholder, skal antallet af orme forøges tilsvarende.
10. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:
- tørreskab
 - stereomikroskop
 - pH-meter og fotometer
 - egnede nøjagtige vægte
 - passende udstyr til temperaturkontrol
 - passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne har låg)
 - inkubator eller lille rum med klimaanlæg
 - pincetter, kroge eller spiraler
 - vandbad.

Klargøring af den syntetiske jord

11. Den syntetiske jord, der bruges i testen (5)(7), har følgende sammensætning (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):
- 10 % sphagnum (så tæt på pH 5,5-6,0 som muligt, uden synlige planterester, findelt og tørret til målt fugtindhold)
 - 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

- 0,3-1,0 % calciumcarbonat (CaCO_3 , pulveriseret, analysekvalitet) for at opnå en initial pH-værdi på $6,0 \pm 0,5$.
- 70 % lufttørret kvartssand (afhængigt af den nødvendige mængde CaCO_3), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm .

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde CaCO_3 vil afhænge af jordsubstratets komponenter, herunder foder, og bestemmes ved at måle delpøver umiddelbart før testen. pH-værdien måles i en blandet prøve i en 1 M kaliumchloridopløsning (KCl) eller en 0,01 M calciumchloridopløsning (CaCl_2) (13).

Bemærkning 2: Jordens organiske kulstofindhold kan reduceres, f.eks. ved at sænke sphagnumindholdet til 4-5 % og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliets adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliet tilgængelighed for ormene forøges. Det er blevet påvist, at *Eisenia fetida* kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold (f.eks. 2,7 %) (14), og erfaringer viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv. Det er derfor ikke nødvendigt — inden brug af en sådan jord i en endelig test — at påvise egnetheden af den syntetiske jord, for at sikre at testen opfylder validitetskriterierne, medmindre tørvindholdet er lavere end angivet ovenfor.

Bemærkning 3: Når der bruges naturlig jord i supplerende test (f.eks. på efterfølgende trin), skal det også dokumenteres, at jorden er egnet, og at validitetskriterierne er opfyldt.

12. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblender) i et godt ventileret område. Før testens start fugtes den tørre syntetiske jord ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (hvilket svarer til tørmasse med et fugtindhold på 50 ± 10 %). Det giver et substrat uden stående eller frit vand, når det presses sammen i hånden. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2, ISO 11274 (15) eller en tilsvarende EU-standard.
13. Hvis testkemikaliets påføres på jordoverfladen eller blandes i jord uden vand, kan den endelige mængde vand blandes i den syntetiske jord i forbindelse med klargøringen af jorden. Hvis testkemikaliets blandes i jorden sammen med vand, kan yderligere vand tilsættes sammen med testkemikaliets (se punkt 19).
14. Jordens fugtindhold bestemmes ved begyndelsen og afslutningen af testen i overensstemmelse med ISO 11465 (16) eller en tilsvarende EU-standard, og jordens pH bestemmes i overensstemmelse med tillæg 3 eller ISO 10390 (13) eller en tilsvarende EU-standard. Disse bestemmelser bør foretages i en prøve af kontroljord og en prøve af hver type testkoncentrationsjord. Jordens pH bør ikke justeres, når testen vedrører sure eller basiske kemikalier. Fugtindholdet overvåges gennem hele testen ved at veje beholderne regelmæssigt (se punkt 26 og 30).

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

15. Den art, der skal benyttes i testen, er *Eisenia fetida* eller *Eisenia andrei* (1)(2). Der skal bruges voksne orme på mellem to måneder og et år med bælte for at begynde testen. Ormene udvælges fra en synkroniseret kultur med en forholdsvis homogen aldersstruktur (tillæg 4). Aldersspredningen blandt individerne i en testgruppe bør ikke være over fire uger.
16. De udvalgte orme akklimatiseres i mindst en dag med den type syntetiske jordsubstrat, der skal anvendes til testen. I denne periode fodres ormene med det samme foder som i testen (se punkt 31-33).
17. Grupper af ti orme vejes enkeltvis, og grupperne fordeles vilkårligt i testbeholderne ved begyndelsen af testen. Ormene vaskes inden vejningen (med deioniseret vand), og det overskydende vand fjernes ved kortvarigt at anbringe ormene på filterpapir. De enkelte ormes vådmasse skal være på 250-600 mg.

Klargøring af testkoncentrationer

18. Der kan benyttes to metoder til tilførsel af testkemikaliet: iblanding af testkemikaliet i jorden (se punkt 19-21) eller påføring på jordoverfladen (se punkt 22-24). Valget af den egnede metode afhænger af formålet med testen. Generelt anbefales det at blande testkemikaliet i jorden. Tilførselsprocedurer, som er i overensstemmelse med normal praksis inden for landbruget, kan dog være påkrævet (f.eks. sprøjtning af flydende formulering eller brug af særlige pesticidformuleringer såsom granulat- eller frøbehandlinger). Opløsningsmidler, der bruges i forbindelse med behandling af jorden med testkemikaliet, udvælges på grundlag af deres lave grad af toksicitet for regnorme, og testen skal omfatte passende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 27).

Iblanding af testkemikaliet i jorden*Vandopløseligt testkemikalie*

19. En opløsning af testkemikaliet i deioniseret vand klargøres umiddelbart inden testens begyndelse, i en mængde der er tilstrækkelig til alle replikater af en koncentration. Det kan være nødvendigt med et hjælpeopløsningsmiddel for at lette klargøringen af testopløsningen. Det er hensigtsmæssigt at klargøre den mængde opløsning, der er nødvendig for at opnå det endelige fugtindhold (40-60 % af den maksimale vandholdende evne). Opløsningen blandes omhyggeligt med jordsubstratet, inden det overføres til testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. Testkemikaliet opløses i en lille mængde egnet organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone) og sprøjtes derefter på, eller blandes i, en lille mængde fint kvartssand. Opløsningsmidlet fjernes derefter ved afdampning i et stinkskab i mindst fem minutter. Det behandlede sand blandes derefter omhyggeligt med den forhåndsfugtede syntetiske jord. Derefter tilsættes og iblandes deioniseret vand (den nødvendige mængde) for at opnå et endeligt fugtindhold på 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Jorden er nu klar til anbringelse i testbeholderne. Man bør være opmærksom på, at visse opløsningsmidler kan være toksiske for regnorme.

Testkemikalie, der er uopløseligt i vand, og organiske opløsningsmidler

21. En blanding bestående af 10 g fint industrielt kvartssand med den mængde testkemikalie, der er nødvendig for at opnå testkoncentrationen, klargøres. Blandingen blandes derefter omhyggeligt med den forhåndsfugtede syntetiske jord. Derefter tilsættes og iblandes deioniseret vand til den nødvendige mængde for at opnå et endeligt fugtindhold på 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Jorden er nu klar til anbringelse i testbeholderne.

Påføring af testkemikaliet på jordoverfladen

22. Jorden behandles, efter at ormene er tilsat. Testbeholderne fyldes først med det fugtede jordsubstrat, og de vejede orme anbringes på overfladen. Sunde orme graver sig normalt omgående ned i substratet, og eventuelle orme, der måtte være tilbage på overfladen efter 15 minutter, betragtes således som skadede og skal erstattes. Hvis orme erstattes, vejes de nye orme og de erstattede orme, således at den eksponerede gruppe ormes samlede levende vægt og beholderens samlede vægt med orme ved testens begyndelse er kendt.
23. Testkemikaliet tilsættes. Det bør ikke tilsættes til jorden før efter en halv time efter tilsætningen af ormene (eller hvis der er orme på jordoverfladen), således at direkte eksponering for testkemikalie ved hudkontakt undgås. Når testkemikaliet er et pesticid, kan det være hensigtsmæssigt at sprøjte det på jordoverfladen. Testkemikaliet bør påføres så jævnt som muligt på jordoverfladen ved hjælp af en egnet laboratoriesprøjte for at simulere sprøjteanvendelse i marken. Før påføring fjernes testbeholderens låg, og det erstattes af en foring, som beskytter beholderens sidevægge mod sprøjt. Foringen kan bestå af en testbeholder, hvor bunden er fjernet. Påføringen finder sted ved en temperatur på $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ og for vandige opløsninger, emulsioner eller spredninger ved en vandtilførselsrate på $600\text{--}800\text{ }\mu\text{l/m}^2$. Raten kontrolleres ved hjælp af en egnet kalibreringsteknik. Særlige formuleringer som granulat- eller frøblandinger påføres på en måde, der er i overensstemmelse med praksis i landbruget.

24. Testbeholdere efterlades udækkede i en time, så eventuelt flygtigt opløsningsmiddel, som er knyttet til tilførslen af testkemikaliet, kan fordampe. De skal sikres, at ingen orme slipper ud af testbeholderne i dette tidsrum.

FREM GANGSMÅDE

Testgrupper og kontrolgrupper

25. En belastning på ti regnorme i 500-600 g tørmasse syntetisk jord (dvs. 50-60 g jord pr. orm) anbefales. Hvis der bruges større mængder jord, hvilket kan være tilfældet, hvis der testes pesticider med særlige påføringsmetoder, f.eks. frøbehandlinger, bevares belastningen på 50-60 g jord pr. orm ved at øge antallet af orme. Der klargøres ti orme pr. kontrol- og behandlingsbeholder. Ormene vaskes med vand og tørres af og anbringes derefter på absorberende papir i en kort periode for at dræne overskydende vand.
26. For at undgå systematiske fejl i forbindelse med fordelingen af ormene i testbeholderne bør testpopulationens homogenitet bestemmes ved enkeltvist at veje 20 orme, som er udtaget vilkårligt fra den population, hvorfra testormene skal tages. Når der er sikret homogenitet, udvælges partier af orme, som vejes og fordeles i testbeholderne i henhold til en randomiseringsprocedure. Efter tilsætning af testormene vejes hver testbeholder, således at der foreligger en startvægt, der kan bruges som grundlag for overvågning af jordens fugtindhold under testen, som beskrevet i punkt 30. Testbeholderne overdækkes derefter som beskrevet i punkt 9 og anbringes i testkammeret.
27. Der klargøres egnede kontroller for hver af de metoder til påføring af testkemikalier, der er beskrevet i punkt 18-24. De relevante beskrevne fremgangsmåder følges ved klargøring af kontrollerne, bortset fra at testkemikaliet ikke tilsættes. Når det er relevant, tilsættes organiske opløsningsmidler, kvartssand eller andre bærestoffer således til kontrollerne i samme koncentrationer/mængder som dem, der bruges til behandlingerne. Hvis et opløsningsmiddel eller et andet bærestof bruges til at tilsætte testkemikaliet, klargøres og testes en yderligere kontrol uden bærestoffet eller testkemikaliet, for at sikre at bærestoffet ikke har indflydelse på resultatet.

Testbetingelser

28. Testtemperaturen er $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 16 timers lys og 8 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholderens område.
29. Testbeholderne belufes ikke under testen, men testbeholderens låg bør være udformet således, at de tillader gasudveksling og samtidig begrænser afdampning af fugt (se punkt 9).
30. Vandindholdet i jordsubstratet i testbeholderne opretholdes under hele testen ved at veje testbeholderne (uden låg) regelmæssigt. Tab erstattes efter behov med deioniseret vand. Vandindholdet bør ikke afvige mere end 10 % fra vandindholdet i begyndelsen af testen.

Fodring

31. Foder af en kvalitet, der har vist sig egnet til mindst at holde ormenes vægt under testen, betragtes som acceptabelt. Erfaringer har vist, at havregryn eller ko- eller hestegødning er egnet foder. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke medicineres eller behandles med kemikalier som f.eks. væksthæmmende stoffer, nematicider eller lignende veterinære produkter, der kan have negative virkninger på ormene under testen. Selvindsamlet kogødning anbefales, eftersom erfaringerne viser, at kommercielt tilgængelig kogødning brugt som havegødning kan have negative virkninger på ormene. Gødningen lufttørres, findeles og pasteuriseres inden brug.
32. Hvert frisk parti foder gives til en ormebestand (ikke test) inden brug i en test, for at sikre at det er af passende kvalitet. Vækst og kokondannelse må ikke være mindre end hos orme, der holdes i et substrat, som ikke indeholder det nye parti foder (betingelser som beskrevet i testmetoden C.8(4)).

33. Foder gives først en dag efter tilsætning af ormene og påføring af testkemikalie på jorden. Ca. 5 g foder spredes ud på jordoverfladen i hver beholder og fugtes med deioniseret vand (ca. 5-6 ml pr. beholder). Derefter gives der foder en gang om ugen i testperioden på fire uger. Hvis foder ikke bliver spist, skal rationen reduceres med henblik på at forebygge svampevækst og mug. De voksne individer fjernes fra jorden på testens 28. dag. Der fordeles yderligere 5 g foder i hver testbeholder. Ingen yderligere fodring finder sted i testens resterende fire uger.

Udvælgelse af testkoncentrationer

34. Forhåndskendskab til testkemikaliet toksicitet kan hjælpe til at finde passende testkoncentrationer, f.eks. fra en hurtig test (4) og/eller fra undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval. Når det er nødvendigt, udføres der en test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg (tørmasse af jord). En replikat pr. behandling og kontrol er tilstrækkelig. Varigheden af testen til bestemmelse af dosisinterval er to uger, og dødeligheden vurderes ved afslutningen af testen.

Forsøgsdesign

35. Eftersom der ikke kan foreskrives en bestemt sammenfattende statistik for testen, omfatter testmetoden bestemmelse af NOEC og EC_x . Tilsynsmyndighederne vil sandsynligvis stille krav om NOEC inden for den nærmeste fremtid. Der kan i den nærmeste fremtid blive tale om mere udbredt brug af EC_x ud fra statistiske og økologiske overvejelser. Der foreslås således tre design baseret på anbefalinger som følge af en ringtest af en formeringstestmetode med enchytraeider (17).
36. Når intervallet for koncentrationerne skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:
- For at bestemme NOEC skal der testes mindst fem/tolv koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor på højst 2,0.
 - For at bestemme EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) anbefales et tilstrækkeligt antal koncentrationer til at forårsage mindst fire statistisk signifikant forskellige gennemsnitsresponsen ved de pågældende koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentration og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.
 - En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og EC_x . Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

Testvarighed og -målinger

37. På dag 28 observeres og tælles de levende voksne orme. Enhver usædvanlig adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden, ubevægelighed) og usædvanlig morforlogi (f.eks. åbne sår) registreres også. Alle voksne orme fjernes derefter fra testbeholderne og tælles og vejes. Overførsel af den jord, der indeholder ormene, til en ren bakke forud for vurderingen kan lette søgningen efter de voksne individer. De orme, der udtages fra jorden, vaskes inden vejningen (med deioniseret vand), og det overskydende vand fjernes ved kortvarigt at anbringe ormene på filterpapir. Orme, der ikke findes på dette tidspunkt, registreres som døde, eftersom det må antages, at sådanne orme er døde og nedbrudt inden vurderingen.
38. Hvis jorden er blevet fjernet fra beholderne, returneres den nu (minus de voksne orme, men med eventuelle kokoner, der måtte være dannet). Jorden inkuberes derefter i yderligere fire uger under samme testbetingelser, bortset fra at fodring kun finder sted en gang i begyndelsen af denne testfase (se punkt 33).

39. Ved afslutningen af den anden periode på fire uger bestemmes antallet af unger, der er klækket af kokonerne i testjorden, og antallet af kokoner ved hjælp af fremgangsmåden i tillæg 5. Alle tegn på skader på ormene registreres også i hele testperioden.

Grænsetest

40. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til fastlæggelse af dosisområdet (dvs. 1 000 mg/kg), udføres formeringstesten som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg. En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at NOEC for formering er større end grænsekoncentrationen, og samtidig minimere det antal orme, der bruges i testen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrollen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

41. Tillæg 6 indeholder en oversigt, men testmetoden giver ingen endelig statistisk vejledning i analyse af testresultaterne.
42. Et af endepunkterne er dødelighed. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres dog også sammen med tilstedeværelsen af eventuelle unger. Der bruges normalt probabilistisk analyse (18) eller logistisk regression til at bestemme LC_{50} . I tilfælde hvor denne analysemetode er uegnet (f.eks. hvis der foreligger under tre koncentrationer med delvis dødelighed), kan der bruges alternative metoder. Disse metoder kan omfatte glidende gennemsnit (19), Trimmed Spearman-Kärber-metoden (20) eller simpel interpolation (f.eks. geometrisk gennemsnit af LC_0 og LC_{100} som beregnet ved kvadratroden af LC_0 ganget med LC_{100}).
43. Det andet endepunkt er frugtbarhed (f.eks. antal unger). Som i testen til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade dog anføres i den endelige rapport. I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit $\bar{x}$ og standardafvigelsen pr. behandling og pr. kontrol for at beregne reproduktionen.
44. Hvis der er foretaget en variansanalyse, kan standardafvigelsen, s , og frihedsgraderne, df , erstattes af henholdsvis det samlede variansestimater fra variansanalysen og frihedsgraderne herfra — forudsat at variansen ikke afhænger af koncentrationen. I dette tilfælde bruges kontrollernes og behandlingernes individuelle varianser. Disse værdier beregnes normalt med kommerciel statistisk software, der bruger resultater pr. beholder som replikater. Hvis det skønnes mere hensigtsmæssigt at samle data for de negative kontroller og opløsningsmiddelkontrollerne end at teste dem hver for sig, skal de testes for at konstatere, at de ikke er signifikant forskellige (punkt 47 og tillæg 6 indeholder beskrivelser af egnede test).
45. Yderligere statistisk testning og følgeslutning afhænger af, hvorvidt replikatværdierne er normalt fordelt og er homogene med hensyn til varians.

Beregning af NOEC

46. Anvendelse af stærke statistiske test foretrækkes. Der bør bruges oplysninger fra f.eks. tidligere erfaring med ringtest eller andre historiske oplysninger om, hvorvidt data er nogenlunde normalt fordelt. Varianshomogenitet (homoskedasitet) er mere afgørende. Erfaringer viser, at variansen ofte stiger med stigende gennemsnit. I disse tilfælde kan transformation af data medføre homoskedasitet. En sådan transformation bør dog være baseret på erfaring med historiske data snarere end på data, der undersøges. Med homogene data udføres flere t-test, såsom Williams' test ($\alpha = 0,05$, ensidet) (21)(22) eller i visse tilfælde Dunnetts test (23)(24). Det skal bemærkes, at t-værdierne i tabellen — i tilfælde af ulige replikation — skal korrigeres i henhold til Dunnett og Williams. Nogle gange stiger/falder responserne ikke regelmæssigt på grund af stor variation. I dette tilfælde, hvor der er tale om en kraftig afvigelse fra monotoni, er Dunnetts test mere velegnet. Hvis der er afvigelser fra homoskedasitet, kan det være fornuftigt at undersøge mulige virkninger på varians nærmere, for at beslutte om der kan bruges t-test uden at miste betydelig styrke (25). Alternativt kan der bruges flere U-test, f.eks.

Bonferroni-U-test ifølge Holm (26), eller når dataene udviser heteroskedasitet, men ellers svarer til et underliggende monotont dosis/respons-forhold, en anden ikke-parametrisk test [f.eks. Jonckheere-Terpstra (27)(28) eller Shirley (29)(30)], som generelt ville være at foretrække frem for t-test justeret for forskel i varians (se også figuren i tillæg 6).

47. Er der udført en grænsetest, og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan den parvise Student-t-test bruges eller alternativt Mann-Whitney-U-testen (31).

Beregning af EC_x

48. For at beregne enhver EC_x -værdi bruges middelværdierne pr. behandling til regressionsanalyse (lineær eller ikke-lineær), når der er opnået et passende dosis/respons-forhold. For ormenes vækst som en kontinuerlig respons kan EC_x -værdier estimeres ved hjælp af passende regressionsanalyse (32). Blandt egnede forhold for kvantale data (dødelighed/overlevelse og afkom) er normale sigmoidforhold, logistiske forhold eller Weibull-forhold, som omfatter to til fire parametre, hvoraf nogle også kan modellere hormetiske responser. Hvis et dosis/respons-forhold blev bestemt ved lineær regressionsanalyse, bør en signifikant r^2 (determinationskoefficient) og/eller hældning findes ved regressionsanalyse, inden EC_x bestemmes ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den ligning, der er fundet ved regressionsanalyse. 95 % konfidensgrænser beregnes ifølge Fieller (nævnt i Finney (18)) eller andre moderne passende metoder.
49. Alternativt modelleres responsen som en procentdel eller andel af modelparametre, hvilket fortolkes som kontrollernes gennemsnitsrespons. I disse tilfælde kan den normale (logistiske, Weibull-) sigmoidkurve ofte let tilpasses til resultaterne ved hjælp af den probabilistiske regressionsmetode (18). I disse tilfælde skal vægtningsfunktionen justeres for metrisk respons, jf. Christensen (33). Hvis der er konstateret hormese, bør den probabilistiske analyse erstattes af en logistisk funktion med fire parametre eller Weibull-funktion tilpasset med den ikke-lineære regressionsmetode (34). Hvis et passende dosis/respons-forhold ikke kan tilpasses til dataene, kan der bruges andre metoder til at bestemme EC_x og værdiens konfidensgrænser, f.eks. glidende gennemsnit i henhold til Thompson (19) og Trimmed Spearman-Kärber-metoden (20).

TESTRAPPORT

50. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- en endelig beskrivelse af testkemikallet, parti, batch og CAS-nummer, renhed
- testkemikaliet's egenskaber (f.eks. log Kow, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og oplysninger om skæbne og adfærd).

Testorganismer:

- anvendte testdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser
- alder, interval for testorganismers størrelse (masse).

Testbetingelser:

- oplysninger om klargøring af testjorden
- jordens maksimale vandholdende evne
- en beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilføre testkemikallet til jorden
- oplysninger om hjælpekemikalier, der bruges til administration af testkemikallet
- oplysninger om kalibrering af eventuelt sprøjteudstyr
- beskrivelse af forsøgsdesign og procedure
- testbeholdernes størrelse og mængde testjord
- testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklussernes varighed, temperatur

- en beskrivelse af fodringen, typen og mængden af foder anvendt i testen, fodringsdatoer
- jordens pH- og vandindhold ved påbegyndelse og afslutning af testen.

Testresultater:

- dødelighed for voksne individer (%) i hver testbeholder ved afslutningen af de første fire uger af testen
- den samlede mængde voksne individer i hver testbeholder ved begyndelsen af testen
- ændringer i levende voksne individers kropsvægt (% af startvægt) i hver testbeholder efter de første fire uger af testen
- antal unger afkom fremkommet i hver testbeholder ved afslutningen af testen
- en beskrivelse af synlige eller patologiske symptomer eller tydelige adfærdssændringer
- resultater opnået med referencetestkemikaliet
- LC_{50} , NOEC og/eller EC_x (f.eks. EC_{50} , EC_{10}) for formering, hvis nogle af værdierne er udtrykt med konfidensintervaller, og en graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning heraf og alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne
- en afbildning af dosis/respons-forholdet
- resultaterne for hver testbeholder

Afvisninger fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

- (1) J. Jaenicke (1982), »*Eisenia foetida*« is two biological species, *Megadrilologica* 4, 6-8.
- (2) N. Oien og J. Stenerson (1984), Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species, *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277-282.
- (3) C. Kula (1996), Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* — comparison of two ringtests, in: F. Riepert og C. Kula (1996), Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms, Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 320, s. 50-82.
- (4) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (5) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.
- (6) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1, ISO, Genève.
- (7) SETAC (1998), Advances in Earthworm Ecotoxicology. S. C. Sheppard, J. D. Bembridge, M. Holmstrup og L. Posthuma (eds), SETAC Press, s. 456 ff.
- (8) EPA (1996), Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00), United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA712-C-96-167, april 1996.
- (9) M. B. Bouché (1972), Lombriciens de France, Ecologie et systématique, Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) C. A. Edwards (1983), Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, Europa-Kommissionen.
- (11) P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards og F. Heimbach (eds.) (1992), Ecotoxicology of Earthworms, Intercept.

- (12) C. A. Edwards og J. P. Bohlen (1996), *Biology and ecology of Earthworms*, 3rd Edition, Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), *Soil Quality — Determination of pH*, No. 10390, ISO, Genève.
- (14) K. Hund-Rinke, J. Römbke, F. Riepert og R. Achazi (2000), *Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests*, in: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. S. Heiden, R. Erb, W. Dott og A. Eisentraeger (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1992), *Soil Quality — Determination of water retention characteristics — Laboratory methods*, No. 11274, ISO, Genève.
- (16) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), *Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method*, No. 11465, ISO, Genève.
- (17) J. Römbke og Th. Moser (1999), *Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test*, UBA-Texte 4/99, s. 150 + s. 223 ff.
- (18) D. J. Finney (1971), *Probit Analysis* (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.
- (19) D. J. Finney (1978), *Statistical Method in Biological Assay*, Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), *Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*, *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) D. A. Williams (1971), *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*, *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) D. A. Williams (1972), *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) C. W. Dunnett (1955), *A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control*, *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) C. W. Dunnett (1964), *New Tables for Multiple Comparisons with a Control*, *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) N. van der Hoeven (1998), *Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?*, *Ecotoxicology* 7: 355-361.
- (26) S. Holm (1979), *A simple sequentially rejective multiple test procedure*, *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) A. R. Jonckheere (1954), *A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives*, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) T. J. Terpstra (1952), *The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking*, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) E. A. Shirley (1979), *The comparison of treatment to control group means in toxicology studies*, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) D. A. Williams (1986), *A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control*, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*, 2nd edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- (32) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (33) E. R. Christensen (1984), *Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model*, *Water Research* 18, 213-221.
- (34) P. H. Van Ewijk og J. A. Hoekstra (1993), *Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present*, *Ecotox, Environ. Safety* 25, 25-32.

Tillæg 1

Definitioner

I denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

EC_x (effekt-koncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC₅₀ er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode. I denne test udtrykkes effekt-koncentrationerne som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord.

LC₀ (ikke-dødelig koncentration) er den koncentration af et testkemikalie, der ikke dræber nogen af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC₅₀ (dødelig koncentration 50 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 50 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₅₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord.

LC₁₀₀ (dødelig koncentration 100 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 100 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC₁₀₀ som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$). I denne test udtrykkes LOEC som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord. Alle testkoncentrationer over LOEC bør normalt udvise en effekt, der er statistisk forskellig fra kontrollen. Eventuelle afvigelser fra ovenstående skal begrundes i testrapporten.

NOEC (nuleffekt-koncentration, No Observed Effect Concentration) er den højeste testkemikaliekoncentration umiddelbart under LOEC, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Reproduktionsrate: Det gennemsnitlige antal unger, der er produceret pr. antal voksne individer i løbet af testperioden.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne har vist sig at være hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2 (1).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, der påfyldes vand, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

KILDER:

- 1) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.

Tillæg 3

Bestemmelse af jordens pH

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (1).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sit volumen af enten en 1 M opløsning af kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid (CaCl₂) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes grundigt i fem minutter og henstår til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

KILDER:

- 1) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

Tillæg 4

DYRKNING AF EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI

Dyrkning bør fortrinsvis foregå i et klimakammer ved $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ved denne temperatur og med tilstrækkeligt foder bliver ormene modne efter ca. 2-3 måneder.

Begge arter kan dyrkes i forskellige dyreekskrementer. Det anbefalede dyrkningssubstrat er en blanding af lige dele heste- eller kogødning og tørv. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke medicineres eller behandles med kemikalier som f.eks. vækstoffremmende stoffer, nematicider eller lignende veterinære produkter, der kan have negative virkninger på ormene under testen. Selvindsamlet gødning fra en »økologisk« kilde anbefales, eftersom erfaringerne viser, at kommercielt tilgængelig gødning brugt som havegødning kan have negative virkninger på ormene. Substratet skal have en pH-værdi på ca. 6-7 (justeret med calciumcarbonat) og en lav ionledningsevne (under 6 mS/cm eller 0,5 % saltkoncentration), og det må ikke være uforholdsmæssigt forurenet med ammoniak eller dyreurin. Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Avlekasser med en kapacitet på 10-50 liter er velegnede.

For at få orme af standardalder og -størrelse er det bedst at starte dyrkningen med kokoner. Når bestanden er etableret, vedligeholdes den ved at anbringe voksne orme i en avlekasse med frisk substrat i 14-28 dage for at tillade dannelse af flere kokoner. De voksne individer fjernes derefter, og ungerne fra kokonerne bruges som grundlag for den næste bestand. Ormene fodres kontinuerligt med animalsk affald og flyttes fra tid til anden til frisk substrat. Erfaringer har vist, at lufttørret findelt ko- eller hestegødning eller havregryn er egnet foder. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke behandles medicinsk med kemikalier som f.eks. vækstoffremmende stoffer, der kan have negative virkninger på ormene ved langtidsdyrkning. De orme, der klækkes af kokonerne, bruges til test, når de er 2-12 måneder gamle og betragtes som voksne individer.

Orme betragtes som sunde, hvis de bevæger sig gennem substratet, ikke forsøger at forlade substratet og formerer sig løbende. Meget langsom bevægelse eller gul bagende indikerer udtømmning af substrat. I det tilfælde bør der gives frisk substrat, og/eller antallet af orme pr. beholder bør reduceres.

Tillæg 5

TEKNIKKER TIL TÆLLING AF UNGER KLÆKKET AF KOKONER

Håndsortering af orme fra jordsubstratet er meget tidskrævende. To alternative metoder anbefales derfor:

- a) Testbeholderne anbringes i et vandbad — først ved en temperatur på 40 °C, men stigende til 60 °C. Efter en periode på omkring 20 minutter bør ungerne dukke op ved jordoverfladen, hvorfra de let kan fjernes og tælles.
- b) Testjorden kan skylles gennem en sigte med den metode, der er udviklet af van Gestel et al. (1), forudsat at den sphagnum og gødning eller det havregryn, der er blevet tilsat til jorden, var formalet til et fint pulver. To sigter med en maskestørrelse på 0,5 mm (diameter 30 cm) anbringes oven på hinanden. Indholdet af en testbeholder skylles gennem sigten med en kraftig stråle ledningsvand, hvilket efterlader ungerne og kokonerne primært i den øverste sigte. Det skal bemærkes, at hele den øverste sigtes overflade skal holdes våd under denne operation, så ungerne flyder på en vandfilm, hvilket forhindrer dem i at krybe gennem sigtens huller. De bedste resultater opnås, når der bruges et bruserhoved.

Når alt jordsubstratet er skyllet gennem sigten, kan unger og kokoner skylles fra den øverste sigte ned i en skål. Skålens indhold lades henstå, og tomme kokoner flyder på vandoverfladen, mens fulde kokoner og unger synker til bunds. Det stående vand kan derefter hældes ud, og unger og kokoner flyttes til en petriskål med en smule vand. Ormene kan fjernes med en nål eller en pincet med henblik på tælling.

Erfaringer har vist, at metode a) er bedre egnet til ekstraktion af unger, der kan skylles gennem selv en sigte med en maskestørrelse på 0,5 mm.

Effektiviteten af den metode, der bruges til at fjerne ormene (og eventuelle kokoner) fra jordsubstratet, skal altid bestemmes. Hvis unger indsamles ved håndsortering, anbefales det at gennemføre operationen to gange for alle prøver.

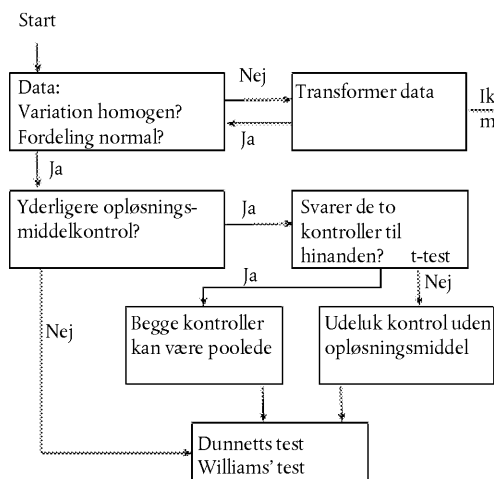
KILDER:

- (1) C. A. M. Van Gestel, W. A. van Dis, E.M. van Breemen og P. M. Sparenburg (1988), Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments, *Pedobiologia* 32:367-371.

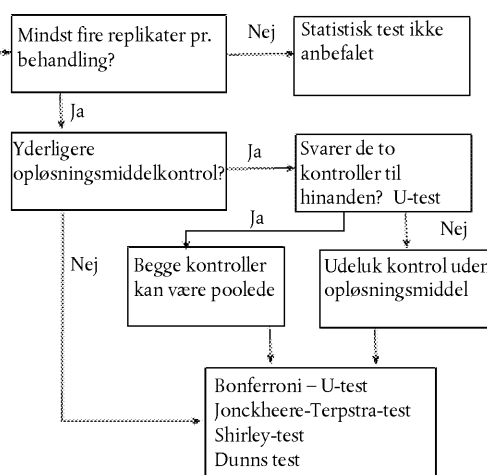
Tillæg 6

Oversigt over den statistiske vurdering af data (bestemmelse af NOEC)

Parametriske test



Ikke-parametriske test



C.34. BESTEMMELSE AF HÆMNINGEN AF ANAEROBE BAKTERIERS AKTIVITET — REDUKTION AF GASPRODUKTION FRA AKTIVT (SPILDEVANDS)SLAM MED ANAEROB UDRÅDNING

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 224 (2007). Kemikalier, der udledes til vandmiljøet, ledes gennem både aerobe og anaerobe zoner, hvor de kan nedbrydes og/eller kan hæmme bakterieaktivitet; i visse tilfælde kan de forblive uforstyrret i anaerobe zoner i årtier eller længere. I forbindelse med spildevandsbehandling er den første fase, primær sedimentering, aerob i supernatantvæsken og anaerob i subnatantslammet. Det følges i den sekundære fase af en aerob zone i beluftningstanken til aktiveret slam og en anaerob zone i subnatantslammet i den sekundære sedimenteringstank. Slam fra begge disse faser underkastes sædvanligvis anaerob behandling, hvor der produceres methan og kuldioxid, der normalt bruges til at producere elektricitet. I det bredere miljø vil kemikalier, der når sedimenter i bugter, flodmundinger og havet, sandsynligvis forblive i disse anaerobe zoner på ubestemt tid, hvis de ikke er bionedbrydelige. Større andele af visse kemikalier vil i højere grad nå disse zoner på grund af deres fysiske egenskaber, såsom lav opløselighed i vand, høj grad af adsorption til opslåmmede faststoffer samt manglende aerob bionedbrydelighed.
2. Det er ønskeligt, at kemikalier, der udledes til miljøet, er bionedbrydelige under både aerobe og anaerobe forhold, men det er vigtigt, at sådanne kemikalier ikke hæmmer mikroorganismers aktivitet i nogen af disse zoner. I Det Forenede Kongerige har der været nogle få tilfælde af fuldstændig inhibering af methanproduktion forårsaget af f.eks. pentachlorphenol i industrielt spildevand, hvilket har ført til meget dyr transport af inhiberet slam fra rådnetanke til »sikre« steder og import af sundt aktivt slam fra naboanlæg. Der har dog været mange tilfælde af mindre alvorlig afbrydelse af nedbrydning forårsaget af flere andre kemikalier, herunder alifatiske halogenerede kulbrinter (kemisk rensning) og rengøringsmidler, hvilket har medført betydelig begrænsning af nedbrydningseffektiviteten.
3. Kun en testmetode, C.11 (1), beskæftiger sig med hæmning af bakterieaktivitet (aktiveret slam — respirationshæmningstest) og vurderer testkemikalies virkning på iltoptagelseshastigheden med substrat. Denne metode er blevet bredt anvendt til tidlig varsling af kemikaliers mulige skadelige virkninger på den aerobe spildevandsbehandling og til indikation af ikke-hæmmende koncentrationer af testkemikalier til brug i de forskellige bionedbrydelighedstest. Testmetode C.43 (2) giver begrænset mulighed for at bestemme et testkemikalies toksicitet for gasproduktionen i anaerobt slam, som er fortyndet til en tiendedel af sin normale koncentration af faststoffer for at give den nødvendige præcision i vurderingen af den procentvise bionedbrydning. Fordi fortyndet slam kan være mere følsomt over for inhiberende kemikalier, besluttede ISO-gruppen at udvikle en metode, hvor der bruges ufortyndet slam. Mindst tre tekster blev undersøgt (fra Danmark, Tyskland og Det Forenede Kongerige), og i sidste ende blev der udarbejdet to ISO-standarder — en, hvor der bruges ufortyndet slam, ISO 13 641-1 (3), og en, hvor der bruges 1 %-fortyndet slam, ISO 13 641-2 (4), hvilket skal repræsentere mudder og sedimenter med mindre bakteriepopulationer. Begge metoder blev underkastet en ringtest (5); del 1 blev bekræftet som en acceptabel standard, mens der var uenighed om del 2. Det Forenede Kongerige mente, at metoden kræver yderligere undersøgelse, fordi en stor del af deltagerne anførte meget begrænset eller ingen produktion af gas i rapporten, dels fordi luftrummet i procent var for højt (75 %) til optimal følsomhed.
4. Ældre værker i Det Forenede Kongerige (6)(7) beskrev en manometrisk metode, hvor der bruges ufortyndet aktivt slam plus ubearbejdet kloakslam som substrat i 500 ml-kolber; apparaturet var besværligt at arbejde med, og det ubehandlede slam gav anledning til en modbydelig stank. Senere blev det mere kompakte og hensigtsmæssige apparatur, der blev opfundet af Shelton og Tiedje (8) og udviklet af Battersby og Wilson (9), anvendt med succes af Wilson et al. (10). Kawahara et al. (11) fremstillede med succes flere typer standardslam til brug i test for anaerob bionedbrydelighed og inhibering med en række kemikalier. Ubearbejdet slam som substrat blev også erstattet, og der blev udført test med enten 1 %-fortyndet anaerobt slam eller med mudder, sedimenter osv. med begrænset bakterieaktivitet.
5. Denne metode kan tilvejebringe oplysninger, som kan bruges til at forudsige et testkemikalies sandsynlige effekt på gasproduktionen i anaerobe rådnetanke. Det er dog kun længerevarende test, der i højere grad simulerer fungerende rådnetanke, som kan give en indikation af, om mikroorganismene kan tilpasse sig til testkemikaliets, eller om de kemikalier, der sandsynligvis vil blive absorberet af og adsorberet på slam, kan opbygges til en toksisk koncentration hen over en længere periode, end denne test tillader.

PRINCIP FOR TESTEN

6. Alikvoter af en blanding af anaerobt aktivt slam (20 g/l til 40 g/l faststoffer i alt) og en nedbrydelig substratopløsning inkuberes alene og samtidig med en række koncentrationer af testkemikaliet i forseglede beholdere i op til tre dage. Den producerede mængde gas (methan plus kuldioxid) måles ved trykstigningen (Pa) i kolberne. Den procentvise hæmning af gasproduktion forårsaget af de forskellige koncentrationer af testkemikaliet beregnes på grundlag af de mængder, der produceres i de respektive test- og kontrolkolber. EC_{50} og andre effektive koncentrationer beregnes på grundlag af afbildninger af hæmningen i procent mod koncentrationen af testkemikalierne eller i højere grad dens logaritme.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Testkemikalier bør normalt bruges i den reneste, umiddelbart tilgængelige form, eftersom urenheder i visse kemikalier, f.eks. chlorphenoler, kan være langt mere toksiske end selve kemikaliet. Behovet for at teste kemikalier i den form, hvori de fremstilles/gøres kommercielt tilgængelige, bør dog overvejes. Det kan ikke rutinemæssigt anbefales at bruge formulerede produkter, men for testkemikalier med ringe opløselighed kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ. Egenskaber for testkemikaliet, der bør foreligge, omfatter opløselighed i vand og visse organiske opløsningsmidler, damptryk, adsorptionskoefficient, hydrolyse og bionedbrydelighed under anaerobe betingelser.

METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

8. Testen kan anvendes på kemikalier, som er opløselige eller uopløselige i vand, herunder flygtige kemikalier. Der bør dog udvises forsigtighed med stoffer med ringe opløselighed i vand (jf. henvisning (12)) og en høj grad af flygtighed. Der kan også bruges inokula fra andre anaerobe steder, f.eks. mudder, mættet jord og sedimenter. Anaerobe bakteriesystemer, der tidligere har været eksponeret for toksiske kemikalier, kan tilpasses, således at de bevarer deres aktivitet ved tilstedeværelse af xenobiotiske kemikalier. Inokula fra tilpassede bakteriesystemer kan udvise en højere grad af tolerance over for testkemikalierne sammenlignet med inokula fra ikke-tilpassede systemer.

REFERENCEKEMIKALIER

9. For at kontrollere fremgangsmåden testes et referencekemikalie ved at opstille egnede beholdere parallelt som led i de almindelige testserier; 3,5-dichlorphenol har vist sig at være en konsekvent hæmmer af anaerob gasproduktion såvel som af aktiveret slams iltforbrug og andre biokemiske reaktioner. To andre kemikalier har vist sig i at hæmme methanproduktion i højere grad end 3,5-dichlorphenol, nemlig methylen-bis-thiocyanat og pentachlorphenol, men resultaterne med disse kemikalier er ikke valideret. Pentachlorphenol anbefales ikke, eftersom det ikke er umiddelbart tilgængeligt i ren form.

RESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. I en international ringtest (5) var der blandt de ti deltagende laboratorier kun rimelig reproducerbarhed i EC_{50} -værdier for 3,5-dichlorphenol og 2-brom-ethansulfonsyre (intervallet for førstnævnte var 32-502 mg/l og for sidstnævnte 220-2 190 mg/l).

Antal laboratorier	I mg/l			I mg/g slam		
	gennemsnit	s.d.	vk (%)	gennemsnit	s.d.	vk (%)
	3,5-dichlorphenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-brom-ethansulfonsyre					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC₅₀-data fra ringtest — ufortyndet slam

11. De høje variationskoefficienter mellem laboratorier afspejler i vid udstrækning forskelle i slammets mikroorganismers følsomhed som følge af enten præeksponering eller ingen præeksponering for testkemikaliets eller andre kemisk beslægtede kemikalier. Den præcision, hvormed EC₅₀-værdien baseret på slamkoncentrationen blev bestemt, var knap nok bedre end den »volumetriske« værdi (mg/l). De tre laboratorier, som anførte præcisionen af deres EC₅₀-værdier for 3,5-dichlorphenol, udviste langt lavere variationskoefficienter (henholdsvis 22, 9 og 18 % for EC₅₀ mg/g) end gennemsnittet for alle ti laboratorier. De individuelle gennemsnit for de tre laboratorier var henholdsvis 3,1, 3,2 og 2,8 mg/g. De lavere, acceptable variationskoefficienter i laboratorierne sammenlignet med de langt højere koefficienter mellem laboratoriernes værdier, nemlig 9-22 % jf. 92 %, indikerer, at der er store forskelle mellem de enkelte typer slams egenskaber.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

12. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:

- a) Inkubator — gnistsikker og styret til 35 °C ± 2 °C.
- b) Tryksikre testbeholdere af glas med en passende nominel størrelse ⁽¹⁾, hver udstyret med et gastæt septum med belægning, som kan modstå ca. 2 bar eller 2 × 10⁵ Pa (til belægning bruges f.eks. PTFE = polytetrafluorethen). Serumflasker af glas med et nominelt volumen på 125 ml og et faktisk volumen på ca. 160 ml, forseglet med serumflaskesepta ⁽²⁾ og crimplåg (aluminiumsringe), anbefales, men flasker med et samlet volumen på 0,1-1 liter kan også bruges.

- c) Præcisionsstrykmåler ⁽³⁾ med nål.

Samlet gasproduktion (methan plus kuldioxid) målt ved hjælp af en trykmåler, som er tilpasset til at kunne måle og udlufte den producerede gas. Et eksempel på et egnet instrument er en håndholdt præcisionsstrykmåler, som er forbundet med en kanyler; en gastæt trevejsventil letter frigivelsen af overtryk (tillæg 1). Det er nødvendigt at holde det indre volumen i tryktransducerrør og -ventil så lavt som muligt, således at fejl som følge af manglende hensyntagen til udstyrets volumen forbliver ubetydelige.

- d) Isolerede beholdere til transport af aktivt slam.

- e) Trevejstrykventiler.

- f) Sigte med maskestørrelse på 1 mm².

- g) Tank til aktivt slam, en kolbe af glas eller polyethylen med høj densitet og en kapacitet på ca. 5 liter, som er udstyret med en omrører og en anordning til at lede en strøm af kvælstofgas (se punkt 13) gennem headspace.

- h) Membranfiltre (0,2 µm) til sterilisering af substratet.

⁽¹⁾ Den anbefalede størrelse er 0,1-1 liter.

⁽²⁾ Det anbefales at bruge gastætte silikonesepa. Det anbefales desuden, at lågenes gastæthed, navnlig i forbindelse med septa af butylgummi, testes, da flere kommercielt tilgængelige septa ikke er tilstrækkeligt gastætte mod methan, og visse septa ikke forbliver tætte, når de gennembøres med en nål under testbetingelserne.

— Gastætte coatede septa anbefales og skal bruges til flygtige kemikalier (visse kommercielle septa er forholdsvis tynde, under 0,5 cm, og forbliver ikke gastætte efter gennemboring med en kanyler).

— Septa af butylgummi (ca. 1 cm) anbefales, hvis teststofferne ikke er flygtige (de forbliver normalt gastætte efter gennemboring).

— Forud for testen anbefales det, at septaene undersøges nøje med hensyn til deres evne til at forblive gastætte efter gennemboring.

⁽³⁾ Måleren bør bruges og kalibreres med regelmæssige mellemrum i henhold til producentens anvisninger. Hvis der bruges en trykmåler af den foreskrevne kvalitet, f.eks. indkapslet med en stålmembran, er det ikke nødvendigt med kalibrering i laboratoriet. Den skal kalibreres af et godkendt institut med de anbefalede intervaller. Kalibreringens nøjagtighed kan kontrolleres i laboratoriet med en etpunktsmåling ved 1 × 10⁵ Pa i forhold til en trykmåler med mekanisk display. Når dette punkt måles korrekt, vil lineariteten også være uændret. Hvis der bruges andet måleudstyr (uden certificeret kalibrering hos producenten), anbefales omregning i hele området med jævne mellemrum (tillæg 2).

- i) Mikrosprøjter til den gastætte forbindelse mellem tryktransduceren (se punkt 12 c) og headspace i flaskerne (se punkt 12 b); også til tilsætning af uopløseligt flydende teststof til kolberne.
- j) Handskekasse — valgfri, men anbefalet — med et let, positivt kvælstoftryk.

Reagenser

- 13. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen. Der skal bruges kvælstofgas af høj renhed med et iltindhold på under 5 µl/l ilt til hele testen.

Vand

- 14. Hvis fortynding er nødvendig på et hvilket som helst trin, bruges deioniseret vand, som forinden er afluftet. Det er ikke nødvendigt at foretage analytisk kontrol af vandet, men deioniseringsapparatet skal vedligeholdes med jævne mellemrum. Der skal også bruges deioniseret vand til klargøring af stamopløsningerne. Inden tilsætningen af det anaerobe inokulum til en opløsning eller fortynding af teststof skal det sikres, at den pågældende opløsning/fortynding er fri for ilt. Det sker enten ved at blæse kvælstofgas gennem fortyndingsvandet (eller gennem fortyndingerne) i en time, inden inokulummet tilsættes, eller alternativt ved at opvarme fortyndingsvandet til kogepunktet og afkøle det til stuetemperatur i en iltfri atmosfære.

Udrådnetslam

- 15. Indsaml aktivt slam fra en rådnetank på et spildevandsanlæg — eller alternativt fra en laboratorierådnetank — der overvejende bruges til behandling husholdningsspildevand. Praktiske oplysninger om slam fra en laboratorierådnetank kan findes andetsteds (11). Hvis der skal bruges et tilpasset inokulum, kan det overvejes at bruge aktivt slam fra et industrielt rensningsanlæg. Brug kolber med bred hals fremstillet af polyethylen med høj densitet eller et tilsvarende materiale, som kan udvides, til indsamling af slam. Tilsæt slam til prøvetagningskolberne til omkring 1 cm fra kolbens top, forsegl dem, helst med en sikkerhedsventil (punkt 12 e), og anbring kolberne i isolerede beholdere (punkt 12 d) for at minimere temperaturchok, indtil de overføres til en inkubator, der er holdt ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Når kolben åbnes, frigives gasovertryk enten ved forsigtigt at løsne forseglingen eller ved hjælp af en trevejstrykventil (punkt 12 e). Det foretrækkes at bruge slammet inden for et par timer efter indsamlingen eller opbevare det ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ under et headspace af kvælstof i op til tre dage, når der normalt forekommer begrænset tab af aktivitet.

Advarsel — Aktivt slam producerer brandfarlige gasser, som indebærer brand- og eksplosionsrisici: Det indeholder også potentielt patogene organismer, og der skal derfor træffes passende forholdsregler i forbindelse med håndtering af slam. Af sikkerhedsmæssige årsager må der ikke bruges glasbeholdere til indsamling af slam.

Inokulum

- 16. Umiddelbart inden brug blandes slammet ved forsigtigt at omrøre det og lede det gennem en sigte med en maskestørrelse på 1 mm² (punkt 12 f) ned i en egnet kolbe (punkt 12 g) gennem det headspace, hvorigennem der er ledt en strøm af kvælstof. Der udtages en prøve til måling af koncentrationen af tørstoffer (se f.eks. ISO 11 923 (13) eller en tilsvarende EU-standard). Generelt bruges slammet ufortyndet. Koncentrationen af faststoffer er sædvanligvis på 2-4 % (w/v). Slammets pH-værdi kontrolleres og justeres om nødvendigt til $7 \pm 0,5$.

Testsubstrat

- 17. Opløs 10 g næringssvæske (f.eks. oxoid), 10 g gærekstrakt og 10 g D-glucose i deioniseret vand, og fortynd til 100 ml. Steriliser ved filtrering gennem et 0,2 µm-membranfilter (punkt 12 h), og brug substratet med det samme, eller opbevar det ved 4 °C i højst en dag.

Testkemikalie

- 18. Klargør en stamopløsning for hvert vandopløseligt testkemikalie, som f.eks. skal indeholde 10 g/l af kemikaliet i iltfrit fortyndingsvand (punkt 14). Brug mængder af disse stamopløsninger, som er tilstrækkelige til at fremstille reaktionsblandingerne, der indeholder graderede koncentrationer. Alternativt klargøres en fortyndingsserie af hver stamopløsning, således at den mængde, der tilsættes til testkolberne, er den samme for hver påkrævet slutkoncentration. Stamopløsningernes pH justeres om nødvendigt til $7 \pm 0,2$.

19. Hvis der er tale om testkemikalier, der ikke er tilstrækkeligt opløselige i vand, henvises til ISO 10 634 (12) eller en tilsvarende EU-standard. Hvis der skal bruges et organisk opløsningsmiddel, skal opløsningsmidler som chloroform og carbontetrachlorid undgås, da de har vist sig at virke stærkt hæmmende på methanproduktionen. Klargør en opløsning med en passende koncentration af vandopløseligt kemikalie i et egnet flygtigt opløsningsmiddel, f.eks. acetone eller di-ethylether. Tilsæt den nødvendige mængde opløsningsmiddel til de tomme testkolber (punkt 12 b), og afdamp opløsningsmidlet inden tilsætning af slam. Ved andre behandlinger bruges ISO 10 634 (12) eller en tilsvarende EU-standard, men vær opmærksom på, at eventuelle overfladeaktive stoffer, der bruges til at producere emulsioner, kan virke hæmmende på den anaerobe gasproduktion. Hvis tilstedeværelsen af organiske opløsningsmidler og emulgeringsmidler menes at forårsage artefakter, kan testkemikalien tilsættes direkte til testblandingen som et pulver eller en væske. Flygtige kemikalier og vandopløselige flydende testkemikalier kan indsprøjtes i serumflasker med inokulum ved hjælp af mikrosprøjter (punkt 12 i).
20. Tilsæt testkemikalier til kolberne for at opnå en geometrisk serie af koncentrationer, f.eks. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l og 15,6 mg/l. Hvis toksicitetsintervallet ikke er kendt fra lignende kemikalier, gennemføres der først en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med koncentrationer på 1 000 mg/l, 100 mg/l og 10 mg/l for at fastslå et passende interval.

Referencekemikalie

21. Klargør en vandig opløsning af 3,5-dichlorphenol (10 g/l) ved gradvist at tilsætte den minimale mængde 5 mol/l-natriumhydroxidopløsning til faststoffet under omrystning, indtil det er opløst. Tilsæt dernæst deoxygeneret fortyndingsvand (punkt 14) til den påkrævede mængde; sonikering kan fremme opløsning. Der kan bruges andre referencekemikalier, når det gennemsnitlige interval for EC_{50} er opnået i mindst tre test med forskellige inokula (forskellige kilder eller forskellige indsamlingstidspunkter).

INTERFERENS/FEJL

22. Visse bestanddele i slam kan antageligt reagere med potentielle inhibitorer og gøre dem utilgængelige for mikroorganismer og dermed forårsage lavere — eller ingen — inhibering. Desuden vil der, hvis slammet allerede indeholder et kemikalie, som er hæmmende, blive opnået forkerte resultater, når kemikalien underkastes testen. Ud over disse muligheder kan en række identificerede faktorer føre til falske resultater. Disse faktorer er opført på listen i tillæg 3 sammen med metoder til at forhindre eller i det mindste reducere forekomsten af fejl.

TESTPROCEDURE

23. Det nødvendige antal replikater afhænger af den præcisionsgrad, der er påkrævet for inhiberingsindekserne. Hvis kolbernes læg er tilstrækkeligt gastætte under hele testen, skal der kun opstilles et parti (mindst tre) testkolber ved hver koncentration. Tilsvarende opstilles et parti kolber med referencekemikalie og et sæt kontroller. Hvis kolbernes læg kun er pålidelige til en eller nogle få gennemboringer, opstilles et parti (f.eks. tre) testkolber for hvert interval (t), for hvilket der kræves resultater for alle koncentrationer af et testkemikalie, der skal testes. Tilsvarende opstilles der »t« partier kolber for referencekemikalien og for kontrollerne.
24. Det anbefales at bruge en handskekasse (punkt 12 j). Mindst 30 minutter før testen påbegyndes, ledes en strøm af kvælstofgas gennem handskekassen, som indeholder alt nødvendigt udstyr. Sørg for, at slammets temperatur er på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ under håndteringen og forseglingen af kolberne.

Indledende test

25. Hvis slammets aktivitet er ukendt, anbefales det at gennemføre en indledende test. Opstil kontroller til koncentrationer af faststoffer på 10 g/l, 20 g/l og 40 g/l plus substrat, men uden testkemikalie. Brug desuden forskellige volumener reaktionsblanding med henblik på at opnå tre eller fire headspacevolumen/væskevolumen-forhold. Ud fra resultaterne af det gasvolumen, der produceres på forskellige tidspunkter, bestemmes de bedst egnede betingelser, som giver mulighed for to daglige målinger med betydelige gasvolumener og frigivelse af tryk pr. dag ved optimal følsomhed ⁽¹⁾ uden risiko for eksplosioner.

⁽¹⁾ Det gælder den forsøgsopstilling og de forsøgsbetingelser, hvor de producerede volumener gas — fra blindkontroller og fra beholdere med en hæmning på 70-80 % — kan skønnes med acceptable fejlmargener.

Tilsætning af testkemikalier

26. Tilsæt vandopløselige testkemikalier til tomme testkolber (punkt 12 b) som vandige opløsninger (punkt 18). Brug mindst tre sæt kolber til hver serie af koncentrationer (punkt 20). Hvis der er tale om uopløseligt og tungt opløseligt testkemikalie, indsprøjtes opløsninger af testkemikalien i organiske opløsningsmidler med en mikrosprøjte i tomme kolber med henblik på at opnå replikatsæt med hver fem koncentrationer af testkemikalien. Afdamp opløsningsmidlet ved at lede en strøm af kvælstofgas hen over overfladen på opløsningerne i testkolberne. Alternativt tilsættes uopløselige faste kemikalier som afvejede mængder faststof direkte til testkolberne.
27. Hvis uopløselige og tungt vandopløselige flydende testkemikalier ikke tilsættes med et opløsningsmiddel, tilsættes de direkte med mikrosprøjte til testkolberne efter tilsætning af inokulum og testsubstrat (se punkt 30). Flygtige testkemikalier kan tilsættes på samme måde.

Tilsætning af inokulum og substrat

28. Omrør en passende mængde sigtet aktivt slam (se punkt 16) i en 5 l-kolbe (punkt 12g), imens en strøm af kvælstofgas ledes gennem headspace. Gennemskyl testkolber, som indeholder vandige opløsninger eller opløsninger af testkemikalier med afdampede opløsningsmidler, med en strøm af kvælstofgas i ca. to minutter for at fjerne luft. Fordel alikvoter, f.eks. 100 ml, af velblandet slam i testkolberne med en pipette med stor spids eller en målecylinder. Det er vigtigt, at pipetten fyldes på en gang til det nøjagtige foreskrevne volumen slam, fordi slamfaststoffer let bundfældes. Hvis der optages mere end det foreskrevne volumen, tømmes pipetten, og der startes forfra.
29. Tilsæt derefter en tilstrækkelig mængde substratopløsning (punkt 17) til at give en koncentration på 2 g/l af henholdsvis næringsvæske, gærekstrakt og D-glucose i blandingen, imens der fortsat gennemskylles med kvælstof. Følgende er et eksempel på testpartier.

Endelig massekoncentration af testkemikalie i testkolber (mg/l)	Volumen testkemikalie (ml)		Reagenser og substrater (ml)		
	Stamopløsning a) 10 g/l punkt 18	Stamopløsning b) 1 g/l punkt 18	Fortyndings-vand punkt 14	Inokulum punkt 16	Substrat punkt 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Kolbens volumen i alt = 160 ml Væskevolumen = 103 ml

Gasvolumen = 57 ml eller 35,6 % af det samlede volumen.

30. Gennemskyl på samme måde med kvælstofgas, og tøm testkolberne tilstrækkeligt til at håndtere eventuelt flygtigt og uopløseligt flydende testkemikalie (se punkt 27).

Kontroller og referencekemikalie

31. Opstil mindst tre sæt kolber, som kun indeholder slam og substrat, og som skal fungere som kontroller. Opstil yderligere replikatkolber, som indeholder slam og substrat plus tilstrækkelig stamopløsning af referencekemikalien, 3,5-dichlorphenol (punkt 21), til at give en slutkoncentration på 150 mg/l. Denne koncentration bør hæmme gasproduktionen med ca. 50 %. Opstil alternativt en serie af koncentrationer af referencekemikalien. Opstil desuden fire ekstra kolber til pH-måling, som indeholder slam, deoxygeneret vand og substrat. Tilsæt testkemikalien til to kolber ved den højeste koncentration, der testes, og tilsæt deoxygeneret vand til de to resterende kolber.

32. Sørg for, at alle kolber — test- og referencekemikalier og kontroller — indeholder samme volumen (V_R) væske; tilsæt om nødvendigt deoxygeneret deioniseret vand (punkt 14) for at fylde op til volumen. Headspace bør være på 10-40 % af kolbens volumen, og den faktiske værdi vælges på baggrund af de data, der er opnået i den indledende test. Når alle bestanddele er tilsat til kolberne, fjernes den nål, der leverer gassen, og hver kolbe forsegles med en gummiprop og et aluminiumslåg (punkt 12 b), idet proppen fugtes med en dråbe deioniseret vand for at lette isætningen. Bland indholdet i hver kolbe ved omrystning.

Inkubering af kolber

33. Flyt kolberne til den termostatstyrede inkubator, som helst skal være forsynet med en omrystningsanordning, og som holdes ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Kolberne inkuberes i mørke. Efter ca. en time udlignes trykket i kolberne til atmosfærisk tryk ved at indføre kanylen, som er fastgjort til trykmåleren (punkt 12 c), gennem låget på hver kolbe efter tur, åbne ventilen, indtil trykmåleren viser nul, og dernæst lukke ventilen. Nålen skal indføres i en vinkel på ca. 45° for at forhindre gas i at sive ud af kolberne. Hvis kolberne inkuberes uden omrystningsanordning, skal de omrystes manuelt to gange om dagen i hele inkubationsperioden for at ækvilibrere systemet. Kolberne inkuberes og vendes om for at forhindre tab af gas gennem septum. Vending er dog ikke hensigtsmæssig, i tilfælde hvor uopløselige testkemikalier klæber til bunden af kolben.

Trykmåling

34. Når kolberne har nået en temperatur på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, måles og registreres pH-værdien for indholdet i to af de fire kolber, der er opstillet til formålet, og indholdet kasseres; inkuberingen af de resterende kolber fortsættes i mørke. Trykket i kolberne måles og registreres to gange om dagen i de næste 48-72 timer ved at indsætte trykmålerens nål gennem låget på hver kolbe efter tur, idet nålen aftørres mellem målingerne. Hold alle dele af kolben ved inkubationstemperatur i løbet af målingen, som bør foregå så hurtigt som muligt. Aflæs trykket, når det stabiliserer sig, og registrer det. Åbn derefter ventilen med henblik på udluftning, og luk den, når trykket når nul. Testen fortsættes normalt i 48 timer fra tidspunktet for den første trykudligning, der betegnes »tid 0«. Antallet af aflæsninger og udluftninger skal for flygtige kemikalier begrænses til en (ved afslutningen af inkuberingen) eller to for at minimere tabet af testkemikalie (10).
35. Hvis trykket aflæses som negativt, må ventilen ikke åbnes. Nogle gange akkumuleres der fugt i kanylen og røret, hvilket kommer til udtryk ved en mindre negativ trykmåling. I givet fald fjernes nålen, røret omrystes og tørres med en klud, og der isættes en ny nål.

pH-måling

36. pH-værdien for indholdet i hver kolbe måles og registreres efter den sidste trykmåling.

DATA OG RAPPORTERING

Angivelse af resultaterne

37. Beregn summen og gennemsnittet af de tryk, der er registreret for hvert tidsinterval for hvert sæt replikatkolber, og beregn det gennemsnitlige kumulerede bruttogasttryk for hvert tidsinterval for hvert sæt replikater. Optegn kurver over den gennemsnitlige kumulerede gasproduktion (Pa) som funktion af tid for kontrol-, test- og referencekolber. Vælg et tidspunkt på den lineære del af kurven, normalt 48 timer, og beregn inhiberingen i procent (I) for hver koncentration ved hjælp af ligningen [1]:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1]$$

hvor

I = inhibering i %

P_t = det producerede gastryk med teststoffet på det valgte tidspunkt, i pascal (Pa)

P_c = det producerede gastryk i kontrollen på samme tidspunkt, i pascal (Pa).

Det tilrådes at optegne begge kurver, dvs. kurve I som funktion af koncentration og også som funktion af logaritmen for koncentrationen, således at den kurve, der er tættest på linearitet, kan vælges. Vurder EC_{50} -værdien (mg/l) visuelt eller ved regressionsanalyse, ud fra den kurve der er tættest på linearitet. Med henblik på sammenligning kan det være mere hensigtsmæssigt at udtrykke koncentrationen af kemikaliet som mg kemikalie/g tørstof i alt. For at opnå denne koncentration divideres volumenkoncentrationen (mg/l) med volumenkoncentrationen af tørre slamfaststoffer (g/l) (punkt 16).

38. Beregn enten inhiberingen i procent opnået ved den enkelte koncentration af det anvendte referencekemikalie eller EC_{50} , hvis der er undersøgt et tilstrækkeligt antal koncentrationer.
39. Omregn det gennemsnitlige tryk for den gas, der er produceret i kontrollen P_c (Pa) til volumen ved henvisning til kalibreringskurven for trykmåleren (tillæg 2), og beregn på grundlag heraf gasudbyttet udtrykt som det volumen, der er produceret på 48 timer af 100 ml ufortyndet slam ved en faststofkoncentration på 2 % (20 g/l) til 4 % (40 g/l).

Validitetskriterier

40. Resultater fra ISO-forsøget blandt forskellige laboratorier (5) viste, at referencekemikalien (3,5-dichlorphenol) forårsagede 50 % inhibering af gasproduktionen i et koncentrationsinterval på 32 mg/l til 510 mg/l, gennemsnit 153 mg/l (punkt 10). Dette interval er så bredt, at faste grænser for inhibering ikke kan fastsættes med sikkerhed som validitetskriterier; det bør være muligt, når udviklingen har vist, hvordan man fremstiller mere ensartede inokula. Det volumen gas, der blev produceret i kontrolkolberne på 48 timer, lå på mellem 21 ml/g og 149 ml/g tørre slamfaststoffer (gennemsnit 72 ml/g). Der var ingen åbenlys forbindelse mellem det producerede volumen gas og den tilsvarende EC_{50} -værdi. Den endelige pH varierede mellem 6,1 og 7,5.
41. Testen betragtes som gyldig, når der er opnået en inhibering på over 20 % i den referencekontrol, der indeholder 150 mg/l 3,5-dichlorphenol, der er produceret over 50 ml gas pr. g tørstof i blindkontrollen, og pH-værdien ligger i intervallet 6,2-7,5 ved afslutningen af testen.

Testrapport

42. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

- generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- renhed (urenheder) af testkemikalien.

Testbetingelser

- volumen af væske og headspace i testbeholderne
- beskrivelse af testbeholderne og gasmåling (f.eks. type trykmåler)
- tilsætning af testkemikalie og referencekemikalie til testsystemet, testkoncentrationer anvendte opløsningsmidler og brug af opløsningsmidler
- oplysninger om anvendt inokulum: rensningsanlæggets navn, beskrivelse af kilden til det behandlede spildevand (f.eks. driftstemperatur, slamretentionstid, overvejende husholdningsspildevand eller industrielt spildevand osv.), koncentration af faststoffer, gasproduktion i anaerob rådnetank, tidligere eksponering eller mulig præadaptation til toksiske kemikalier eller sted for indsamling af mudder, sedimenter osv.
- inkubationstemperatur og -interval
- antal replikater.

Resultater

- pH-værdier ved afslutningen af testen
- alle de måledata, der er indsamlet i test-, blind- og referencekemikaliekontrolbeholderne, alt efter hvad der er relevant (f.eks. tryk i Pa eller millibar), i tabelform
- inhibering i procent i test- og referencekolberne og inhibering/koncentration-kurver
- beregning af EC₅₀-værdier, udtrykt som mg/l og mg/g
- gasproduktion pr. g slam på 48 timer
- årsager til eventuel afvisning af testresultaterne
- diskussion af resultater, herunder eventuelle afvigelser fra fremgangsmåderne i testmetoden og diskussion af eventuelle afvigelser i testresultaterne som følge af interferens og fejl, i forhold til hvad der kan forventes
- angivelse af, hvorvidt formålet med testen var at måle toksiciteten for præksporerede eller ikke-præksporerede mikroorganismer.

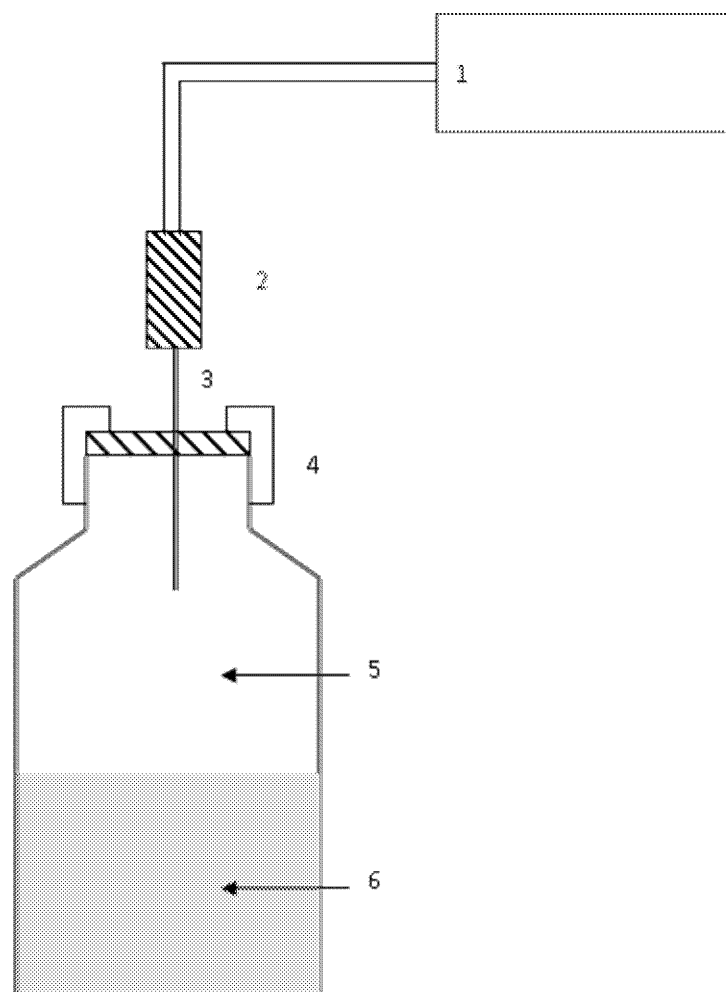
LITTERATUR

- (1) Kapitel C.11 i dette bilag: Aktiveret slam, respirationshæmningstest.
- (2) Kapitel C.43 i dette bilag: Organiske stoffers anaerobe bionedbrydelighed i udrådnat slam ved måling af gasproduktion.
- (3) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.
- (4) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000), Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2, Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria, BL 6958/A. M. R. Evans og H. A. Painter, Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) J. D. Swanwick og M. Foulkes (1971), Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons, *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986), Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge, ISBN 0 117519 43 X, in: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) D. R. Shelton og J. M. Tiedje (1984), General method for determining anaerobic biodegradation potential, *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) N. S. Battersby og V. Wilson (1988), Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions, *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) V. Wilson, H. A. Painter og N. S. Battersby (1992), A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge, *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology, Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Tyskland (1990). Eds. C. Steinberg og A. Kettrup, s. 117-132 (1992).

-
- (11) K. Kawahara, Y. Yakabe, T. Chida og K. Kida (1999), Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals, Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.
 - (12) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995), ISO 10 634, Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium.
 - (13) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1997) ISO 11 923, Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Tillæg 1

Eksempel på et apparat til måling af biogasproduktion ved hjælp af gastryk



Signaturforklaring:

- 1 — Trykmåler
- 2 — Gastæt trevejsventil
- 3 — Kanyle
- 4 — Gastæt forsegling (crimplåg og septum)
- 5 — Headspace
- 6 — Inokulum af udrådnetslam

Testbeholdere i et miljø på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Tillæg 2

Omstilling af trykmåleren

Trykmåleraflæsningerne kan sættes i forhold til gasvolumen ved hjælp af en standardkurve, hvorfra det producerede volumen gas pr. g tørt slam pr. 48 timer kan beregnes. Dette aktivitetsindeks bruges som et af de kriterier, hvorudfra testresultaternes validitet vurderes. Kalibreringskurven frembringes ved at indsprøjte et kendt volumen gas ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i serumflasker, der indeholder et vandvolumen svarende til reaktionsblandingsvolumenet, V_R .

- Fordel V_R ml alikvoter vand, holdt ved en temperatur på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, i fem serumflasker. Forsegl flaskerne, og anbring dem i et vandbad ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i en time med henblik på ækvilibrering.
- Tænd trykmåleren, lad den stabilisere sig, og nulstil den.
- Indfør kanylen gennem låget på hver af flaskerne, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.
- Gentag denne procedure med de resterende flasker.
- Indsprøjt 1 ml luft med en temperatur på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i hver flaske. Indfør nålen (på trykmåleren) gennem låget på en af flaskerne, og aflæs trykket, når det stabiliserer sig. Registrer trykket, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.
- Gentag denne procedure med de resterende flasker.
- Gentag hele proceduren med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml og 50 ml luft.
- Optegn en omregningskurve for tryk (Pa) som funktion af indsprøjtet volumen gas (ml). Instrumentets respons er lineært i intervallet 0-70 000 Pa og 0-50 ml gasproduktion.

Tillæg 3

Identificerede faktorer, der kan føre til falske resultatera) *Flaskelågenes kvalitet*

Forskellige typer septa til serumflaskerne er kommercielt tilgængelige; mange af dem, herunder butylgummi, mister deres stramhed, når de gennembøres af en nål under testbetingelserne. Nogle gange falder trykket meget langsomt, når septum er blevet gennemboret af kanylen. Brug af gastætte septa anbefales for at forhindre lækager (punkt 12 b).

b) *Fugt i kanylen*

Nogle gange akkumuleres der fugt i kanylen og røret, hvilket kommer til udtryk ved en mindre negativ trykmåling. For at afhjælpe dette fænomen fjernes nålen, røret omrystes og tørres med en klud, og der isættes en ny nål (punkt 12 c og punkt 35).

c) *Forurening med ilt*

Anaerobe metoder kan være behæftet med fejl som følge af forurening med ilt, som kan forårsage lavere gasproduktion. I denne metode bør denne mulighed minimeres ved brug af anaerobe teknikker, herunder brug af en handskekasse.

d) *Større substrater i slam*

Den anaerobe gasproduktion og slammets følsomhed påvirkes af substrater, der overføres til testkolberne med inokulummet. Udrådet slam fra anaerobe rådetanke til husholdningsspildevand indeholder ofte stadig genkendelige emner som hår og planterester af cellulose, hvilket kan gøre det vanskeligt at udtage repræsentative prøver. Ved at sigte slammet kan større uopløselige emner fjernes, hvilket gør repræsentativ prøveudtagning mere sandsynlig (punkt 16).

e) *Flygtige testkemikalier*

Flygtige testkemikalier vil blive frigivet til testkolbernes headspace. Det kan forårsage tab af en del af teststoffet fra systemet i forbindelse med udluftningen efter trykmålinger, hvilket giver falske høje EC₅₀-værdier. Fejlen kan reduceres ved at vælge det rette forhold mellem headspacevolumen og væskevolumen og ved ikke at udlufte efter trykmålinger (10).

f) *Manglende linearitet for gasproduktion*

Hvis kurven over den gennemsnitlige kumulative gasproduktion som funktion af inkubationstiden ikke er tilnærmelsesvis lineær i perioden på 48 timer, kan testen blive mindre nøjagtig. For at afhjælpe dette fænomen kan det være hensigtsmæssigt at bruge aktivt slam fra en anden kilde og/eller tilsætte en øget koncentration af testsubstrat-næringsvæske, gærekstrakt og glucose (punkt 29).

Tillæg 4

Anvendelse på miljøprøver med lav biomassekoncentration — anaerobt mudder, sedimenter osv.

INDLEDNING

- A.1 Generelt er den specifikke mikrobielle aktivitet (produceret volumen gas pr. g tørstof) i naturligt forekommende anaerobt mudder, sedimenter, jord osv. langt lavere end i anaerobt slam fra spildevand. Derfor skal visse af testbetingelserne ændres, når kemikaliers hæmmende effekt på disse mindre aktive prøver skal måles. Der er to generelle muligheder for disse mindre aktive prøver:
- a) Gennemfør en ændret indledende test (punkt 25) med den ufortyndede prøve af mudder, jord osv. ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ eller ved temperaturen på det sted, hvor prøven er udtaget, med henblik på en mere nøjagtig simulation (som i del 1 i ISO 13 641).
- b) Gennemfør alternativt testen med fortyndet (1 til 100) aktivt slam for at simulere den lave aktivitet, der kan forventes af miljøprøven, men hold temperaturen på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (som i del 2 i ISO 13 641).
- A.2 Mulighed a) kan opnås ved at anvende den metode, der er beskrevet her (svarer til del 1 i ISO 13 641), men det er vigtigt at gennemføre en indledende test (punkt 25) for at fastslå de optimale betingelser, medmindre de allerede er kendt fra tidligere test. Mudder- eller sedimentprøven blandes omhyggeligt, f.eks. i en blender, og fortyndes om nødvendigt med en lille del afluftet fortyndingsvand (punkt 14), således at den er tilstrækkeligt flydende til at blive overført med en pipette med stor spids eller en målecylinder. Hvis man mener, at der mangler næringsstoffer, kan mudderprøven centrifugeres (under anaerobe betingelser) og resuspenderes i det uorganiske substrat, som indeholder gærekstrakt (A.11)
- A.3 Mulighed b). Denne mulighed afspejler med rimelighed den lave aktivitet i miljøprøver, men mangler den høje koncentration af opslæmmede faststoffer, der er til stede i disse prøver. Disse faststoffers rolle i inhiberingen er ukendt, men det er muligt, at reaktion mellem testkemikaliet og bestanddele af muddret, samt adsorption af testkemikaliet til faststofferne, kan føre til en lavere toksicitet for testkemikaliet.
- A.4 Temperatur er en anden vigtig faktor: Med henblik på nøje simulation gennemføres test ved temperaturen på prøveudtagningsstedet, eftersom forskellige grupper af methanproducerende bakteriekolonier har vist sig at fungere inden for forskellige temperaturintervaller, navnlig termofile ($\sim 30\text{--}35\text{ °C}$), mesofile ($20\text{--}25\text{ °C}$) og psykrofile bakterier ($< 20\text{ °C}$), som kan udvise forskellige inhiberingsmønstre.
- A.5 Varighed. I den generelle test, del 1, var gasproduktionen i de 2-4 dage altid tilstrækkelig, når der blev brugt ufortyndet slam, mens der i del 2 med 1 % fortyndet slam blev produceret utilstrækkelig gas, hvis nogen, i denne periode i ringtesten. Ifølge Madsen et al. (1996), i deres beskrivelse af sidstnævnte test, bør varigheden være mindst syv dage.

Test med lav biomassekoncentration (mulighed b)

Følgende ændringer bør foretages ved tilføjelser til eller erstatning af visse eksisterende punkter og underpunkter i hovedteksten.

- A.6 I punkt 6 tilføjes: Princip for testen

»Denne teknik kan bruges med 1 % fortyndet anaerobt slam, til dels for at simulere den lave aktivitet i mudder og sedimenter. Inkubationstemperaturen kan være enten 35 °C eller temperaturen på det sted, hvor prøven blev udtaget. Eftersom bakterieaktiviteten er langt mindre end i ufortyndet slam, bør inkubationsperioden forlænges til mindst syv dage.«

- A.7 I punkt 12 a tilføjes:

»Inkubatoren skal kunne operere ned til temperaturer på 15 °C .«

A.8 En ekstra reagens tilføjes efter punkt 13:

»Phosphorsyre (H_3PO_4), 85 vægtprocent i vand.«

A.9 Følgende tilføjes i slutningen af punkt 16:

»Brug en slutkoncentration på $0,20 \pm 0,05$ g/l tørstof i alt i testen.«

A.10 Præmis 17. Testsubstrat

Dette substrat må ikke bruges, men erstattes af gærekstrakt (se punkt 17, A.11, A.12, A.13).

A.11 Der skal bruges et uorganisk substrat, herunder sporstoffer, til fortynding af anaerobt slam, og for nemheds skyld tilsættes det organiske substrat, gærekstraktet, til dette substrat.

Følgende tilføjes efter punkt 17:

»a) Uorganisk testsubstrat med gærekstrakt.

Dette substrat fremstilles af et 10-dobbelt koncentreret testsubstrat (punkt 17 b, A.12) med en opløsning af sporstoffer (punkt 17 c, A.13). Brug frisk natriumsulfidnonahydrat (punkt 17 b, A.12), eller vask og tør det før brug, for at sikre at det har tilstrækkelig reducerende kapacitet. Hvis testen udføres uden brug af handskekasse (punkt 12 j), øges koncentrationen af natriumsulfid i stamopløsningen til 2 g/l (fra 1 g/l). Natriumsulfid kan også tilsættes fra en passende stamopløsning gennem septum på de lukkede testkolber, eftersom denne fremgangsmåde vil mindske risikoen for iltning, så der opnås en slutkoncentration på 0,2 g/l. Alternativt kan der bruges titanium(III)citrat (punkt 17 b). Tilsæt det gennem septum på de lukkede testkolber til en koncentration på 0,8-1,0 mmol/l. Titanium(III)citrat er et meget effektivt reduktionsmiddel med lav toksicitet, der fremstilles som følger: Opløs 2,94 g trinatriumcitratdihydrat i 50 ml iltfrit fortyndingsvand (punkt 14) (hvilket giver en opløsning på 200 mmol/l), og tilsæt 5 ml af en opløsning af titanium(III)chlorid (15 g/100 ml fortyndingsvand). Neutraliser til pH $7 \pm 0,5$ med natriumcarbonat, og hæld i en passende serumflaske med en strøm af kvælstofgas. Koncentrationen af titanium(III)citrat i denne stamopløsning er på 164 mmol/l. Brug testsubstratet med det samme, eller opbevar det ved 4 °C i højst en dag.

A.12 b) 10-dobbelt koncentreret testsubstrat fremstillet med følgende:

vandfrit kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(eller 11,2 g dodecahydrat)	5,3 g
ammoniumchlorid (NH_4Cl)	
calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
magnesiumchloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
jern(II)chloridtetrahydrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
resazurin (redoxindikator)	0,01 g
natriumsulphidnonahydrat ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(eller titanium(III)citrat) slutkoncentration	0,8-1,0 mmol/l
opløsning af sporstoffer (se punkt 17 c, A.13)	10,0 ml
gærekstrakt	100 g
Opløses i fortyndingsvand (punkt 14) og fortyndes til:	1 000 ml

A.13 c) Opløsning af sporstoffer fremstillet med følgende:

mangan(II)chloridtetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
ortoborsyre (H_3BO_3).	0,05 g

zinkchlorid (ZnCl_2)	0,05 g
kobber(II)chlorid (CuCl_2)	0,03 g
natriummolybdatdihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
cobalt(II)chloridhexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
nikkel(II)chloridhexahydrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Opløses i fortyndingsvand (punkt 14) og fortyndes til:	1 000 ml«

A.14 Punkt 25: Indledende test

Det er vigtigt, at der gennemføres en indledende test som beskrevet i punkt 24, bortset fra at koncentrationen af slamfaststoffer skal være en hundrededel af det oplyste, dvs. 0,1 g/l, 0,2 g/l og 0,4 g/l. Varigheden af inkubationen skal være mindst syv dage.

Bemærk: I ringtesten (5) var headspacevolumenet alt for højt, nemlig 75 % af det samlede volumen; det skal ligge inden for det anbefalede interval på 10-40 %. Det relevante kriterium er, at det producerede volumen gas ved en inhibering på ca. 80 % skal kunne måles med tilstrækkelig præcision (f.eks. ± 5 % til ± 10 %).

A.15 Punkt 26-30: Tilsætning af testkemikalie, inokulum og substrat

Tilsætningen foregår på samme måde som beskrevet i disse punkter, men substratopløsningen (punkt 17) erstattes af testsubstratet plus gærekstraktssubstrat (A.11).

Slutkoncentrationen af tørre slamfaststoffer reduceres desuden fra 2-4 g/l til $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). To eksempler på tilsætning af komponenter til testblandingen fremgår af tabel A.1, som erstatter tabellen i punkt 29.

A.16 Stk. 33: Inkubering af kolber

På grund af den forventede lavere gasproduktionshastighed skal inkubationsperioden være på mindst syv dage.

A.17 Punkt 34: Trykmålinger

Der bruges samme fremgangsmåde til måling af trykket i kolbernes headspace som beskrevet i punkt 34, hvis mængderne i gasfasen skal angives. Hvis de samlede mængder CO_2 plus CH_4 skal måles, reduceres væskefasens pH-værdi til ca. 2 ved indsprøjtning af H_3PO_4 i hver relevant koble og måling af trykket efter 30 minutters omrystning ved testtemperaturen. Der kan dog opnås flere oplysninger om inokulumets kvalitet ved at måle trykket i hver kolbe før og efter tilsætning af syre. Hvis CO_2 -produktionen f.eks. er langt højere end methanproduktionen, kan de gærende bakteriers følsomhed have ændret sig, og/eller det er fortrinsvis de methandannende bakterier, der påvirkes af testkemikaliets.

A.18 Punkt 36: pH-måling

Hvis der skal bruges H_3PO_4 , vil nogle ekstra kolber, hvortil der ikke tilsættes H_3PO_4 , skulle opstilles specifikt til pH-målingen.

HENVISNING:

T. Madsen, H. B. Rasmussen og L. Nilsson (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals, Project No.336, Vandkvalitetsinstituttet, Miljøstyrelsen, København, Danmark.

Tabel A.1.

Eksempler på testopstilling for testpartier

Bestanddele i reaktionsblandingen	Eksempel 1	Eksempel 2	Normal tilsætningsrækkefølge
Koncentration af fremstillet inokulum (g/l)	0,42	2,1	—
Volumen tilsat inokulum (ml)	45	9	4
Koncentration af inokulum i testkolber (g/l)	0,20	0,20	—
Volumen tilsat testsubstrat (ml)	9	9	2
Volumen tilsat fortyndingsvand (ml)	36	72	3
Koncentration af gærekstrakt i testkolber (g/l)	9,7	9,7	—
Volumen stamopløsning af testkemikalie (ml)	3	3	1
Samlet volumen væske (ml)	93	93	—

*Tillæg 5***Definitioner**

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

C.35 TOKSICITETSTEST — SEDIMENT/VAND PÅ LUMBRICULUS MED FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 225 (2007). Endobentiske sedimentædere risikerer potentielt høj eksponering for sedimentbundne kemikalier og bør derfor være genstand for særlig fokus, f.eks. (1), (2), (3). Blandt disse sedimentædere spiller akvatiske oligochaeter en vigtig rolle i akvatiske systemers sedimenter. Ved bioturbation af sedimentet og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af sådanne kemikalier for andre organismer, f.eks. bentivore fisk. I modsætning til epibentiske organismer, graver endobentiske akvatiske oligochaeter (f.eks. *Lumbriculus variegatus*) sig ned i sedimentet og indtager sedimentpartikler under sedimentoverfladen. Dermed eksponeres testorganismene for testkemikaliets via alle mulige optagelsesveje (f.eks. kontakt med og indtagelse af forurenede sedimentpartikler, men også via porevand og overliggende vand).
2. Denne testmetode har til formål at vurdere virkningerne af længerevarende eksponering af den endobentiske oligochaet *Lumbriculus variegatus* (Müller) for sedimentassocierede kemikalier. Den er baseret på eksisterende testprotokoller for sedimenttoksicitet og bioakkumulering, f.eks. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoden er beskrevet for statiske testbetingelser. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af sediment med testkemikaliets. Brug af spiket sediment skal simulere et sediment, der er forurenet med testkemikaliets.
3. Kemikalier, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad flere veje. Den relative betydning af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af det pågældende kemikalies fysisk-kemiske egenskaber og dets skæbne i dyret i sidste ende. Ved stærkt adsorberende kemikalier (f.eks. med $\log K_{ow} > 5$) eller ved kemikalier, der bindes kovalent til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere sådanne kemikaliers toksicitet, tilsættes det foder, der er nødvendigt for testorganismens reproduktion og vækst, til sedimentet inden tilsætning af testkemikaliets (11). Den beskrevne testmetode er tilstrækkeligt detaljeret til, at testen kan gennemføres, og samtidig er der mulighed for tilpasninger til forsøgsdesignet afhængigt af betingelserne i de enkelte laboratorier og testkemikaliers forskellige egenskaber.
4. Testmetoden har til formål at bestemme et testkemikalies virkning på testorganismernes reproduktion og biomasse. De målte biologiske parametre er det samlede antal overlevende orme og biomassen (tørvægt) ved afslutningen af eksponeringsperioden. Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel, for at anslå den koncentration der vil have en effekt på x % (f.eks. EC_{50} , EC_{25} og EC_{10}), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme nuleffekt-koncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC).
5. Kapitel C.27 i dette bilag, »Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet sediment« (6), indeholder mange vigtige og nyttige oplysninger om anvendelse af den præsenterede testmetode for toksicitet i sediment. Dette dokument dannede således udgangspunkt for de nødvendige ændringer med henblik på gennemførelse af toksicitetstest i sediment med *Lumbriculus variegatus*. Der henvises desuden bl.a. til ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), the U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) og ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). Praktisk erfaring fra ringtest af testmetoden ((13), ringtestrapport) og oplysninger fra litteraturen var desuden vigtige kilder til information ved udarbejdelsen af dette dokument.

BETINGELSER OG RETNINGSLINJER

6. Oplysninger om testkemikaliets, såsom sikkerhedsforanstaltninger, korrekte opbevaringsbetingelser og analysemetoder, bør indhentes, før undersøgelsen indledes. For kemikalier, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der vejledning i (14).

7. Før en test gennemføres, skal der foreligge følgende oplysninger om testkemikaliets:
 - generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed
 - damptryk
 - vandopløselighed.
8. Det vil være hensigtsmæssigt at have følgende supplerende oplysninger, inden testen påbegyndes:
 - octanol/vand-fordelingskoefficient, K_{ow}
 - organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient, udtrykt som K_{oc}
 - hydrolyse
 - fototransformation i vand
 - bionedbrydelighed
 - overfladespænding.
9. Oplysninger om visse egenskaber for det sediment, der skal bruges, bør indhentes, inden testen påbegyndes (7). Nærmere oplysninger findes i punkt 22-25.

PRINCIP FOR TESTEN

10. Orme i ensartet fysiologisk tilstand (synkroniseret som beskrevet i tillæg 5) eksponeres for en serie koncentrationer af giftstof tilsat til sedimentfasen i et sediment- og vandsystem. Der bør bruges syntetisk sediment og rekonstitueret vand som substrater. Testbeholdere uden tilsat testkemikalie fungerer som kontroller. Testkemikaliets tilsættes sedimentet samlet for hvert koncentrationsniveau for at minimere variabiliteten mellem replikater af hvert koncentrationsniveau, og testorganismerne anbringes derefter i testbeholderne, hvori sediment- og vandkoncentrationerne er blevet ækvilibreret (se punkt 29). Testdyrene eksponeres for sediment- og vandsystemerne i en periode på 28 dage. I lyset af det syntetiske sediments lave næringsstofindhold bør sedimentet justeres med en fødekilde (se punkt 22-23 og tillæg 4), for at sikre at ormene vokser og formerer sig under kontrolbetingelserne. På den måde sikres det, at testdyrene eksponeres gennem vandet og sedimentet såvel som gennem deres føde.
11. Det foretrukne endepunkt for denne type undersøgelse er EC_x (f.eks. EC_{50} , EC_{25} og EC_{10} ; effektkoncentration, som har indvirkning på x % af testorganismerne) for henholdsvis reproduktion og biomasse sammenlignet med kontrollen. Det skal dog bemærkes, at EC_{50} betragtes som det stærkeste endepunkt som følge af den store usikkerhed, der er forbundet med lav EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{25}) med ekstremt høje 95 % konfidensgrænser (f.eks. (15)), og den statistiske styrke, der beregnes under hypotesetesten. Derudover kan nuleffekt-koncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) beregnes for biomasse og reproduktion, hvis testdesign og -data giver mulighed for at foretage disse beregninger (se punkt 34-38). Testdesignet afhænger af formålet med undersøgelsen, dvs. beregning af EC_x eller NOEC.

REFERENCETEST

12. De resultater, der opnås med kontrolorganismerne, forventes at være tilstrækkelig dokumentation for, at laboratoriet er i stand til at gennemføre testen, og — såfremt der foreligger historiske data — for testens repeterbarhed. Derudover kan referencetoksicitetstest gennemføres med regelmæssige mellemrum med et referencegiftstof for at vurdere testorganismernes følsomhed. 96 timers referencetoksicitetstest i vand alene er tilstrækkeligt til at dokumentere testdyrenes følsomhed og tilstand (4)(7). Oplysninger om pentachlorphenols (PCP) toksicitet i fuldstændige test (28 dages eksponering for spiket sediment) fremgår af tillæg 6 og af rapporten om ringtesten af testmetoden (13). PCP's akutte toksicitet i vand alene er f.eks. beskrevet i (16). Disse oplysninger kan bruges til at sammenligne testorganismeres følsomhed i referencetest med PCP som referencegiftstof. Kaliumchlorid (KCl) eller kobbersulphat ($CuSO_4$) er blevet anbefalet som referencegiftstoffer med *L. variegatus* (4)(7). På nuværende tidspunkt er det vanskeligt at fastlægge kvalitetskriterier på grundlag af toksicitetsdata for KCl, da der mangler data i litteraturen om *L. variegatus*. Oplysninger om kobbers toksicitet for *L. variegatus* kan findes i (17)-(21).

TESTENS VALIDITET

13. Hvis en test skal være gyldig, skal følgende betingelser være opfyldt:

- En ringtest (13) har vist, at for *Lumbriculus variegatus* skal det gennemsnitlige antal levende orme pr. replikat i kontrollerne mindst være steget med en faktor 1,8 ved afslutningen af eksponeringsperioden i forhold til antal orme pr. replikat i begyndelsen af eksponeringsperioden.
- Det overliggende vands pH-værdi bør være på 6-9 under hele testen.
- Iltkoncentrationen i det overliggende vand må ikke være på under 30 % af luftmætningsværdien (ASV) ved testtemperaturen under testen.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testsystem

14. Et statisk system uden udskiftning af det overliggende vand anbefales. Hvis sediment/vand-forholdet (se punkt 15) er korrekt, vil forsigtig beluftning normalt være tilstrækkeligt til at holde vandkvaliteten på et acceptabelt niveau for testorganismerne (f.eks. maksimere niveauerne af opløst ilt og minimere opbygning af ekskretionsprodukter). Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med periodisk eller kontinuerlig udskiftning af det overliggende vand bør kun bruges i særlige tilfælde, eftersom løbende udskiftning af det overliggende vand må forventes at påvirke kemikaliets ligevægt (f.eks. tab af testkemikalie fra testsystemet).

Testbeholdere og -apparat

15. Eksponeringen bør foregå i 250 ml-glasbægre, der måler 6 cm i diameter. Andre egnede glasbeholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sedimentet. Hver beholder bør indeholde et lag af formuleret sediment på ca. 1,5-3 cm. Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Beholderne skal have en passende kapacitet i forhold til belastningsgraden, dvs. det antal orme, der tilsættes pr. vægtenhed sediment (se også punkt 39).
16. Testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testkemikalierne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inert materiale. Det skal sikres, at ingen dele af udstyret indeholder materialer, som kan opløses, absorbere testkemikalierne eller afgive andre kemikalier og have en skadelig virkning på testorganismerne. Der bør bruges polytetrafluorethylen (PTFE), rustfrit stål og/eller glas til alt udstyr, der kommer i berøring med testsubstraterne. Det kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas til organiske kemikalier, der har vist sig at adsorbere til glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug.

Testarter

17. De testarter, der bruges til denne type undersøgelse er ferskvandsoligochaeten *Lumbriculus variegatus* (Müller). Denne art er tolerant over for en lang række sedimenttyper og bruges i vid udstrækning til testning af sedimenttoksicitet og bioakkumulering [f.eks. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Testdyrenes oprindelse, bekræftelsen af arternes identitet (f.eks. (36)) og dyrkningsbetingelserne oplyses i rapporten. Identifikation af arten kræves ikke før hver test, hvis organismerne kommer fra en intern bestand.

Dyrkning af testorganismer

18. For at have et tilstrækkeligt antal orme til at gennemføre toksicitetstest i sediment bør ormene holdes i en permanent laboratoriekultur. Vejledning i laboratoriedyrkningsmetoder for *Lumbriculus variegatus* og kilder til starterkulturer er anført i tillæg 5. Oplysninger om dyrkning af denne art findes i (3), (7), (27).
19. For at sikre at testen gennemføres med dyr af samme art, anbefales det på det kraftigste at etablere kulturer med kun en art. Sørg for, at kulturerne og især de orme, der bruges i testen, er fri for synlige sygdomme eller misdannelser.

Vand

20. Kunstigt fremstillet ferskvand i henhold til kapitel C.1 i dette bilag (37) anbefales til brug som overliggende vand i testene; det kan også bruges til laboratoriekulturerne med ormene (oplysninger om klargøring findes i tillæg 2). Der kan om nødvendigt bruges råvand. Det valgte vand skal være af en sådan kvalitet, at testarten vokser og formerer sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at dens udseende eller adfærd bliver unormal. *Lumbriculus variegatus* har vist sig at overleve, vokse og formere sig i denne type vand (30), og der opnås maksimal standardisering af test- og kulturbetingelser. Hvis der bruges rekonstitueret vand, anføres sammensætningen heraf i rapporten, og vandet bør inden brug karakteriseres i det mindste med pH-værdi, iltindhold og hårdhed (udtrykt som mg CaCO_3/l). En analyse af vandet for mikroforurenere før brug kan give nyttige oplysninger (se f.eks. tillæg 3).
21. Det overliggende vands pH skal ligge i intervallet 6,0-9,0 (se punkt 13). Hvis der forventes øget udvikling af ammoniak, bør pH holdes mellem 6,0 og 8,0. Ved testning af f.eks. svage organiske syrer tilrådes det at justere pH ved at tilsætte buffer til det vand, der skal bruges i testen, jf. f.eks. (16). Hårdheden for det vand, der skal bruges i testen, bør være på 90-300 mg CaCO_3 pr. liter for råvand. I tillæg 3 sammenfattes de øvrige kriterier for acceptabelt fortyndingsvand i henhold til OECD Guideline 210 (38).

Sediment

22. Da uforurenede naturlige sedimenter fra en bestemt kilde måske ikke er tilgængelige hele året, og da hjemmehørende organismer og tilstedeværelsen af mikroforurenere kan påvirke testen, anbefales det at bruge et formuleret sediment (også kaldet kunstigt fremstillet eller syntetisk sediment). Brug af et formuleret sediment minimerer testbetingelsernes variabilitet og tilførsel af hjemmehørende fauna. Følgende formulerede sediment er baseret på det syntetiske sediment i (6), (39) og (40). Det anbefales til brug i denne type test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- a) 4-5 % (tørvægt) sphagnum; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv — nedbrydningsgrad: »middel« — findelt (partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm) og kun lufttørret.
 - b) 20 % $\pm$ 1 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit.
 - c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (finsand af en partikelstørrelse på ≤ 2 mm, men > 50 % af partiklerne skal være 50-200 μm).
 - d) Deioniseret vand, 30-50 % af sediment (tørvægt), ud over de tørre sedimentkomponenter.
 - e) Kemisk rent calciumcarbonat (CaCO_3) tilsættes for at justere pH-værdien i den færdige sedimentblanding.
 - f) Det samlede organiske kulstofindhold (TOC) i den færdige blanding skal være 2 % ($\pm 0,5$ %) af sedimentet (tørvægt) og justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).
 - g) Foder, f.eks. pulveriserede blade af brændenælde (*Urtica* sp., i overensstemmelse med farmaceutiske standarder, til konsum), eller en blanding af pulveriserede blade af brændenælde og α -cellulose (1: 1), 0,4-0,5 % af sedimentet (tørvægt), ud over de tørre sedimentkomponenter; flere oplysninger findes i tillæg 4.
23. Oprindelsen af tørv, kaolinler, fodermateriale og sand skal være kendt. Ud over litra g) indeholder kapitel C.27 i dette bilag (6) en liste over andre plantematerialer, der kan bruges som næringskilde: tørrede blade af morbær (*Morus alba*), hvidkløver (*Trifolium repens*), spinat (*Spinacia oleracea*) eller korngræs.
24. Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Den valgte fødekilde bør som minimum give mulighed for acceptabel reproduktion i kontrollerne. En analyse af det syntetiske sediment eller dets bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger. Et

eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 4. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret (se også punkt 25 og tillæg 4). Det syntetiske sediment bør som minimum karakteriseres ved bestanddelenes oprindelse, kornstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), samlet organisk kulstofindhold (TOC), vandindhold og pH. Måling af redoxpotentiale er valgfri.

25. Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlige sedimenter fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssediment (3). Hvis naturligt sediment anvendes, skal det dog som minimum karakteriseres med oprindelse (udtagningssted), pH og ammoniak i porevandet, samlet organisk kulstofindhold (TOC) og kvælstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og vandindhold i procent (7), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde testorganismerne. Måling af redoxpotentiale og kationbytningskapacitet er valgfri. Inden naturligt sediment tilsættes testkemikalien, bør det desuden konditioneres i syv dage, under de betingelser der anvendes i den efterfølgende test. Ved udløbet af denne konditioneringsperiode fjernes og kasseres det overliggende vand.
26. Det anvendte sediment skal være af en sådan kvalitet, at kontrolorganismerne overlever og formerer sig i eksponeringsperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Kontrolormene bør grave sig ned i sedimentet og indtage det. Reproduktionen i kontrollerne skal som minimum opfylde validitetskriterierne i punkt 13. Tilstedeværelsen eller fraværet af fækale pellets på sedimentoverfladen, som indikerer, at orme indtager sedimentet, registreres og kan være nyttig ved fortolkningen af testresultaterne med hensyn til eksponeringsveje. Der kan opnås yderligere oplysninger om indtagelse af sediment ved anvendelse af de metoder, der er beskrevet i (24), (25), (44) og (45), som indeholder nærmere oplysninger om indtagelse af sediment og partikelselektion i testorganismerne.
27. Procedurer for håndtering af naturlige sedimenter inden brug i laboratoriet er beskrevet i (3), (7) og (12). Den procedure for klargøring og opbevaring af syntetisk sediment, det anbefales at bruge i Lumbriculus-testen, er beskrevet i tillæg 4.

Tilsætning af testkemikalien

28. Testkemikalien skal tilsættes til sedimentet. Da de fleste testkemikalier forventes at have lav vandopløselighed, bør de opløses i et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone, n-hexan, cyclohexan) i et så lille volumen som muligt for at klargøre stamopløsningen. Stamopløsningen fortyndes med det samme opløsningsmiddel for at klargøre testopløsningerne. Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af testkemikalien i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af et egnet opløsningsmiddel. Der skal bruges samme volumen af den tilsvarende opløsning til hvert koncentrationsniveau. Den samlede mængde kemikalie tilsættes til sedimentet for hvert koncentrationsniveau for at minimere variabiliteten mellem testkemikaliekoncentrationen i de enkelte replikater. Hver af testopløsningerne blandes dernæst med kvartssand som beskrevet i punkt 22 (f.eks. 10 g kvartssand pr. testbeholder). Det har vist sig, at et volumen på 0,20-0,25 ml pr. g sand er tilstrækkeligt til at gennembløde kvartssandet helt. Derefter skal opløsningsmidlet inddampes til tørhed. For at minimere tab af testkemikalie ved co-inddampning (f.eks. afhængigt af kemikaliet damptryk) skal det coatede sand bruges umiddelbart efter tørring. Det tørre sand blandes med en passende mængde formuleret sediment med et tilsvarende koncentrationsniveau. Den mængde sand, der findes i testkemikalie/sand-blandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sedimentet skal således fremstilles med mindre sand). Den største fordel ved denne fremgangsmåde er, at der stort set ikke tilsættes noget opløsningsmiddel til sedimentet (7). Alternativt, f.eks. ved sediment fra marker, kan testkemikalien tilsættes ved spiking af en tørret og findelt del af sedimentet som beskrevet ovenfor for kvartssand eller ved omrøring af testkemikalien i det våde sediment, med efterfølgende afdampning af eventuelt opløsningsmiddel. Det skal sikres, at det testkemikalie, der tilsættes sedimentet, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bekræfte målkonzentrationsniveauet i sedimentet og bestemme graden af homogenitet. Det kan også være nyttigt at analysere delprøver af testopløsningerne for at bekræfte målkonzentrationsniveauet i sedimentet. Eftersom der bruges et opløsningsmiddel til at belægge kvartssandet med testkemikalien, bør der anvendes en opløsningsmiddelkontrol, som er fremstillet med samme mængde opløsningsmiddel som testsedimenterne. Den anvendte spiking-metode og årsagerne til at vælge en anden spiking-metode, end den der er beskrevet ovenfor, skal anføres i rapporten. Spiking-metoden kan tilpasses til testkemikaliet fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. for at forhindre tab som følge af fordampning under spiking eller ækvilibrering. Supplerende vejledning om spiking-metoder findes i Environment Canada (1995) (46).

29. Når det spikede sediment er klargjort, fordelt i replikattestbeholderne og overhældt med testvand, afventes det, at testkemikaliets koncentration fordeler sig fra sedimentet til den vandige fase (f.eks. (3)(7)(9)). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger) (f.eks. (27)(47)). I denne test afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer til syv dage anbefales. På den måde minimeres testkemikaliets nedbrydningstid. Afhængigt af undersøgelsens formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan det spikede sediment ækvilibreres eller ældes i længere tid.
30. Efter denne ækvilibreringstid udtages der som minimum prøver af det overliggende vand og bulksedimentet, som minimum ved den højeste koncentration og en lavere koncentration, med henblik på analyse af testkemikaliekoncentrationen. Disse analytiske bestemmelser af testkemikaliets koncentration bør gøre det muligt at beregne massebalancen og angive resultater baseret på målte startkoncentrationer. Generelt forstyrrer eller ødelægger prøveudtagning sediment- og vandsystemet. Derfor er det normalt ikke muligt at bruge de samme replikater til prøveudtagning af sediment og orme. Der skal opstilles yderligere »analysebeholdere« med passende dimensioner, som behandles på samme måde (herunder tilstedeværelsen af testorganismer), men som ikke bruges til biologiske observationer. Der vælges dimensioner for beholderne, der giver de prøvemængder, som er påkrævet i henhold til analysemetoden. Nærmere oplysninger om prøveudtagning er beskrevet i punkt 53.

UDFØRELSE AF TESTEN

Indledende test

31. Hvis der ikke foreligger oplysninger om testkemikaliets toksicitet for *Lumbricus variegatus*, kan det være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment for at bestemme det interval af koncentrationer, der skal testes i den endelige test, og optimere testbetingelserne for den endelige test. Til det formål anvendes en række vidt forskellige koncentrationer af testkemikaliets koncentration. Ormene eksponeres for hver koncentration af testkemikaliets koncentration i en periode (f.eks. 28 dage som i den endelige test), der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer; der kræves ingen replikater. Ormenes adfærd, f.eks. undgåelse af sediment, som kan skyldes testkemikaliets koncentration og/eller sedimentet, observeres og registreres under en indledende test. Koncentrationer på over 1 000 mg/kg sediment (tørvægt) bør ikke testes i den indledende test.

Endelig test

32. I den endelige test bør der mindst bruges og udvælges fem koncentrationer, f.eks. baseret på resultaterne af den indledende test til bestemmelse af dosisinterval (punkt 31) og som beskrevet i punkt 35, 36, 37 og 38.
33. En kontrol (oplysninger om replikation findes i punkt 36, 37 og 38), som indeholder alle bestanddele undtagen testkemikaliets koncentration, benyttes ud over testserien. Hvis der bruges opløsningsmiddel til tilsætning af testkemikaliets koncentration, må det ikke have nævneværdig indvirkning på testorganismerne, hvilket kan afsløres ved en yderligere kontrol, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

Testdesign

34. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas ved hvert koncentrationniveau samt antal orme pr. testglas. Design for beregning af EC_x , beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest er beskrevet i punkt 35, 36, 37 og 38.
35. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Ekstrapolering langt under den laveste koncentration, der har indvirkning på testorganismerne, eller over den højeste testede koncentration bør undgås. Hvis der — i særlige tilfælde — foretages en sådan ekstrapolering, skal rapporten indeholde en fyldestgørende forklaring.

36. Hvis EC_x skal anslås, skal der testes mindst fem koncentrationer og mindst tre replikater for hver koncentration; det anbefales at bruge seks replikater til kontrollen eller — hvis en sådan anvendes — opløsningsmiddelkontrollen for at forbedre beregningen af kontrolvariabiliteten. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre koncentrationsresponskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med responser i intervallet 5-95 % forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen.
37. Hvis LOEC/NOEC-værdierne skal anslås, skal der bruges mindst fem testkoncentrationer med mindst fire replikater (det anbefales at bruge seks replikater til kontrollen eller — hvis en sådan anvendes — opløsningsmiddelkontrollen for at forbedre beregningen af kontrolvariabiliteten), og faktoren mellem koncentrationerne bør ikke overstige to. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.
38. Der kan gennemføres en grænsetest (med en testkoncentration og kontroller), hvis der ikke forventes nogen virkninger op til 1 000 mg/kg sediment (tørvægt) (f.eks. fra en indledende test til bestemmelse af dosisinterval), eller hvis testning ved en enkelt koncentration vil være tilstrækkelig til at bekræfte en interessant NOEC-værdi. I sidstnævnte tilfælde bør en detaljeret begrundelse for valg af grænsekonzentration fremgå af testrapporten. Formålet med grænsetesten er at udføre en test ved en koncentration, der er høj nok til, at beslutningstagere kan udelukke mulige toksiske virkninger af testkemikaliets, og grænsen fastsættes til en koncentration, der ikke forventes at forekomme under nogen omstændigheder. 1 000 mg/kg (tørvægt) anbefales. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgrupperne. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.

Eksponeringsbetingelser

Testorganismer

39. Testen udføres med mindst ti orme for hvert replikat, der anvendes til bestemmelse af biologiske parametre. Antallet af orme svarer til ca. 50-100 mg våd biomasse. Hvis det antages, at tørstofindholdet er på 17,1 % (48), giver det ca. 9-17 mg tør biomasse pr. beholder. U.S. EPA (2000 (7)) anbefaler at bruge en belastningsgrad, der ikke overstiger 1: 50 (tør biomasse: TOC). For det formulerede sediment, der er beskrevet i punkt 22, svarer det til ca. 43 g sediment (tørvægt) pr. ti orme ved et TOC-indhold på 2,0 % tørt sediment. I tilfælde hvor der bruges over ti orme pr. beholder, justeres mængden af sediment og overliggende vand tilsvarende.
40. De orme, der bruges i en test, skal alle komme fra samme kilde og skal være dyr i ensartet fysiologisk tilstand (se tillæg 5). Der bør vælges orme af samme størrelse (se punkt 39). Det anbefales, at man inden testen foretager et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af ormepartiet eller -bestanden.
41. De orme, der skal bruges i en test, fjernes fra kulturen (flere oplysninger findes i tillæg 5). Store (voksne) dyr, der ikke viser tegn på nylig fragmentering, flyttes til glasskåle (f.eks. petriskåle), som indeholder rent vand. De synkroniseres derefter som beskrevet i tillæg 5. Efter regenerering i en periode på 10-14 dage anvendes de intakte hele orme af samme størrelse, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne (f.eks. for så vidt angår temperatur, lysforhold og overliggende vand), bør en akklimatiseringsfase på f.eks. 24 timer med samme temperatur, lysforhold og overliggende vand som i testen være nok til at tilpasse ormene til testbetingelserne. De tilpassede oligochaeter bør fordeles vilkårligt i testbeholderne.

Fodring

42. Eftersom foder tilsættes til sedimentet inden (eller samtidig med) tilsætningen af testkemikaliets, fodres ormene ikke yderligere under testen.

Lys og temperatur

43. Lysperioden i kulturen og testen er normalt på 16 timer (3), (7). Lysintensiteten skal være lav (f.eks. 100-500 lux) for at imitere de naturlige forhold ved sedimentoverfladen og skal måles mindst en gang i eksponeringsperioden. Temperaturen skal være $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i hele testen. Temperaturforskellen mellem testbeholderne må ikke — på en given målingsdato — overstige $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Testbeholderne anbringes randomiseret i testinkubatoren eller testområdet, bl.a. for at minimere skævheder i reproduktionen som følge af beholderens placering.

Beluftning

44. Det overliggende vand i testbeholderen beluftes forsigtigt (f.eks. 2-4 bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteurpipette, der er anbragt ca. 2 cm over sedimentoverfladen med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til under 30 % af luftmætningsværdien (ASV). Luftforsyningen skal kontrolleres og — om nødvendigt — justeres mindst en gang om dagen på arbejdsdage.

Målinger af vandkvaliteten

45. Følgende vandkvalitetsparametre måles i det overliggende vand:

Temperatur:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; temperaturen i det omgivende substrat (omgivende luft eller vandbad) kan, hvis det er muligt, desuden registreres f.eks. en gang i timen
Opløst iltindhold:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; udtrykt som mg/l og % ASV (air saturation value — luftmætningsværdi)
Lufttilførsel:	kontrolleres mindst en gang om dagen på arbejdsdage og justeres om nødvendigt.
pH:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden
Vandets samlede hårdhed:	i mindst en kontrolreplikant og en testbeholder ved den højeste koncentration i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; udtrykt som mg/l CaCO_3
Samlet ammoniakindhold:	i mindst en kontrolreplikant og en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau i begyndelsen af eksponeringsperioden og efterfølgende tre gange om ugen; udtrykt som mg/l NH_4^+ eller NH_3 eller total ammoniak-N.

Hvis måling af vandkvalitetsparametre kræver, at der fjernes større vandprøver fra beholderne, kan det være tilrådeligt at opstille særskilte beholdere til vandkvalitetsmålinger, således at der ikke ændres på volumenforholdet mellem vand og sediment.

Biologiske observationer

46. Under eksponeringen observeres testbeholderne med henblik på visuel vurdering af eventuelle adfærdsmæssige forskelle hos ormene (f.eks. undgåelse af sediment, synlige fækale pellets på sedimentoverfladen) i forhold til kontrollerne. Observationer registreres.

47. Ved afslutningen af testen undersøges hver replikat (yderligere beholdere, der skal underkastes kemisk analyse, kan udelukkes fra undersøgelsen). Der anvendes en passende metode til at opsamle alle ormene fra testbeholderen. Det skal sikres, at alle ormene opsamles, uden at de beskadiges. En metode kan være at sigte ormene fra sedimentet. Der kan bruges et net af rustfrit stål med passende maskestørrelse. Det meste af det overliggende vand dekanteres omhyggeligt, og det resterende sediment og vand omrystes til en opslæmning, der kan hældes gennem sigten. Med en maskestørrelse på 500 µm vil de fleste af sedimentpartiklerne passere sigten meget hurtigt; sigtningen bør dog ske hurtigt for at forhindre orme i at krybe ind i eller gennem nettet. En maskestørrelse på 250 µm vil forhindre ormene i at krybe ind i eller gennem nettet; det skal dog sikres, at så få sedimentpartikler som muligt forbliver på nettet. Den sigtede opslæmning fra hver replikatbeholder kan hældes gennem sigten endnu en gang, for at sikre at alle orme er opsamlet. En alternativ metode kan være at opvarme sedimentet ved at anbringe testbeholderne i et vandbad ved 50-60 °C; ormene vil forlade sedimentet og kan indsamles fra sedimentoverfladen med en flammepoleret pipette med bred åbning. En anden alternativ metode kan være at fremstille en sedimentopslæmning og hælde denne opslæmning ud i en lav skål af en passende størrelse. Ormene kan opsamles fra det lave lag opslæmning med en stål nål eller en urmagerpincet (som skal bruges mere som en gaffel end en pincet for at undgå at skade ormene) og overføres til rent vand. Når ormene er adskilt fra sedimentopslæmningen, skylles de i testsubstrat og tælles.
48. Uanset hvilken metode der bruges, skal laboratorier dokumentere, at deres personale gennemsnitligt kan opsamle mindst 90 % af organismene fra alt sedimentet. Et vist antal testorganismer kan f.eks. tilsættes til kontrolsediment eller testsedimenter, hvorefter genfindingsgraden kan bestemmes efter en time (7).
49. Det samlede antal levende og døde individer pr. replikat registreres og vurderes. Følgende grupper af orme betragtes som døde:
- a) der er ingen reaktion på en let, mekanisk påvirkning
 - b) der er tegn på nedbrydning (kombineret med litra a)
 - c) antallet af manglende orme
- De levende orme kan tilhøre en af tre grupper:
- a) store hele orme (voksne) uden regenererede kropsområder
 - b) hele orme med regenererede kropsområder med en lysere farve (dvs. med ny bagende, med ny forende eller med både ny forende og ny bagende)
 - c) ikke hele orme (dvs. orme, der er blevet delt for nylig, og som ikke har regenereret de manglende kropsområder)
- Disse yderligere observationer er ikke obligatoriske, men kan bruges til yderligere fortolkning af de biologiske resultater (f.eks. kan et højere antal orme i gruppe c indikere forsinket reproduktion eller regenerering ved en given behandling). Hvis der observeres forskelle i udseende (f.eks. læsioner i de integumente, ødematiske kropsområder) mellem behandlede orme og kontrolorme, registreres disse.
50. Umiddelbart efter tælling/vurdering overføres de levende orme, der er fundet i hver replikat, til tørrede, forvejede og mærkede vægtskåle (en pr. replikat) og aflives med en dråbe ethanol pr. vægtskål. Vægtskålene anbringes i en tørreovn ved 100 °C ± 5 °C til tørring natten over, hvorefter de vejes efter afkøling i en ekssikator, og ormenes tørvægt bestemmes (fortrinsvis i g, mindst fire decimaler).
51. Ud over den samlede tørvægt kan den askefri tørvægt bestemmes som beskrevet i (49) for at tage højde for uorganiske komponenter fra indtaget sediment i ormenes fordøjelseskanal.
52. Biomassen bestemmes som den samlede biomasse pr. replikat, herunder voksne orme og afkom. Døde orme tages ikke i betragtning ved bestemmelse af biomasse pr. replikat.

Kontrol af testkemikaliekoncentrationer

Prøveudtagning

53. Der udtages prøver til kemisk analyse af testkemikaliet som minimum ved den højeste koncentration og en lavere koncentration og som minimum ved afslutningen af ækvilibreringsfasen (inden tilsætning af testorganismerne) og ved afslutningen af testen. Der udtages som minimum prøver til analyse af bulksedimentet og det overliggende vand. Der udtages mindst to prøver pr. matrix og behandling på hver prøvetagningsdato. En af duplikatprøverne kan opbevares som reserve (f.eks. til analyse i tilfælde af at den oprindelige analyse afviger mere end 20 % fra den nominelle koncentration). Hvis der er tale om specifikke kemiske egenskaber, f.eks. hvis der forventes hurtig nedbrydning af testkemikaliet, kan analyseplanen justeres (f.eks. hyppigere prøveudtagning, analyse af flere koncentrationsniveauer) på baggrund af en ekspertvurdering. Der kan så udtages prøver på mellemliggende prøvetagningsdatoer (f.eks. på dag syv efter eksponeringens start).
54. Der udtages prøver fra det overliggende vand ved omhyggeligt at dekantere eller opsuge det overliggende vand med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet. Prøvernes volumen registreres.
55. Når det overliggende vand er fjernet, homogeniseres sedimentet, og det overføres til en passende beholder. Den våde sedimentprøves vægt registreres.
56. Hvis der er brug for yderligere analyse af testkemikaliet i porevandet, centrifugeres de homogeniserede og vejede sedimentprøver for at opsamle porevandet. Eksempelvis kan ca. 200 ml vådt sediment fyldes i 250 ml-centrifugebægre. Derefter centrifugeres prøverne uden filtrering for at isolere porevandet, f.eks. ved $10\,000 \pm 600 \times g$ i 30-60 minutter ved en temperatur, der ikke overstiger testtemperaturen. Efter centrifugering dekanteres supernatanten, eller den pipetteres, idet det sikres, at der ikke indsamles sedimentpartikler, og volumenet registreres. Den tilbageværende sedimentpellets vægt registreres. Det kan lette vurderingen af massebalancen eller genfindingen af testkemikaliet i vand- og sedimentsystemet, hvis sedimentets tørvægt bestemmes på hver prøvetagningsdato. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.
57. Foretages analyserne ikke med det samme, opbevares prøverne hensigtsmæssigt, f.eks. under de opbevaringsbetingelser, der anbefales for minimal nedbrydning af det specifikke testkemikalie (miljøprøver opbevares f.eks. almindeligvis ved $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mørke). Der skal indhentes oplysninger om passende opbevaringsbetingelser for det specifikke testkemikalie — f.eks. opbevaringstid og -temperatur, ekstraktionsfremgangsmåder osv. — inden undersøgelsen indledes.

Analysemetode

58. 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 genfinding af testkemikaliet i vand- og sedimentprøver for den valgte metode, som minimum ved de laveste og højeste testkoncentrationer. Det kontrolleres tillige, at testkemikaliet ikke kan påvises i kontrolkamrene i koncentrationer, som ligger over bestemmelsesgrænsen. Det kan være nødvendigt at korrigere de nominelle koncentrationer for genfinding af kvalitetskontrolspikes (f.eks. når genfindingsgraden overstiger 80-120 % af den tilsatte mængde). Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. som følge af adsorption af testkemikaliet til prøvetagningsudstyret) minimeres.
59. Genfindingen af testkemikalie, bestemmelsesgrænsen og detektionsgrænsen i sediment og vand registreres og anføres i rapporten.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

60. Testens vigtigste obligatoriske responsvariable, der skal vurderes statistisk, er biomassen og det samlede antal orme pr. replikat. Reproduktion (udtrykt som stigning i antal orme) og vækst (udtrykt som stigning i tør biomasse) kan også vurderes. I dette tilfælde gives et skøn over ormenes tørvægt i begyndelsen af eksponeringsperioden f.eks. ved måling af tørvægten for en repræsentativ delprøve af det parti synkroniserede orme, der skal bruges til testen.

61. Dødelighed er ikke et endepunkt i denne test, men bør så vidt muligt vurderes. I forbindelse med vurderingen af dødeligheden betragtes de orme, der ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning, eller som udviser tegn på nedbrydning, samt de manglende orme som døde. Dødeligheden bør som minimum registreres og tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne.
62. Effektkoncentrationerne udtrykkes i mg/kg sediment (tørvægt). Hvis den målte genfinding af testkemikalie i sedimentet, eller i sediment og overliggende vand, i begyndelsen af eksponeringsperioden ligger på 80-120 % af de nominelle koncentrationer, kan effektkoncentrationerne (EC_x , NOEC, LOEC) udtrykkes på grundlag af nominelle koncentrationer. Hvis genfindingen afviger mere end 20 % fra de nominelle koncentrationer, bør effektkoncentrationerne (EC_x , NOEC, LOEC) baseres på de oprindeligt målte koncentrationer i begyndelsen af eksponeringsperioden, f.eks. under hensyntagen til testkemikaliet massebalance i testsystemet (se punkt 30). I disse tilfælde kan der indhentes yderligere oplysninger fra analyse af stamopløsninger og/eller tilsatte opløsninger, for at bekræfte at testsedimenterne blev klargjort korrekt.

EC_x

63. EC_x -værdier for de parametre, der er beskrevet i punkt 60, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Kärber-metoden eller simpel interpolation). Vejledning i statistisk analyse findes i (15) og (50). En EC_x -værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x -værdi skal middelværdierne for hver behandling ($\bar{X}$), underkastes en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

64. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Der bør anvendes passende statistiske metoder. Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliets sammenlignet med kontrollen ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0,05$. Eksempler er angivet i nedenstående punkter. Vejledning i valg af passende statistiske metoder findes i (15) og (50).
65. Normalfordelingen af data kan f.eks. testes med Kolmogorov-Smirnovs goodness-of-fit-test, Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test) eller Shapiro-Wilk-testen (tosidet, $p \leq 0,05$). Cochran's test, Levenes test eller Bartlett's test (tosidet, $p \leq 0,05$) kan bruges til at teste varianshomogeniteten. Hvis forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, varianshomogenitet) er opfyldt, kan der udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Parvise sammenligninger (f.eks. Dunnett's test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer. Ellers bør ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstra's trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

66. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandling), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons (samlet antal orme og biomasse udtrykt som ormenes tørvægt) vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.
67. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddelkontrol) kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrol- og opløsningsmiddelkontrolreplikater samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

Fortolkning af resultaterne

68. Hvis der blev afvejet fra testmetoden, og hvis der i testkoncentrationer måles koncentrationer nær den anvendte analysemetodes detektionsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed. Eventuelle fravigelser af testmetoden skal oplyses.

Testrapport.

69. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— *Testkemikalie:*

- kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af testkemikaliets kilde og identitet og koncentration af eventuelt opløsningsmiddel.
- eventuelle oplysninger om de fysiske egenskaber og fysisk-kemiske egenskaber indhentet inden påbegyndelse af testen (f.eks. vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), log K_{ow} , stabilitet i vand osv.)

— *Testede arter:*

- videnskabeligt navn, herkomst, eventuel forbehandling, akklimatisering, dyrkningsbetingelser osv.

— *Testbetingelser:*

- den anvendte testmetode (f.eks. statistisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)
- testdesign (f.eks. antal testkamre samt materiale og størrelse, vandvolumen pr. beholder, sedimentmasse og -volumen pr. beholder (ved gennemstrømningsprocedurer eller semistatiske procedurer: vandudskiftningsrate), eventuel beluftning før og under testen, antal replikater, antal orme pr. replikat i begyndelsen af eksponeringsperioden, antal testkoncentrationer, konditioneringsperiode, ækvilibrerings- og eksponeringsperioder, prøvetagningshyppighed)
- dybde af sediment og overliggende vand
- metode til forbehandling og tilsætning af testkemikalie
- nominelle testkoncentrationer, oplysninger om prøveudtagning med henblik på kemisk analyse og de analysemetoder, hvormed testkemikaliekoncentrationerne blev opnået
- sedimentets karakteristika som beskrevet i punkt 24-25 og eventuelle andre målinger, klargøring af formuleret sediment
- fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed og eventuelle andre målinger) inden påbegyndelse af testen
- detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed
- lysintensitet og lysperiode(r)
- anvendte metoder til bestemmelse af alle biologiske parametre (f.eks. prøveudtagning, kontrol, vejning af testorganismer) og alle abiotiske parametre (f.eks. vand- og sedimentkvalitetsparametre)
- volumen og/eller vægt for alle prøver til kemisk analyse
- detaljerede oplysninger om, hvordan alle prøver til kemisk analyse er behandlet, herunder klargøring, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for testkemikaliets samt genfindning af testkemikaliets.

— Resultater:

- vandkvaliteten i testbeholderne (pH, temperatur, koncentration af opløst ilt, hårdhed, ammoniakkoncentrationer og eventuelle andre målinger)
- samlet organisk kulstofindhold (TOC), forhold mellem tørvægt og vådvægt, sedimentets pH og eventuelle andre målinger
- samlet antal og — hvis det er bestemt — antal hele og ikke hele orme i hvert testkammer ved afslutningen af testen
- tørvægt af ormene i hvert testkammer ved afslutningen af testen og — hvis den er målt — tørvægt af en delprøve af ormene ved begyndelsen af testen
- eventuel observeret unormal adfærd sammenlignet med kontrollerne (f.eks. undgåelse af sediment, tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets)
- eventuelle observerede dødsfald
- estimater for toksicitetsendepunkter (f.eks. EC_x, NOEC og/eller LOEC) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem
- nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle foretagne analyser med henblik på at bestemme testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne
- eventuelle afvigelser fra validitetskriterierne.

— Evaluering af resultater:

- resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i punkt 13
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

- (1) EC (2003), Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I-IV, Kontoret for De Europæiske Fællesskabers Officielle Publikationer (Europa-Kommissionen), Luxembourg.
- (2) OECD (1992a), Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment, OECD Monographs No. 60, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD), Paris.
- (3) ASTM International (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a, in: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002), Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00, i: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants, Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenset sediment.
- (7) U.S. EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, Second Edition, EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marts 2000.

- (8) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, december 1997.
- (9) I. R. Hill, P. Matthiessen og F. Heimbach (eds.) (1993), Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8.-10. november 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, redigeret af M. Streloke og H. Köpp, Berlin 1995.
- (11) C. Riedhammer og B. Schwarz-Schulz (2001), The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment, J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004), Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates, American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (15) Environment Canada (2003), Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/____.
- (16) A. Nikkilä, A. Halme og J. V. K. Kukkonen (2003), Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments, Chemosphere 51: 35-46.
- (17) H. C. Baily og D. H. W. Liu (1980), *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism, s. 205-215, in: J. C. Eaton, P. R. Parrish og A. C. Hendricks (eds), Aquatic Toxicology, ASTM STP 707, American Society for Testing and Materials.
- (18) K. K. Chapman, M. J. Benton, R. O. Brinkhurst og P. R. Scheuerman (1999), Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test, Environmental Toxicology, 14(2): 271-278.
- (19) J. S. Meyer, C. J. Boese og S. A. Collyard (2002), Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied, Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.
- (20) M. K. Schubauer-Berigan, J. R. Dierkes, P. D. Monson og G. T. Ankley (1993), pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*, Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.
- (21) C. W. West, V. R. Mattson, E. N. Leonard, G. L. Phipps og G. T. Ankley (1993), Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway, Hydrobiol. 262:57-63.
- (22) C. G. Ingersoll, G. T. Ankley, D. A. Benoit, E. L. Brunson, G. A. Burton, F. J. Dwyer, R. A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King og P. V. Winger (1995), Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications, Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (23) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (24) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998a), Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing, Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

- (25) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998b), Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller), *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) P. F. Landrum, M. L. Gedeon, G. A. Burton, M. S. Greenberg og C. D. Rowland (2002), Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998), Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) C. G. Ingersoll, E. L. Brunson, N. Wang, F. J. Dwyer, G. T. Ankley, D. R. Mount, J. Huckins, J. Petty og P. F. Landrum (2003), Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) P. Rodriguez og T. B. Reynoldson (1999), Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment, in: A. Mudroch, J. M. Azcue og P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*, Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) M. Liebig, Ph. Egeler, J. Oehlmann og Th. Knacker (2005), Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment, *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) K. Brust, O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann og R. Nagel (2001), Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams, *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, s. 2000-2007.
- (32) M. Oetken, K.-U. Ludwigowski og R. Nagel (2000), Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marts 2000.
- (33) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998), Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller), *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) R. Dermott og M. Munawar (1992), A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller), *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) C. D. Drewes og C. R. Fournier (1990), Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments, *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) R. O. Brinkhurst (1971), A guide for the identification of British aquatic oligochaeta, *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (37) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.
- (38) OECD (1992c), Guidelines for Testing of Chemicals No. 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD, Paris.
- (39) Ph. Egeler, J. Römbke, M. Meller, Th. Knacker, C. Franke, G. Studinger og R. Nagel (1997), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions, *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) M. Meller, P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel og B. Streit (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Ph. Egeler, J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke og G. Studinger (1999), Workshop on »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) B. C. Suedel og J. H. Rodgers (1993), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) C. Naylor og C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) J. L. Kaster, J. V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski og M. E. Smith (1984), Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods, *Hydrobiologia* 11, 181-184.

- (45) M. Martinez-Madrid, P. Rodriguez, J. I. Perez-Iglesias og E. Navarro (1999), Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay, *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant, Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) P. F. Landrum (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*, *Environ. Sci. Technol.* 23, 588-595.
- (48) L. T. Brooke, G. T. Ankley, D. J. Call og P. M. Cook (1996), Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates, *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 223-228.
- (49) D. R. Mount, T. D. Dawson og L. P. Burkhard (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*, *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (50) OECD 2006, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, Frankrig.
- (51) M. Liebig, M. Meller og P. Egeler (2004), Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*, Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests, 24.-25. marts 2004, BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107-119.

Supplerende litteratur om statistiske metoder:

- C. W. Dunnett (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.
- D. J. Finney (1971), *Probit Analysis* (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.
- D. J. Finney (1978), D. J. Finney, *Statistical Methods in Biological Assay*, Charles Griffin & Company Ltd, London.
- M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Berigtigelse: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1998), 417.
- S. Holm (1979), A simple sequentially rejective multiple test procedure, *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, 2nd edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- R. G. Miller Jr. (1986), *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- S. S. Shapiro og M. B. Wilk (1965), An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika* 52: 591-611.
- D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.
- D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.
-

Tillæg 1

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Konditioneringsperioden bruges til at stabilisere den mikrobielle komponent af sedimentet og fjerne f.eks. ammoniak fra sedimentets komponenter; den finder sted, inden testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Normalt kasseres det overliggende vand efter konditionering.

EC_x er den koncentration af testkemikaliet i sedimentet, der har x % (f.eks. 50 %) effekt på en biologisk parameter i løbet af en nærmere angivet eksponeringsperiode.

Ækvilibreringsperioden skal give mulighed for fordeling af testkemikaliet mellem den faste fase, porevandet og det overliggende vand; den finder sted efter tilsætning af testkemikaliet til sedimentet og inden tilsætning af testorganismerne.

Eksponeringsfasen er det tidsrum, hvori testorganismerne eksponeres for testkemikaliet.

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske komponenter i naturligt sediment.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant toksisk virkning ($p \leq 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en virkning, der mindst svarer til den, som iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p \leq 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode.

Octanol/vand-fordelingskoefficient (K_{ow} ; også betegnet P_{ow}) er forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt og er et udtryk for et kemikalies lipofilitet (kapitel A.24 i dette bilag). K_{ow} eller logaritmen for K_{ow} ($\log K_{ow}$) benyttes som rettesnor for et kemikalies potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

Organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient (K_{oc}) er forholdet mellem et kemikalies koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i sediment og kemikaliets koncentration i vand ved ligevægt.

Overliggende vand er det vand, der dækker sedimentet i testbeholderen.

Porevand eller interstitielt vand er det vand, der optager pladsen mellem sediment eller jordpartikler.

Spiket sediment er sediment, som er tilsat testkemikalie.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Sammensætning af det anbefalede rekonstituerede vand

(jf. kapitel C.1 i dette bilag (1))

a) *Calciumchloridopløsning*Opløs 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vandb) *Magnesiumsulfatopløsning*Opløs 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vandc) *Natriumhydrogencarbonatopløsning*Opløs 2,59 g NaHCO_3 i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vandd) *Kaliumchloridopløsning*

Opløs 0,23 g KCl i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Det destillerede eller deioniserede vands ledningsevne må ikke overstige $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

25 ml af hver af opløsningerne a)-d) blandes, og der fortyndes til et samlet volumen på 1 l med deioniseret vand. Summen af calcium- og magnesiumioner i disse opløsninger er 2,5 mmol/l.

Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1, og forholdet mellem Na- og K-ioner er 10:1. Syrekapaciteten $K_{\text{S}4.3}$ i denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Fortyndingsvandet beluftes, indtil der er opnået iltmætning, og opbevares i ca. to dage uden yderligere beluftning inden brug.

HENVISNING

(1) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.

Tillæg 3

Fysisk-kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

Komponent	Koncentrationer
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 µg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	< 50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider i alt + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Organisk chlor i alt	< 25 ng/l
(hentet fra OECD (1992) (1))	

HENVISNING

- (1) OECD (1992), Guidelines for Testing of Chemicals No. 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD, Paris.

Tillæg 4

Anbefalet syntetisk sediment — vejledning i klargøring og opbevaring

Sedimentbestanddele

Bestanddel	Karakteristika	% sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum — nedbrydningsgrad: »middel« — uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm) og lufttørret	$5 \pm 0,5$
Kvartssand	Kornstørrelse: ≤ 2 mm, men 50 % af partiklerne skal være 50-200 μm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinitindhold ≥ 30 %	20 ± 1
Fødekilde	f.eks. urtica-pulver (Folia urticae), blade fra Urtica dioica (brændenælde), findelt (partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm); i overensstemmelse med farmaceutiske standarder, til konsum; ud over tørt sediment	0,4-0,5 %
Organisk kulstof	Justeret ved tilsætning af tørv og sand	$2 \pm 0,5$
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulveriseret, kemisk rent, ud over tørt sediment	0,05-1
Deioniseret vand	Ledningsevne $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, ud over tørt sediment	30-50

Bemærk: Hvis der forventes høje ammoniakkoncentrationer, f.eks. hvis testkemikaliet har vist sig at hæmme nitrifikation, kan det være hensigtsmæssigt at erstatte 50 % af det kvælstofrige urtica-pulver med cellulose (f.eks. α -cellulose-pulver, kemisk rent, partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm; (1)(2)).

Klargøring

Tørven lufttørres og formales til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i deioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være $6,0 \pm 0,5$. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5-7,5 med CaCO_3 . Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det dog være hensigtsmæssigt at holde sedimentets pH under 7,0 (f.eks. 6,0-6,5). Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det formulerede sediment konditioneres i syv dage under samme betingelser som i den efterfølgende test (f.eks. sediment/vand-forhold 1: 4, højde på

sedimentlag som i testbeholderne), inden testkemikaliet tilsættes, dvs. at det overhældes med vand, som skal beluftes. Ved udløbet af konditioneringsperioden fjernes og kasseres det overliggende vand. Derefter blandes det spikede kvartssand med sedimentet for hvert behandlingsniveau, sedimentet fordeles i replikattestbeholderne og overhældes med testvandet. Derefter inkuberes beholderne under samme betingelser som i den efterfølgende test. Det er på dette tidspunkt, at ækvilibreringsperioden indledes. Det overliggende vand beluftes.

Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Den kan først blandes med tørvesuspensionen (se ovenfor). For omfattende nedbrydning af fødekilden inden tilsætningen af testorganismerne — f.eks. ved en lang ækvilibreringsperiode — kan dog undgås, ved at sørge for at tidsrummet mellem tilsætningen af foder og begyndelsen af eksponeringsperioden er så kort som muligt. For at sikre at foderet er spiket med testkemikaliet, blandes fødekilden senest med sedimentet på den dag, hvor testkemikaliet tilsættes til sedimentet.

Opbevaring

De tørre bestanddele i det syntetiske sediment lagres tørt og køligt eller ved stuetemperatur. Det klargjorte sediment, hvortil testkemikaliet er tilsat, bruges straks i testen. Prøver af spiket sediment kan opbevares under de betingelser, der anbefales for det pågældende testkemikalie, indtil analyse.

LITTERATUR

- (1) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) M. Liebig, M. Meller og P. Egeler (2004), Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*, Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests, 24.-25. marts 2004, BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107-119.

Tillæg 5

Dyrkningsmetoder for *Lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta forekommer i ferskvandssedimenter og anvendes i vid udstrækning i økotoxikologisk testning. Den kan let dyrkes under laboratoriebetingelser. Dyrkningsmetoderne gennemgås nedenfor.

Dyrkningsmetoder

Dyrkningsbetingelser for *Lumbriculus variegatus* er detaljeret beskrevet i Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Nedenfor gives en kort sammenfatning af disse betingelser. En stor fordel ved *L. variegatus* er dens hurtige reproduktion, som giver en hurtigt stigende biomasse i bestande dyrket i laboratorier (f.eks. (1), (3), (4), (5)).

Ormene kan dyrkes i store akvarier (57-80 l) ved 23 °C med en lysperiode på 16 timers lys (100-1 000 lux) og otte timers mørke med dagligt udskiftet råvand (45-50 l pr. akvarium). Substratet klargøres ved at skære ublegede brune papirservietter i strimler, som derefter kan blandes med dyrkningsvand i nogle få sekunder, hvilket giver små stykker papirsubstrat. Dette substrat kan derefter bruges direkte i *Lumbriculus*-dyrkningsakvarierne ved at dække bunden af tanken eller kan opbevares frosset i deioniseret vand til senere brug. Nyt substrat i tanken vil generelt kunne holde sig i ca. to måneder.

Hver ormekultur startes med 500-1 000 orme og tilføres en 10 ml suspension, som indeholder 6 g startfoder til ørreder tre gange om ugen under udskiftnings- eller gennemstrømningsbetingelser. Statiske eller semistatiske kulturer bør modtage lavere fodermængder for at forhindre bakterie- og svampevækst.

Under disse betingelser fordobles antallet af individer i kulturen generelt på ca. 10-14 dage.

Alternativt kan *Lumbriculus variegatus* dyrkes i et system, der består af et lag kvartssand som det, der bruges til det syntetiske sediment (1-2 cm dybt), og rekonstitueret vand. Beholdere af glas eller rustfrit stål med en højde på 12-20 cm kan bruges som dyrkningsbeholdere. Vandet beluftes forsigtigt (f.eks. to bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt ca. 2 cm over sedimentoverfladen. For at forhindre akkumulering af f.eks. ammoniak udskiftes det overliggende vand mindst en gang om ugen ved hjælp af et gennemstrømningssystem eller manuelt. Oligochaeterne kan holdes ved stuetemperatur med en lysperiode på 16 timers lys (intensitet 100-1 000 lux) og otte timers mørke. I den semistatiske kultur (vandudskiftning en gang om ugen) fodres ormene med TetraMin to gange om ugen (f.eks. 0,6-0,8 mg pr. cm² sedimentoverflade), som kan tilsættes som en suspension af 50 mg TetraMin pr. ml deioniseret vand.

Lumbriculus variegatus kan fjernes fra kulturerne, f.eks. ved at overføre substrat med et finmasket net eller organismer med en flammepoleret glaspipette med bred åbning (ca. 5 mm i diameter) til et separat bæger. Hvis substrat føres med over i dette bæger, henstår bægeret, som indeholder orme og substrat, natten over under gennemstrømning, hvilket vil fjerne substratet fra bægeret, mens ormene bliver i bunden af beholderen. De kan derefter overføres til nye klargjorte dyrkningsbeholdere eller bearbejdes yderligere med henblik på testen som anført i (3) og (4) eller nedenfor.

Et afgørende spørgsmål, når der bruges *L. variegatus* i sedimenttest, er ormens forplantningsform (fragmentation eller regenerering, f.eks. (6)). Denne vegetative formering resulterer i to fragmenter, som ikke indtager føde i en vis periode, indtil hoved- eller haledelen er regenereret (f.eks. (7), (8)). Det betyder, at eksponering hos *L. variegatus* via indtagelse af forurenede sediment ikke finder sted kontinuerligt.

Derfor bør der gennemføres en synkronisering for at minimere ukontrolleret reproduktion og regenerering og efterfølgende høj variation i testresultaterne. En sådan variation kan forekomme, når individer, der har fragmenteret sig og derfor ikke indtager føde i en periode, er mindre eksponeret for testkemikaliets end andre individer, der ikke fragmenterer sig under testen (9), (10), (11). 10-14 dage inden påbegyndelsen af eksponeringen fragmenteres ormene kunstigt (synkronisering). Store (voksne) orme, der fortrinsvis ikke viser tegn på nylig regenerering, udvælges til synkronisering. Disse orme kan anbringes på en glasplade i en dråbe dyrkningsvand og dissekteres i det mediane

kropsområde med en skalpel. Bagenderne skal have samme størrelse. Bagender henstår herefter i en dyrknings-beholder, der indeholder samme substrat som kulturen og rekonstitueret vand, så de kan regenerere nye hoveder inden eksponeringsperiodens start. Det er et tegn på, at nye hoveder er regenereret, når de synkroniserede orme graver sig ned i substratet (tilstedeværelse af nye hoveder kan bekræftes ved at undersøge en repræsentativ delprøve under binokulært mikroskop). Testorganismerne forventes derefter at være i ensartet fysiologisk tilstand. Det betyder, at når reproduktion ved regenerering forekommer hos synkroniserede orme under testen, forventes stort set alle dyr at være eksponeret for det spikede sediment i samme grad. Fodring af de synkroniserede orme sker, så snart ormene begynder at grave sig ned i substratet eller syv dage efter dissektion. Fodersystemet skal være sammenligneligt med fodersystemet for de almindelige kulturer, men det kan være hensigtsmæssigt at fodre de synkroniserede orme med samme fødekilde som i testen. Ormene holdes ved testtemperaturen på $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Efter regenerering anvendes de intakte hele orme, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller rustfrie dentale sonder til håndtering af ormene.

Kilder til starterkulturer til *Lumbriculus variegatus* (adresser i USA hentet fra (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Tyskland

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Tyskland

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommensenstr. 13
D-01062 Dresden
Tyskland

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

LITTERATUR

- (1) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants, *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
 - (2) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998), Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
 - (3) ASTM International (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a, in: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.
 - (4) U.S. EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, Second Edition, EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, marts 2000.
 - (5) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
 - (6) C. D. Drewes og C. R. Fournier (1990), Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments, *Develop. Biol.* 138: 94-103.
 - (7) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998a), Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
 - (8) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998b), Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller), *Hydrobiologia* 377: 183-194.
 - (9) K. Brust, O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann og R. Nagel (2001), Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams, *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, s. 2000-2007.
 - (10) M. Oetken, K.-U. Ludwigowski og R. Nagel (2000), Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV, By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marts 2000.
 - (11) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998), Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller), *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
-

Tillæg 6

Resume af ringtestens resultater
»Sedimenttest med Lumbriculus variegatus«

Tabel 1

Resultater af individuelle ringtestserier: Gennemsnitligt antal orme i kontrollerne og opløsningsmiddelkontrollerne ved afslutningen af testen; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

	gennemsnitligt antal orme i kontrollerne	SD	CV (%)	n	gennemsnitligt antal orme i opløsningsmid- delkontrollerne	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Gennemsnits- værdi af sam- menlignende laboratorie- test	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min.	16,3				15,0			
maks.	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Tabel 2

Resultater af individuelle ringtestserier: Gennemsnitlig tørvægt af orme pr. replikat i kontrollerne og opløsningsmiddelkontrollerne ved afslutningen af testen; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

	samlet tørvægt af orme pr. replikant (kontroller)	SD	CV (%)	n	samlet tørvægt af orme pr. replikant (opløs- nings-middel- kontroller)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Gennemsnits- værdi af sam- menlignende laboratorie- test	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min.	12,9				10,5			
maks.	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tabel 3

Toksicitet for PCP: Oversigt over endepunkter i ringtesten; gennemsnitsværdier af sammenlignende laboratorietest for EC₅₀, NOEC og LOEC; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

Biologisk parameter		Gennemsnitsværdi af sammenlignende laboratorietest (mg/kg)	min	maks	Faktor for sammenlignende laboratorietest	SD	CV (%)	geometrisk middel-værdi (mg/kg)
antal orme i alt	EC₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
samlet tørvægt af orme	EC₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
dødelighed/overlevelse	LC₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reproduktion (forøgelse af antal orme pr. replikat)	EC₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
vækst (biomasse-forøgelse pr. replikat)	EC₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: laveste påviselige forskel (minimum detectable difference) i forhold til kontrolværdierne ved hypotesetest; mål for den statistiske styrke

HENVISNING

Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36 ROVMIDE (HYPOASPIS (GEOLAEAPS) ACULEIFER) — FORMERINGSTEST I JORD**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 226 (2008). Denne testmetode er beregnet til vurdering af kemikaliers virkninger på reproduktionen hos rovmidearten *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), idet den giver mulighed for vurdering af hæmningen af den specifikke bestands væksthastighed (1,2). Ved formeringsevne forstås her antal unger ved testperiodens afslutning. *H. aculeifer* repræsenterer et yderligere trofisk niveau for den art, for hvilken der allerede foreligger testmetoder. En formeringstest uden skelnen mellem og kvantificering af de forskellige trin i reproduktionscyklussen betragtes som hensigtsmæssig i forbindelse med denne testmetode. For kemiske stoffer med et andet eksponeringsscenarie end via jorden kan andre tilgange være hensigtsmæssige (3).
2. *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* betragtes som en relevant repræsentant for jordfauna og nærmere bestemt rovmider. Den findes i hele verden (5) og kan let indsamles og dyrkes i laboratorier. Tillæg 7 indeholder en sammenfatning af *H. aculeifer*s biologi. Der foreligger baggrundsinformation om miders økologi og deres brug i økotoxikologisk testning (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) og (12).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Voksne hunner udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliets blandet i jorden. Testen påbegyndes med ti voksne hunner pr. replikatbeholder. Der bruges ikke hanner i testen, da erfaringen har vist, at hunner parrer sig umiddelbart eller kort efter klækning fra deutonymfestadiet, hvis der er hanner til stede. Derudover ville anvendelse af hanner forlænge testen, hvilket ville gøre det nødvendigt at skelne mellem alderstrin. Parring er således ikke i sig selv en del af testen. Hunnerne tilføres til testen 28-35 dage efter starten af æglægningsperioden i synkroniseringen (se tillæg 4), da hunnerne på det tidspunkt allerede har parret sig og passeret fasen lige før æglægning. Testen slutter på dag 14 ved 20 °C efter tilførsel af hunnerne (dag 0), hvilket sikrer, at det første kontrolafkom kan nå deutonymfestadiet (se tillæg 4). For den primære målte variabel bestemmes antallet af unger pr. testbeholder og desuden antallet af overlevende hunner. Reproduktionen hos mider, der eksponeres for testkemikaliets, sammenlignes med reproduktionen hos mider i kontrollerne med henblik på at bestemme EC_x (f.eks. EC₁₀, EC₅₀) eller nuleffektkoncentrationen (NOEC) (definitioner er anført i tillæg 1), afhængigt af forsøgsdesign (se punkt 29). Tillæg 8 indeholder en oversigt over testplanen.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Testkemikaliets vandopløselighed, log K_{ow}, fordelingskoefficient mellem jord og vand og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord, såsom biotisk og abiotisk nedbrydning, er ønskelige.
5. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilførselsmåden for testkemikaliets variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft/vand-fordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

TESTENS VALIDITET

6. Følgende kriterier skal være opfyldt i de ubehandlede kontroller, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:
 - Den gennemsnitlige dødelighed blandt voksne hunner må ikke overstige 20 % ved forsøgets afslutning.
 - Det gennemsnitlige antal unger pr. replikat (med ti voksne hunner) skal være mindst 50 ved testens afslutning.
 - Variationskoefficienten beregnet for antal unger pr. replikat må ikke overstige 30 % ved den endelige tests afslutning.

REFERENCEKEMIKALIE

7. ECx og/eller NOEC for et referencekemikalie skal bestemmes, for at give sikkerhed for at laboratorietestbetingelserne er tilstrækkelige, og kontrollere, at testorganismernes respons ikke har ændret sig over tid. Dimethoat (CAS 60-51-5) er et egnet referencekemikalie, der har vist sig at have indvirkning på populationsstørrelsen (4). Borsyre (CAS 10043-35-3) kan bruges som alternativt referencekemikalie. Der er mindre erfaring med dette kemikalie. Der er to mulige design:
- Referencekemikallet kan testes samtidig med bestemmelsen af hvert testkemikalies toksicitet ved en koncentration, som skal påvises på forhånd i en dosis/respons-undersøgelse, hvor antallet af unger reduceres med > 50 %. I dette tilfælde bør antallet af replikater være det samme som i kontrollerne (se punkt 29).
 - Alternativt testes referencekemikallet 1-2 gange om året i en dosis/respons-test. Antallet af koncentrationer og replikater og afstandsfaktoren varierer afhængigt af det valgte design (se punkt 29), men der bør opnås en respons på 10-90 % effekt (afstandsfaktor på 1,8). EC₅₀ for dimethoat baseret på antal unger bør være på 3,0-7,0 mg aktivt stof/kg jord (tørvægt). Baseret på de resultater, der er opnået med borsyre hidtil, bør EC₅₀ baseret på antal unger være på 100-500 mg/kg jord (tørvægt).

BESKRIVELSE AF TESTEN

Testbeholdere og -udstyr

8. Der bruges testbeholdere med en diameter på 3-5 cm (jordhøjde $\geq$ 1,5 cm) af glas eller et andet kemisk inert materiale og med et tætsluttende låg. Skruelåg foretrækkes, og beholderne beluftes i givet fald to gange om ugen. Alternativt kan der bruges låg, som tillader direkte gasudveksling mellem substratet og atmosfæren (f.eks. gaze). Eftersom fugtindholdet skal holdes tilstrækkeligt højt under testen, er det vigtigt at kontrollere hver testbeholders vægt under testen og om nødvendigt tilsætte vand. Det kan være særlig vigtigt, hvis der ikke anvendes skruelåg. Hvis der bruges en uigennemsigtig testbeholder, bør låget være fremstillet af et materiale, der giver adgang til lys (f.eks. kan låget være perforeret og gennemsigtigt), men som samtidig forhindrer miderne i at slippe ud. Testbeholderens størrelse og type afhænger af ekstraktionsmetoden (flere oplysninger findes i tillæg 5). Hvis der anvendes varmeeekstraktion direkte på testbeholderen, kan der tilføjes et bundnet af en passende maskestørrelse (forseglet indtil ekstraktion), og jorddybden bør være tilstrækkelig til at sikre en temperatur- og fugtgradient.
9. Der kræves normalt laboratorieudstyr, navnlig følgende:
- fortrinsvis glasbeholdere med skruelåg
 - tørreskab
 - stereomikroskop
 - børster til overførsel af mider
 - pH-meter og luxmeter
 - egnede nøjagtige vægte
 - passende udstyr til temperaturkontrol
 - passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne er udstyret med låg)
 - temperaturstyret inkubator eller lille rum
 - ekstraktionsudstyr (se tillæg 5) (13)
 - overlyspanel med lysstyring
 - krukker til indsamling af udtagne mider.

Klargøring af den syntetiske jord

10. Der bruges syntetisk jord til denne test. Den syntetiske jord består af følgende komponenter (alle værdier baseret på tørmasse):

- 5 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel)
- 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit
- ca. 74 % lufttørret industrielt sand (afhængigt af den nødvendige mængde CaCO_3), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm . Den nøjagtige mængde sand afhænger af mængden af CaCO_3 (se nedenfor), idet de til sammen skal ligge på 75 %.
- < 1,0 % calciumcarbonat (CaCO_3 , pulveriset, analysekvalitet) for at få en pH på $6,0 \pm 0,5$. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art (se bemærkning 1).

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde CaCO_3 vil afhænge af jordsubstratets komponenter og bestemmes ved at måle pH-værdien af delpøver umiddelbart før testen (14).

Bemærkning 2: Den syntetiske jords sphagnumindhold afviger fra andre testmetoder med jordorganismer, hvor der i de fleste tilfælde bruges 10 % sphagnum (f.eks. (15)). Ifølge EPPO (16) indeholder typisk landbrugsjord dog ikke over 5 % organiske materialer, og reduktionen af sphagnumindholdet afspejler således naturlig jords begrænsede muligheder for testkemikaliet's sorption til organisk kulstof.

Bemærkning 3: Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlig jord fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssubstrat. Anvendes der naturlig jord, bør det dog som minimum karakteriseres ved oprindelse (indsamlingssted), pH, tekstur (partikelstørrelsesfordeling) og indhold af organisk materiale. Jordens type og navn i henhold til jordklassifikation bør oplyses, hvis disse oplysninger foreligger, og jorden skal være uden forurening. Hvis testkemikaliet er et metal eller organometal, bestemmes den naturlige jords kationbytningsskapacitet (CEC) også. Der bør lægges særlig vægt på at opfylde validitetskriterierne, da der typisk er begrænsede oplysninger om naturlig jord.

11. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblender). Til bestemmelse af pH anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid (CaCl_2) i forholdet 1:5 (se (14) og tillæg 3). Hvis jorden er mere syreholdig end det krævede område (se punkt 10), kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde CaCO_3 . Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af mere af blandingen af de første tre komponenter i punkt 10, men uden CaCO_3 .
12. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2. To til syv dage før testens start fugtes den tørre syntetiske jord på forhånd ved at tilsætte destilleret eller deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Vandindholdet justeres til 40-60 % af den maksimale vandholdende evne ved tilsætning af testkemikalieopløsningen og/eller ved tilsætning af destilleret eller deioniseret vand (se punkt 16-18). Jordens vandindhold bestemmes igen omtrentligt ved forsigtigt at presse jorden sammen i hånden. Hvis vandindholdet er korrekt, viser små vanddråber sig mellem fingrene.
13. Jordens fugtindhold bestemmes ved begyndelsen og afslutningen af testen ved tørring til konstant vægt ved 105 °C i overensstemmelse med ISO 11465 (17), og jordens pH bestemmes i overensstemmelse med tillæg 3 eller ISO 10390 (14). Disse målinger foretages i yderligere prøver uden mider, både fra kontroljorden og fra jordprøver med hver testkoncentration. Jordens pH bør ikke justeres, når testen vedrører sure eller basiske kemikalier. Fugtindholdet overvåges gennem hele testen ved at veje beholderne regelmæssigt (se punkt 20 og 24).

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

14. Den art, der bruges i testen, er *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* (Canestrini, 1883). Der skal bruges voksne hunnider, hentet fra en synkroniseret population, til at starte testen op. Mider tilføres, ca. 7-14 dage efter at de er blevet voksne, 28-35 dage efter starten af æglægningsperioden i synkroniseringen (se punkt 3 og tillæg 4). Kilden til miderne og leverandøren heraf samt vedligeholdelsen af laboratoriekulturen registreres. Hvis der holdes en laboratoriekultur, anbefales det, at artens identitet bekræftes mindst en gang om året. Et oplysningsskema fremgår af tillæg 6.

Klargøring af testkoncentrationer

15. Testkemikaliet blandes i jorden. Organiske opløsningsmidler, der bruges i forbindelse med behandling af jorden med testkemikaliet, udvælges på grundlag af deres lave grad af toksicitet for mider, og testen skal omfatte passende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 29).

Vandopløseligt testkemikalie

16. En opløsning af testkemikaliet klargøres i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Det anbefales at bruge en passende mængde vand for at opnå det nødvendige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (se punkt 12). Hver opløsning af testkemikaliet blandes grundigt med et parti forhåndsfugtet jord, før det tilsættes til testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

17. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliet opløses i det mindst mulige volumen af et egnet bærestof (f.eks. acetone). Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Når der bruges sådanne bærestoffer, skal alle testkoncentrationer og kontrollen indeholde samme minimumsmængde af bærestoffet. Bærestoffet sprøjtes på eller blandes med en lille mængde, f.eks. 10 g, fint kvartssand. Det samlede sandindhold i substratet korrigeres for denne mængde. Bærestoffet fjernes ved afdampning i et stinkskab i mindst en time. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes til den fugtede jord og blandes grundigt ved tilsætning af en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding overføres til testbeholderne. Bemærk, at visse opløsningsmidler kan være toksiske for mider. Det anbefales derfor at bruge en yderligere vandkontrol uden bærestoffet, hvis opløsningsmidlets toksicitet for mider ikke er kendt. Hvis det i tilstrækkelig grad er påvist, at opløsningsmidlet (i de koncentrationer, der skal anvendes) ikke har nogen effekt, kan vandkontrollen udelukkes.

Testkemikalie, der er tungtopløseligt i vand, og organiske opløsningsmidler

18. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes 2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder (f.eks. 10 g fint kvartssand til fire replikater) med testkemikaliet for at opnå den ønskede testkoncentration. Det samlede sandindhold i substratet korrigeres for denne mængde. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes til den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en passende kontrolgruppe.

FREMGANGSMÅDE**Testgrupper og kontrolgrupper**

19. Det anbefales at bruge ti voksne hunner i 20 g syntetisk jord (tørmasse) til hver kontrol- og behandlingsbeholder. Testorganismer tilsættes senest to timer efter klargøringen af det endelige testsubstrat (dvs. efter tilsætning af testkemikaliet). I specifikke tilfælde (f.eks. når aldrig betragtes som en afgørende faktor) kan tidsrummet mellem klargøringen af det endelige testsubstrat og tilsætningen af miderne forlænges (flere oplysninger om en sådan aldrig findes i (18)). Der skal dog gives en videnskabelig begrundelse.

20. Efter tilsætning af midterne til jorden, fodres midterne, og hver testbeholder vejes, således at der foreligger en startvægt, der kan bruges som grundlag for overvågning af jordens fugtindhold under testen, som beskrevet i punkt 24. Testbeholderne overdækkes derefter som beskrevet i punkt 8 og anbringes i testkammeret.
21. Der klargøres egnede kontroller for hver af de metoder til påføring af testkemikalier, der er beskrevet i punkt 15-18. De relevante beskrevne fremgangsmåder følges ved klargøring af kontrollerne, bortset fra at testkemikaliets ikke tilsættes. Når det er relevant, tilsættes organiske opløsningsmidler, kvartssand eller andre bærestoffer således til kontrollerne i samme koncentrationer/mængder som i behandlingerne. Hvis et opløsningsmiddel eller et andet bærestof bruges til at tilsætte testkemikaliets, klargøres og testes en yderligere kontrol uden bærestoffet eller testkemikaliets også, hvis opløsningsmidlets toksicitet ikke er kendt (se punkt 17).

Testbetingelser

22. Testtemperaturen skal være $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Temperaturen registreres mindst en gang om dagen og justeres om nødvendigt. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 16 timers lys og otte timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholderens område. Af hensyn til sammenligneligheden er disse betingelser de samme som i andre økotoksikologiske test (f.eks. (15)).
23. Der sikres gasudveksling ved at belufte testbeholderne mindst to gange om ugen, hvis der bruges skruelåg. Hvis der bruges gazelåg, skal der lægges særlig vægt på bevarelse af jordens fugtindhold (se punkt 8 og 24).
24. Vandindholdet i jordsubstratet i testbeholderne bevares under testen ved at veje og om nødvendigt tilsætte vand til testbeholderne med jævne mellemrum (f.eks. en gang om ugen). Tab erstattes efter behov med deioniseret vand. Fugtindholdet under testen må højst afvige 10 % fra startværdien.

Fodring

25. Ostemider (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) har vist sig at være en egnet fødekilde. Små collemboler (f.eks. afkom af *Folsomia candida* Willem, 1902, eller *Onychiurus fimatus* (19), (20), enchytraeider (f.eks. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) eller nematoder (f.eks. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) kan også være egnede (21). Det anbefales at kontrollere foderet, inden det bruges i en test. Fodertypen og -mængden bør sikre et tilstrækkeligt antal unger til at opfylde validitetskriterierne (punkt 6). I forbindelse med udvælgelsen af byttedyr bør testkemikaliets virkningsmåde tages i betragtning (f.eks. kan acaricider også være toksiske for fodermidterne, se punkt 26).
26. Der gives foder ad libitum (dvs. hver gang en lille mængde (spidsen af en spatel)). Der kan også bruges en udsugningsanordning med lav sugning som foreslået i collemboltesten eller en fin malerpensel. Fodring i begyndelsen af testen og to til tre gange om ugen vil sædvanligvis være tilstrækkeligt. Hvis testkemikaliets viser sig at være toksisk for byttedyret, bør det overvejes at øge fodringshyppigheden og/eller finde en anden fødekilde.

Udvælgelse af testkoncentration

27. Forhåndskendskab til testkemikaliets toksicitet kan hjælpe til at finde passende testkoncentrationer, f.eks. fra undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval. En indledende test til bestemmelse af dosisinterval gennemføres om nødvendigt med fem koncentrationer af testkemikaliets i intervallet 0,1-1 000 mg/kg tør jord med mindst en replikat for behandling og kontrol. Varigheden af testen til bestemmelse af dosisinterval er 14 dage, hvorefter dødeligheden for voksne midter og antallet af unger bestemmes. Koncentrationsintervallet i den endelige test vælges fortrinsvis, så det omfatter koncentrationer, hvor antallet af unger er påvirket, mens hvor de voksne hunners overlevelse ikke er påvirket. Det er dog måske ikke muligt for kemikalier, der har letale og subletale virkninger ved næsten samme koncentrationer. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Ekstrapolering langt under den laveste koncentration, der har indvirkning på testorganismerne, eller over den højeste testede koncentration bør kun foregå i særlige tilfælde, og en fuld begrundelse gives i rapporten.

Forsøgsdesign*Dosis/respons-test*

28. Der foreslås tre design baseret på anbefalingerne som følge af en anden ringtest (formeringstest med enchytraeider (22)). Alle disse designs generelle egnethed blev bekræftet af resultatet af valideringen af *H. aculeifer*.
29. Når koncentrationsintervallet skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:
- For at bestemme EC_x (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) skal der testes tolv koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentration og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.
 - For at fastlægge NOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor på højst 2,0.
 - En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og EC_x . Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

Grænsetest

30. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til bestemmelse af dosisinterval (dvs. 1 000 mg/kg jord (tørvægt)), kan den endelige formeringstest udføres som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg jord (tørvægt). En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at NOEC eller EC_{10} for formering er større end grænsekoncentrationen, og samtidig minimere det antal mider, der bruges i testen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrollen.

Testvarighed og -målinger

31. Eventuelle observerede forskelle mellem adfærd og morfologi hos miderne i henholdsvis kontrollen og de behandlede beholdere registreres.
32. På dag 14 udtages de overlevende mider fra jorden ved varme-/lyseksaktion eller ved en anden egnet metode (se tillæg 5). Antallet af unger (dvs. larver, protonymfer og deutonymfer) og voksne tælles særskilt. Voksne mider, der ikke findes på dette tidspunkt, registreres som døde, eftersom det må antages, at sådanne mider er døde og nedbrudt inden vurderingen. Ekstraktionseffektiviteten skal valideres en eller to gange om året i kontroller med et kendt antal voksne og unger. Effektiviteten skal gennemsnitligt overstige 90 % for alle udviklingsstrin samlet set (se tillæg 5). Antallet af voksne og unger justeres ikke for effektivitet.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

33. Oplysninger om de statistiske metoder, der kan bruges til at analysere testresultaterne, fremgår af punkt 36-41. Derudover henvises der til OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (31).
34. Testens primære endepunkt er reproduktionen, her antallet af unger frembragt pr. replikattestbeholder (med ti tilførte voksne hunner). I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit ($\bar{X}$) og variansen (s^2) for at beregne reproduktionen pr. behandling og pr. kontrol. $\bar{X}$ og s^2 bruges til ANOVA-procedurer som Student t-testen, Dunnetts test og Williams' test samt til beregning af 95 % konfidensintervaller.

Bemærk: Dette primære endepunkt er lig med frugtbarheden målt som antal levende unger frembragt under testen divideret med antallet af hunner i forældregenerationen tilført i begyndelsen af testen.

35. Antallet af overlevende hunner i de ubehandlede kontroller er et væsentligt validitetskriterium og skal dokumenteres. Som i den indledende test til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade også anføres i den endelige rapport.

EC_x

36. EC_x-værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for den parameter, der er beskrevet i punkt 34, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Kärber-metoden eller simpel interpolation). En EC_x-værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC₅₀ eller enhver anden EC_x-værdi skal middelværdierne for hver behandling (X), underkastes en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

37. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Passende statistiske metoder anvendes (i overensstemmelse med OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliets sammenlignet med kontrollen ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0,05$. Eksempler er angivet nedenfor.
38. Normalfordelingen af data kan f.eks. testes med Kolmogorov-Smirnovs goodness-of-fit-test, Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test) eller Shapiro-Wilk-testen (tosidet, $p \leq 0,05$). Cochran's test, Levenes test eller Bartlett's test (tosidet, $p \leq 0,05$) kan bruges til at teste varianshomogeniteten. Hvis forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, varianshomogenitet) er opfyldt, kan der udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Multiple sammenligninger (f.eks. Dunnett's test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test, hvis der er tale om et monotont dosis/respons-forhold) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application). Ellers bør ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstras trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

39. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.
40. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddelkontrol) kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrol- og opløsningsmiddelkontrolreplikater samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

Testrapport

41. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— *Testkemikalie*

- testkemikaliets identitet, navn, parti, batch og CAS-nummer, renhed
- testkemikaliets fysiske-kemiske egenskaber (f.eks. log K_{ow} , vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og gerne oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord)

— *Testorganismer*

- identifikation og leverandør af testorganismer, beskrivelse af dyrkningsbetingelserne
- testorganismeres alder

— Testbetingelser

- beskrivelse af forsøgsdesign og procedure
- oplysninger om klargøring af testjorden, detaljeret specifikation, hvis der bruges naturlig jord (oprindelse, historie, partikelstørrelsesfordeling, pH, indhold af organisk stof og jordklassifikation, hvis en sådan foreligger)
- jordens maksimale vandholdende evne
- en beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilføre testkemikallet til jorden
- oplysninger om hjælpekemikalier, der bruges til administration af testkemikallet
- testbeholdernes størrelse og testjord (tørmasse) pr. beholder
- testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklussernes varighed, temperatur
- en beskrivelse af fodringen, typen og mængden af foder anvendt i testen, fodringsdatoer
- jordens pH- og vandindhold ved påbegyndelse af og under testen (kontrol og hver behandling)
- detaljeret beskrivelse af ekstraktionsmetode og ekstraktionseffektivitet.

— Testresultater

- antal unger bestemt i hver testbeholder ved afslutningen af testen
- antal voksne hunner og deres dødelighed (%) i hver testbeholder ved afslutningen af testen
- en beskrivelse af synlige symptomer eller tydelige adfærdsændringer
- resultater opnået med referencetestkemikallet
- statistikoversigter (EC_x og/eller NOEC), herunder 95 % konfidensgrænser og en beskrivelse af beregningsmetoden
- en afbildning af koncentrationsresponsforholdet
- afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

- (1) M. E. Casanueva (1993), Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata), *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) J. M. Tenorio (1982), Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands, *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) F. M. Bakker, R. Feije, A. J. Grove, G. Hoogendorn, G. Jacobs, E. D. Loose og P. van Stratum (2003), A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil, *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) W. Karg (1993), Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben, 2nd edition, in: F. Dahl (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. G. Teil, Jena Fischer, s. 523 ff.
- (5) . A. Ruf (1991), Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes), in: F. Dusbabek og V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*, Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.
- (6) A. Ruf (1995), Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae), *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: s. 241-249.
- (7) A. Ruf (1996), Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites, *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio, USA: s. 621-628.
- (8) P. H. Krogh og J. A. Axelsen (1998), Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*, in: H. Løkke og C. A. M. van Gestel, *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*, John Wiley Sons, Chichester, s. 239-251.

- (9) H. Løkke, C. R. Janssen, R. P. Lanno, J. Römbke, S. Rundgren og N. M. Van Straalen (2002), Soil Toxicity Tests — Invertebrates, in: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils, A. Fairbrother, P. W. Glazebrook, N. M. Van Straalen og J. V. Tarazona (eds.), SETAC Press, Pensacola, USA, s. 128 ff.
- (10) H.-J. Schlosser og F. Riepert (1991/92), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen, Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) H.-J. Schlosser og F. Riepert (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N. F. 34, 413-433.
- (12) L.-H. Heckmann, K. Maraldo og P. H. Krogh (2005), Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae), Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) H. Petersen (1978), Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency, Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.
- (15) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (16) EPPO (2003): EPPO-standarder, Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products, Chapter 8. Soil Organisms and Functions, Bull. OEPP/EPPO Bull., 33, 195-209.
- (17) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465, ISO, Genève.
- (18) A. Fairbrother, P. W. Glazebrook, N. M. Van Straalen og J. V. Tarazona (2002), Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils, SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) H. Chi (1981), Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola), Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) H. J. Schlosser og F. Riepert (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Zool.Beitr. N. F. 34(3):395-433.
- (21) L.-H. Heckmann, A. Ruf, K. M. Nienstedt og P. H. Krogh 2007, Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey, Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Kapitel C.32 i dette bilag — Formeringstest — Enchytraeider.
- (23) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.
- (24) T. R. E. Southwood (1991), Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations, (2nd ed.), Chapman & Hall, London, s. 524 ff.
- (25) W. Dunger og H. J. Fiedler (1997), Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.), G. Fischer, Jena, s. 539 ff.
- (26) I. Lesna og M. W. Sabelis (1999), Diet-dependent female choice for males with »good genes« in a soil predatory mite, Nature 401, 581-583.
- (27) A. Ruf (1989), Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina), Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) A. Ruf (1993), Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae), Dissertation, Universität Bremen.

-
- (29) S. Ignatowicz (1974), Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides), *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
- (30) D. K. Kevan, McE., og G. D. Sharma (1964), Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae), *Acarologia* 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO (2006)18
-

*Tillæg 1***Definitioner**

Følgende definitioner finder anvendelse for denne testmetode (i denne test udtrykkes alle virksomme koncentrationer som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord):

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrollen har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode.

EC_x (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC₅₀ er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Testkemikalie er et stof eller en blanding, der testes med denne testmetode.

Tillæg 2

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne betragtes som hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Del 2: Determination of effects on reproduction (23)).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, der påfyldes vand, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

*Tillæg 3***Bestemmelse af jordens pH**

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (16).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sit volumen af enten en 1 M opløsning af kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid (CaCl₂) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes grundigt i fem minutter og henstår til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

Tillæg 4

Dyrkning af *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, fodermider og synkronisering af kultur**Dyrkning af *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Kulturer kan opbevares i plastbeholdere eller glas fyldt med en blanding af gips og kulpulver (i forholdet 9:1). Gipsen kan holdes fugtig ved at tilsætte et par dråber destilleret eller deioniseret vand, hvis det er nødvendigt. De optimale dyrkningstemperaturer er på $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; lys/mørke-forhold er ikke relevante for denne art. Byttedyr kan være *Tyrophagus putrescentiae*- eller *Caloglyphus* sp.-mider (fodermider skal håndteres forsigtigt, da de kan give allergi hos mennesker), men nematoder, enchytraeider og collemboler er også egnede som byttedyr. Deres kilde skal registreres. Udvikling af bestande kan indledes med en enkelt hun, eftersom hanner udvikler sig i ubefrugtede æg. Generationer overlapper i vid udstrækning. En hun kan leve mindst 100 dage og kan lægge ca. 100 æg i sin levetid. Der lægges flest æg i alderen 10-40 dage (efter at hunnen er blevet voksen), nemlig 2,2 æg pr. hun pr. dag. Udviklingstiden fra æg til voksen hun er ca. 20 dage ved 20 °C . Der bør holdes mere end en kultur på forhånd.

Dyrkning af *Tyrophagus putrescentiae*:

Miderne holdes i en glasbeholder fyldt med fint, pulveriseret bryggerigær, som sættes i en plastspand fyldt med KNO_3 -opløsning for at forhindre miderne i at slippe ud. Fodermiderne anbringes oven på dette pulver. Derefter blandes de forsigtigt med pulveret (som skal udskiftes to gange om ugen) med en spatel.

Synkronisering af kulturen:

Dyr, der bruges i testen, skal have nogenlunde samme alder (ca. syv dage efter at de er nået voksenstadiet). Ved en dyrkningstemperatur på 20 °C opnås dette ved at

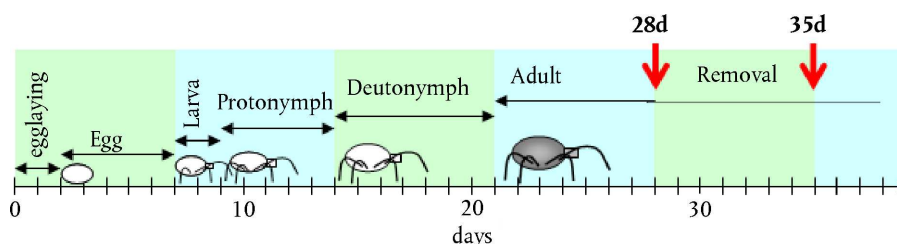
overføre hunner til en ren dyrkningsbeholder og tilsætte tilstrækkeligt foder

— tillade 2-3 dages æglægning og fjerne hunnerne

— udtage voksne hunner til testen mellem den 28. og den 35. dag efter start og anbringe dem i rene dyrkningsbeholdere.

Voksne hunner kan let skelnes fra hanner og andre udviklingstrin, fordi de er større, har en oppustet form og et brunt dorsalt skjold (hanner er tyndere og flade), umodne dyr er hvide til cremefarvede. Midernes udvikling følger omtrent det mønster, der er beskrevet nedenfor, ved 20 °C (figur): Æg 5 dage, larve 2 dage, protonymfe 5 dage, deutonymfe 7 dage, hunnens præ-æglægningsperiode 2 dage. Herefter er miderne voksne.

Figur

Udvikling af *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* ved 20 °C (fjernelse af hunner, der skal bruges til testen)

De voksne testdyr fjernes fra den synkroniserede kultur og tilsættes til testbeholderne mellem den 28. og den 35. dag, efter at hunnerne i forældregenerationerne har påbegyndt æglægningen (dvs. 7-14 dage efter at de er blevet voksne). Det sikrer, at testdyrene allerede har passeret præ-æglægningsperioden og har parret sig med hanner, der også er til stede i dyrkningsbeholderen. Observationer i laboratoriekulturer tyder på, at hunner parrer sig umiddelbart eller kort efter at være blevet voksne, hvis der er hanner til stede (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Perioden på syv dage er valgt for at lette integrationen i laboratorierutinen og mindske variabiliteten i midernes udvikling. Æglægningen indledes med mindst det antal hunner, der vil være nødvendig til testen (hvis der f.eks. er brug for 400 hunner i testen, lades mindst 400 hunner lægge ægt i 2-3 dage). Mindst 1 200 æg bør være udgangspunktet for den synkroniserede bestand (kønsforhold ca. 0,5, dødelighed ca. 0,2). For at forhindre kannibalisme er det hensigtsmæssigt ikke at holde mere end 20-30 æglæggende hunner i en beholder.

Tillæg 5

Ekstraktionsmetoder

For mikroartropoder er varmeeekstraktion en egnet metode til at udtage dyr fra jorden/substratet (se figur nedenfor). Metoden er baseret på organismernes aktivitet, hvilket betyder, at kun mobile dyr vil kunne registreres. Princippet i varmeeekstraktion er at gøre betingelserne for organismerne gradvist værre i prøven, således at de vil forlade substratet og falde ned i en fikseringsvæske (f.eks. ethanol). Afgørende punkter er ekstraktionens varighed og gradienten for gode til moderate til dårlige betingelser for organismerne. Varigheden af ekstraktionen med henblik på økotoksikologiske test skal være så kort som muligt, fordi en eventuel populationstilvækst i ekstraktionsperioden ville give falske resultater. På den anden side skal temperatur- og fugtforholdene i prøven altid ligge inden for et interval, der tillader miderne at bevæge sig. Opvarmningen af en jordprøve fører til udtørring af substratet. Hvis udtørringen foregår for hurtigt, vil nogle af miderne måske også tørre ud, inden de kan slippe ud.

Derfor foreslås følgende fremgangsmåde (24) (25):

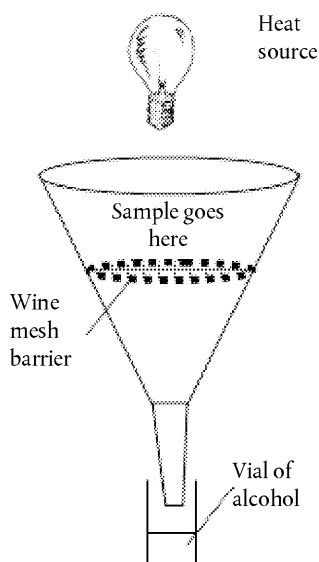
Apparatur: Tullgren-tragt eller tilsvarende metoder som f.eks. McFadyen (opvarmning ovenfra, prøven anbringes over en tragt)

Varmeforhold: 25 °C i 12 timer, 35 °C i 12 timer, 45 °C i 24 timer (i alt 48 timer). Temperaturen måles i substratet.

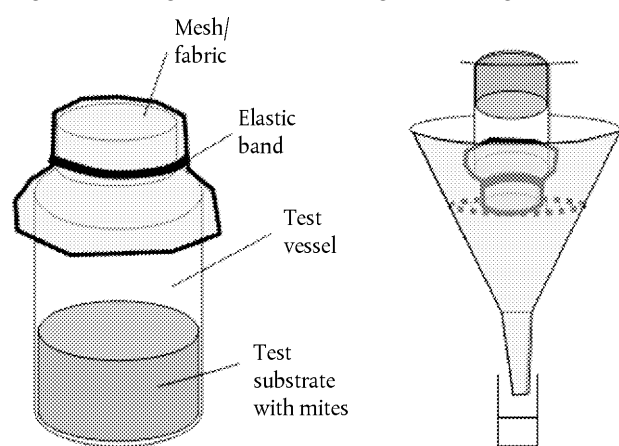
Fikseringsvæske: 70 % ethanol

Fremgangsmåde: Tag det hætteglas, der blev brugt til testen. Fjern låget, og dæk åbningen med et stykke net eller stof. Stoffet bør have en maskestørrelse på 1,0-1,5 mm. Fastgør stoffet med en elastik. Vend forsigtigt hætteglasset på hovedet, og anbring det i ekstraktionsapparatet. Stoffet forhindrer substrat i at løbe ned i fikseringsvæsken, men tillader mider at forlade prøven. Påbegynd opvarmningen, når alle hætteglas er anbragt. Afslut ekstraktionen efter 48 timer. Fjern hætteglassene med fikseringsvæske, og tæl miderne ved hjælp af et dissektionsmikroskop.

Den valgte metodes ekstraktionseffektivitet skal være påvist mindst en eller to gange om året ved hjælp af beholdere, som indeholder et kendt antal unger og voksne mider i ubehandlet testsubstrat. Effektiviteten skal gennemsnitligt være ≥ 90 % for alle udviklingstrin samlet set.

Tullgren-ekstraktionsanordning

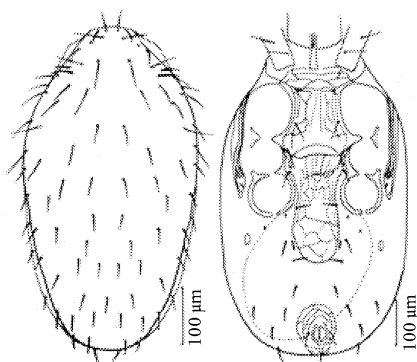
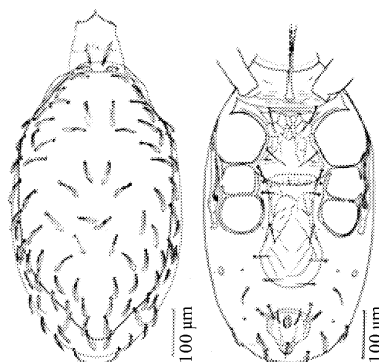
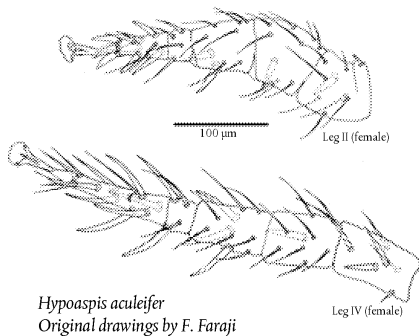
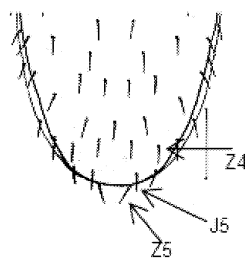
Klargøring af testhætteglasset efter afslutning af testen og inden ekstraktion



Tillæg 6

Identifikation af *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Underklasse/orden/underorden:	Familie:	Slægt/underslægt/art:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Forfatter og dato:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. januar 2007.	
Litteraturliste	W. Karg (1993), Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben, Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. A. M. Hughes (1976), The mites of stored food and houses, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: s. 400 ff. G. W. Krantz (1978), A manual of Acarology, Oregon State University Book Stores, Inc., s. 509 ff.	
Deterministiske egenskaber:	Tectum med afrundet tandkant; hypostomale riller med mere end seks dentikler; bageste dorsale setae på Z4 ikke særlig lange; børsteformede dorsale setae; genitalt skjold normalt, ikke særlig forstørret og når ikke det anale skjold; bageste halvdel af dorsalt skjold uden uparrede setae; ben II og IV med tykke makrosetae; dorsal seta Z5 ca. to gange længere end J5; fast led på chelicera med 12-14 tænder og bevægeligt led med to tænder; idiosoma 520-685 µm lang. <i>Hypoaspis miles</i> bruges også til biologisk kontrol og kan forveksles med <i>H. aculeifer</i>. Den største forskel er: <i>H. miles</i> tilhører underslægten <i>Cosmolaelaps</i> og har knivlignende dorsale setae, mens <i>H. aculeifer</i> tilhører underslægten <i>Geolaelaps</i> og har børsteformede dorsale setae.	

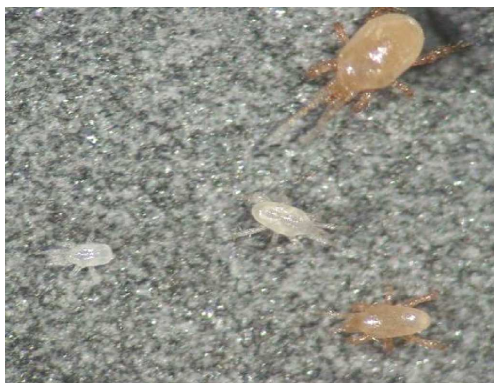
*Hypoaspis aculeifer* After Hughes, 1976*Hypoaspis miles* After Hughes, 1976*Hypoaspis aculeifer*
Original drawings by F. Faraji*Hypoaspis aculeifer*,
dorsal shield with characteristic setae

Tillæg 7

Grundlæggende oplysninger om biologien for *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer tilhører familien Lealapidæ, ordenen Acari (mider), klassen Arachnida, rækken Arthropoda. De lever i alle typer jord og æder andre mider, nematoder, enchytraeider og collemboler (26). Ved fødemangel begynder de at æde hinanden (27). Rovmider består af idiosoma og gnathosoma. For så vidt angår idiosoma, kan der ikke klart skelnes mellem prosoma (forkrop) og opisthosoma (abdomen). Gnathosoma (hovedskjoldet) omfatter instrumenterne til indtagelse af føde, f.eks. palper og chelicera. Chelicernerne er tredelte og forsynet med tænder af forskellig størrelse. Ud over indtagelse af føde bruger hannerne primært deres chelicerer til at overføre spermatoferne til hunnerne. Et dorsalt figur 1skjold dækker idiosoma næsten helt. Kønsorganerne udgør en stor del af idiosoma hos hunner, og de er særlig fremtrædende kort før æglægning. Der er to ventrale skjold, det sternale skjold og det genitale skjold. Alle ben er forsynet med børster og torne. Børsterne bruges til forankring, når dyret bevæger sig i eller på jorden. Det første benpar bruges primært som antenner. Det andet benpar bruger miden ikke kun til at bevæge sig med, men også til at fastholde bytte. Tornene på det fjerde benpar kan benyttes til beskyttelse og som »motor« (28). Hanner er 0,55-0,65 mm lange og vejer 10-15 µg. Hunner er 0,8-0,9 mm lange og vejer 50-60 µg (8)(28) (figur 1).

Figur 1

Hun, han, protonymfe og larve af *H. aculeifer*.

Ved 23 °C bliver miderne kønsmodne efter henholdsvis 16 dage (hunner) og 18 dage (hanner) (6). Hunnerne overfører sperma med solenostom, hvorfra de overføres til ovariet. I ovariet modnes og opbevares sperma. Befrugtning finder først sted efter modning af sperma i ovariet. De befrugtede eller ubefrugtede æg lægges af hunnerne i klumper eller enkeltvis, fortrinsvis i sprækker eller huller. Parrede hunner kan bære afkom af begge køn, hvorimod der fra æg lagt af uparrede hunner kun klækkes afkom af hankøn. Under udviklingen til voksen gennemgås fire udviklingsstadier (æg — larve, larve — protonymfe, protonymfe — deutonymfe, deutonymfe — voksen).

Ægget er mælkehvidt, glasklart, elliptisk og ca. 0,37 mm langt med en fast skal. Ifølge (8) er larverne 0,42-0,45 mm lange. De har kun tre benpar. I hovedområdet er der udviklet palper og chelicerer. Chelicernerne, som har nogle få små dentikler, bruges til klækning fra ægget. Efter den første afstødning af larvehud, 1-2 dage efter klækningen, udvikles protonymferne. De er også hvide, 0,45-0,62 mm lange (8) og har fire benpar. Tænderne er fuldt udviklet på chelicernerne. Fra dette stadium begynder miderne at indtage føde. Med henblik herpå gennembores byttets overhud med chelicernerne, og et sekret til ekstraintestinal fordøjelse sprøjtes ind i byttet. Herefter kan miden suge fødemassen op. Chelicernerne kan også bruges til at rive større partikler ud af klumper af føde (28). Efter endnu en afstødning af hud udvikles deutonymferne. De er 0,60-0,80 mm (8) lange og gule til lysebrune. Fra dette stadium kan der skelnes mellem hunner og hanner. Efter en periode med yderligere afstødning af hud, hvor dyrene er inaktive, og det brune skjold udvikler sig (efter ca. 14 dage), er miderne voksne (28)(29)(30). Deres levetid er 48-100 dage ved 25 °C (27).

Tillæg 8

Sammenfatning og tidsplan for de vigtigste trin i hypoaspistesten

Tid (dage) testens start = dag 0	Aktivitet/opgave
Dag – 35 til – 28	Overfør hunner fra stamkultur til rene beholdere for at påbegynde synkroniseringen 2 dage senere: fjernelse af hunner to eller tre gange om ugen: Giv tilstrækkeligt foder
Dag – 5 (+/- 2)	Klargør syntetisk jord
Dag – 4 (+/- 2)	Bestem den syntetiske jords WHC Tør natten over Næste dag: Vej prøver, og beregn WHC
Dag – 4 (+/- 2)	Fugt syntetisk jord til en WHC på 20-30 %
Dag 0	Start testen: Tilsæt testkemikalie til den syntetiske jord Tilsæt ti hunner til hver replikat Vej hver replikat Opstil abiotiske kontroller for fugtindhold og pH, to replikater for hver behandling Tør fugtkontroller natten over Næste dag: Vej fugtkontroller Næste dag: Mål de tørrede abiotiske kontrollers pH
Dag 3, 6, 9, 12 (ca.)	Tilsæt et tilstrækkeligt antal bytteorganismer til hver replikat Vej hver replikat, og erstat eventuelt fordampet vand
Dag 14	Afslut testen, opstil ekstraktion med alle replikater plus ekstraktionseffektivitetskontroller Tør vandindholdskontroller natten over Næste dag: Vej vandindholdskontroller Næste dag: Mål de tørrede kontrollers pH
Dag 16	Afslut ekstraktion
Dag 16+	Registrer antal voksne og unger i ekstraheret materiale Anfør resultaterne i standardtabeller i rapporten Anfør testproceduren i forsøgsprotokolark

C.37. 21-DAGES ASSAY MED FISK: EN KORTTIDSSCREENINGSTEST FOR ØSTROGENE OG ANDROGENE VIRKNINGER OG AROMATASEHÆMNING.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 230 (2009). Behovet for at udvikle og validere et assay med fisk, der kan opspore visse hormonforstyrrende kemikalier, udspringer af bekymringer om, at kemikaliekoncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv som følge af disse kemikaliers interaktion med det endokrine system. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en testvejledning til screening af kemikalier, der påvirker hvirvelløse fiskearters endokrine system. Dette 21-dages assay til screening af det endokrine system hos fisk gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser mellem laboratorier med udvalgte kemikalier med henblik på at påvise assayets relevans og pålidelighed for sporing af østrogen- og aromatasehæmmende kemikalier (1, 2, 3, 4, 5) hos de tre undersøgte fiskearter (tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafisk); sporing af androgene virkninger er mulig hos tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke hos zebrafisk. Denne testmetode giver ikke mulighed for sporing af antiandrogene kemikalier. Valideringsarbejdet har været genstand for en peer review foretaget af et panel af eksperter udnævnt af the National Coordinators of the Test Guideline Programme (6) (de nationale koordinatore af testvejledningsprogrammet). Assayet er ikke egnet til at identificere specifikke hormonforstyrrende mekanismer, fordi testdyrene har en intakt hypothalamus-hypofyse-gonadeakse (HPG), som kan reagere på kemikalier, der har indvirkning på HPG-aksen på forskellige niveauer. Assayet for fisks reproduktion på kort sigt (Fish Short Term Reproduction assay, OECD TG 229) omfatter frugtbarhed og eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne hos tykhovedet elritse samt alle testmetodens endepunkter. OECD TG 229 vedrører screening for kemikalier, som påvirker reproduktionen via forskellige mekanismer, herunder via det endokrine system. Dette bør overvejes, inden man vælger den mest egnede testmetode.
2. I nærværende testmetode beskrives et in vivo-screeningssay, hvor kønsmodne hanfisk og gydende hunfisk holdes sammen og eksponeres for et kemikalie i en begrænset del af deres livscyklus (21 dage). Ved afslutningen af eksponeringsperioden på 21 dage måles en eller to — afhængigt af den anvendte art — biomarkør-endepunkter hos hanner og hunner som indikatorer på testkemikaliet østrogen- eller aromatasehæmning eller androgene virkninger; disse endepunkter er vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Vitellogenin måles hos tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafisk, hvorimod sekundære kønskarakteristika kun måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk.
3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningssay for visse virkninger på det endokrine system, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (28).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Vitellogenin produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som reaktion på cirkulerende endogent østrogen. Det er en præcursor for æggeblomme proteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som udvikles. Vitellogenin er stort set ikke-detekterbart i plasma hos umodne hun- og hanfisk, fordi de ikke har tilstrækkeligt cirkulerende østrogen; leveren kan dog syntetisere og udskille vitellogenin som reaktion på stimulering fra eksogent østrogen.
5. Målingen af vitellogenin benyttes til at afdække kemikalier med forskellige østrogene virkemåder. Afdækning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af vitellogenininduktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer reviews (f.eks. (7)). Vitellogenininduktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgene (8, 9). En reduktion i niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17 β -østradiol, forårsager et fald i vitellogeninniveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (10, 11). Den biologiske relevans af vitellogeninresponsen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og bredt dokumenteret. Det er dog muligt, at produktion af vitellogenin hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-endokrine toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet.

6. Flere målemetoder til rutinebrug er blevet udviklet og standardiseret. Det gælder artsspecifikke enzymkoblede immunadsorptionsteknikker (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)), hvor der bruges immunkemi til kvantificering af vitellogenin produceret i små blod- eller leverprøver indsamlet fra enkeltfisk (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Der udtages prøver af blod fra tykhovedet elritse, blod eller hoved/hale-homogenat fra zebrafisk og lever fra japansk risfisk med henblik på vitellogeninmåling. Hos japansk risfisk er der en god sammenhæng mellem vitellogenin målt fra blod og fra lever (19). Tillæg 6 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til vitellogeninanalyse. Kit til måling af vitellogenin er let tilgængelige; sådanne kit bør være baseret på en valideret artsspecifik ELISA-metode.
7. Sekundære kønskarakteristika for hanner af visse arter er synlige udvendigt, kan kvantificeres og reagerer på cirkulerende niveauer af endogene androgener; det er tilfældet for tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke for zebrafisk, som ikke har kvantificerbare sekundære kønskarakteristika. Hunner bevarer evnen til at udvikle sekundære kønskarakteristika for hanner, når de eksponeres for androgene kemikalier i vand. Flere undersøgelser i den videnskabelige litteratur dokumenterer denne type respons hos tykhovedet elritse (20) og japansk risfisk (21). Et fald i sekundære kønskarakteristika hos hanner bør fortolkes med forsigtighed på grund af den lave statistiske styrke og bør være baseret på en ekspertvurdering og vægten af evidens. Der er begrænsninger, for så vidt angår brugen af zebrafisk i dette assay, på grund af fraværet af kvantificerbare sekundære kønskarakteristika, som reagerer på kemikalier med androgene virkninger.
8. Hos tykhovedet elritse er den primære indikator på eksogen androgen eksponering antallet af legevorter på hunfiskens snude. Hos japansk risfisk udgør antallet af papillære strukturer hovedmarkøren for eksogen eksponering for androgene kemikalier hos hunfisk. Tillæg 5A og tillæg 5B indeholder oplysninger om de anbefalede fremgangsmåder til vurdering af kønskarakteristika hos henholdsvis tykhovedet elritse og japansk risfisk.
9. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

10. I assayet eksponeres han- og hunfisk i reproduktiv tilstand sammen i testbeholderne. Deres voksne og reproduktive tilstand gør det muligt klart at skelne mellem kønnene og dermed foretage en kønsrelateret analyse af hvert endepunkt og sikrer, at de er følsomme over for eksogene kemikalier. Ved testens afslutning bekræftes kønnet ved undersøgelse af kønskirtlerne i makroskop efter åbning af abdomen gennem bugen med en saks. Tillæg 2 indeholder en oversigt over de relevante betingelser for bioassayet. Assayet indledes normalt med fisk udtaget fra en bestand i gydningstilstand; der må ikke bruges senescerende dyr. Retningslinjer for fiskens alder og reproduktive tilstand findes i afsnittet om valg af fisk. Assayet udføres med tre eksponeringskoncentrationer af kemikaliets samt en vandkontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Der bruges to beholdere eller replikater pr. behandling (hver beholder indeholder fem hanner og fem hunner) ved japansk risfisk og zebrafisk, mens der ved tykhovedet elritse bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling (hver beholder indeholder to hanner og fire hunner). Det sker med henblik på tilpasning til tykhovedet elritse-hannens territoriale adfærd og for samtidig at sikre tilstrækkelig styrke i assayet. Eksponeringen varer 21 dage, og prøveudtagningen af fisk sker på eksponeringsdag 21.
11. Ved prøveudtagningen på dag 21 aflives alle dyr på en human måde. Sekundære kønskarakteristika måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk (se tillæg 5A og tillæg 5B); der tages blodprøver til bestemmelse af vitellogenin hos zebrafisk og tykhovedet elritse; alternativt kan hoved/hale indsamles til bestemmelse af vitellogenin hos zebrafisk (tillæg 6); der indsamles lever med henblik på analyse af vitellogenin hos japansk risfisk (tillæg 6).

ACCEPTKRITERIER FOR TESTEN:

12. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:
 - Dødeligheden i vandkontrollerne (eller opløsningsmiddelkontrollerne) må ikke overstige 10 % ved afslutningen af eksponeringsperioden.
 - Koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele eksponeringsperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV).

- Vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end $\pm 1,5$ °C mellem testbeholderne og må ikke afvige med mere end 2 °C fra de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 2).
- Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliets i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

13. 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 inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 2)
- e) gydningssubstrat for tykhovedet elritse og zebrafisk; de nødvendige oplysninger findes i tillæg 4
- f) tilstrækkeligt nøjagtig vægt (dvs. en nøjagtighed på $\pm 0,5$ mg).

Vand

14. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse 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. For at sikre at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliets), 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^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- og SO_4^{2-}), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant i mindst et år, kan analyserne foretages med større intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 3 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

15. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliets i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Saturation columns (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærestof. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, skal der anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne. For kemikalier, der er vanskelige at teste, kan et opløsningsmiddel være den teknisk bedste løsning; det beskrives i OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (22). Valget af opløsningsmiddel afgøres af kemikaliets kemiske egenskaber. OECD's vejledning anbefaler maksimalt 100 µl/l, hvilket skal overholdes. En gennemgang for nylig (23) fremhævede dog yderligere bekymringer i forbindelse med brug af opløsningsmidler til testning af hormonforstyrrelser. Det anbefales derfor, at opløsningsmiddelkoncentrationen om nødvendigt minimeres, når det er teknisk muligt (afhængigt af testkemikaliet's fysisk-kemiske egenskaber).
16. Der anvendes et testsystem med gennemstrømning. Et sådan system doserer og fortynder kontinuerligt en stamopløsning af testkemikaliets (f.eks. udmålingspumpe, proportional fortynder, mætningssystem), så der afgives en serie af 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. Der skal udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer af lavere kvalitet undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier. Ved valg af materiale til gennemstrømningssystemet bør der tages højde for den eventuelle adsorption af testkemikaliets til dette materiale.

Opbevaring af fiskene

17. Testfisk udvælges fra en laboratoriepopulation, fortrinsvis fra en enkelt bestand, som i mindst to uger forud for testen akklimatiseres under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden (definitioner i tillæg 1) er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 2).
18. Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:
 - dødelighed på mere end 10 % af populationen på syv dage: Hele fiskegruppen kasseres
 - dødelighed på mellem 5 % og 10 % af populationen: Akklimatisering i yderligere syv dage, og hvis dødeligheden er over 5 % i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen
 - dødelighed på mindre end 5 % af populationen på syv dage: Fiskegruppen godkendes.
19. Fiskene må ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden, i præeksponeringsperioden eller i eksponeringsperioden.

Præeksponering og valg af fisk

20. Der anbefales en præeksponeringsperiode på en uge, hvor dyrene anbringes i beholdere svarende til dem, der anvendes i den egentlige test. Fisk fodres ad libitum gennem hele opbevaringsperioden og i eksponeringsfasen. Eksponeringsfasen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr (f. eks. med tydelige synlige sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk), som er aktivt gydende. Som generel vejledning (og ikke isoleret ud fra observationen af en given fiskegruppes faktiske reproduktive tilstand) bør tykhovedet elritse være ca. 20 ($\pm$ 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i hele deres levetid. Japanske risfisk bør være ca. 16 ($\pm$ 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i hele deres levetid. Zebrafisk bør være ca. 16 ($\pm$ 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i hele deres levetid.

TESTDESIGN

21. Der bruges tre koncentrationer af testkemikaliets, en kontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Dataene kan analyseres for at bestemme statistisk signifikante forskelle mellem behandlings- og kontrolresponser. Disse analyser bruges i højere grad til at vurdere, om der er brug for yderligere længerevarende testning af kemikaliets skadelige virkninger (navnlig overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion), end til risikovurdering (24).
22. Når der bruges zebrafisk og japansk risfisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (fem hanner og fem hunner i hver af de to replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og eventuelt sekundære kønskarakteristika. Når der bruges tykhovedet elritse, udtages der på eksponeringsdag 21 hanner og hunner (to hanner og fire hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære kønskarakteristika.

Udvælgelse af testkoncentration

23. I denne test fastsættes den højeste testkoncentration til den maksimalt tolererede koncentration (MTC) bestemt ud fra test til bestemmelse af dosisinterval eller andre toksicitetsdata eller 10 mg/l eller den maksimale opløselighed i vand, alt efter hvilken der er lavest. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger eksisterende empiriske data om akut toksicitet eller andre toksicitetsdata, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC.
24. Der skal benyttes tre testkoncentrationer med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 10, og en fortyndingsvandkontrol (og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol). Det anbefales at benytte en afstandsfaktor på mellem 3,2 og 10.

FREMGANGSMÅDE

Udvælgelse og vejning af testfisk

25. Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved assayets begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i tillæg 2. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for det relevante køn. Det anbefales at veje en delprøve af fiskebestanden inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Eksponeringsbetingelser*Varighed*

26. Testens varighed er 21 dage efter en præeksponeringsperiode. Den anbefalede præeksponeringsperiode er en uge.

Fodring

27. Fiskene fodres ad libitum med et passende foder (tillæg 2) og tilstrækkeligt ofte til at bevare kropstilstanden. Mikrobiel vækst og urenheder i vandet skal undgås. Som hovedregel kan den daglige ration opdeles i to eller tre lige store portioner til flere fodringer om dagen med mindst tre timers interval. En større ration kan accepteres, navnlig i weekender. Fiskene bør ikke fodres i 12 timer inden prøveudtagning/makroskopisk undersøgelse.
28. Fiskefoder evalueres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af fytoøstrogener, som ville kompromittere assayets respons på en kendt østrogenagonist (f.eks. østradiol-17 β), bør undgås.
29. Foderrester og fækalt materiale skal fjernes fra testbeholderne mindst to gange om ugen f.eks. ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af en sifon.

Lys og temperatur

30. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (se tillæg 2).

Hyppighed af analyser og målinger

31. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikaliertilførselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder skal være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikalie regelmæssigt som følger: Gennemstrømningshastigheden for fortyndingsmidlet og giftstofstamopløsningen kontrolleres fortrinsvis dagligt, men som minimum to gange om ugen, og må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Det anbefales, at de faktiske testkemikaliekoncentrationer måles i alle beholdere ved testens begyndelse og efterfølgende ugentligt.
32. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.
33. Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Hvis det er nødvendigt, anbefales centrifugering. Det anbefales at centrifugere prøverne, men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan filtrering også accepteres.

34. I løbet af testen skal opløst ilt, temperatur og pH måles i alle testbeholderne mindst en gang om ugen. Samlet hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles i kontrolbeholderne og i en beholder med den højeste koncentration mindst en gang om ugen. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

35. En række generelle (f.eks. overlevelse) og centrale biologiske responser (f.eks. vitellogeninniveauer) vurderes i løbet af assayet eller ved afslutningen af assayet. Måling og evaluering af disse endepunkter og deres anvendelse er beskrevet nedenfor.

Overlevelse

36. Fiskene undersøges dagligt i testperioden, eventuel dødelighed registreres, og den døde fisk fjernes så hurtigt som muligt. Døde fisk erstattes hverken i kontrol- eller testbeholderne. Kønnene for fisk, der dør under testen, bestemmes ved makroskopisk undersøgelse af kønskirtlerne.

Adfærd og udseende

37. Enhver unormal adfærd (i forhold til kontrollerne) registreres; det kan omfatte tegn på generel toksicitet, herunder hyperventilation, ukoordineret svømning, tab af ligevægt og atypisk ubevægelighed eller fouragering. Yderligere ydre abnormaliteter (f.eks. blødning, misfarvning) registreres. Sådanne tegn på toksicitet bør overvejes nøje i forbindelse med fortolkningen af data, da de kan være et tegn på koncentrationer, hvor biomarkører for hormonforstyrrelser ikke er pålidelige. Sådanne adfærdsmæssige observationer kan også være nyttige kvalitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til testning med fisk. Eksempelvis er der observeret territorial aggressivitet hos normale hanner eller maskuliniserede hunner hos tykhovedet elritse under androgen eksponering; hos zebrafisk reduceres eller hindres den karakteristiske parrings- og gydningsadfærd efter daggy ved østrogen eller antiandrogen eksponering.
38. Fordi visse aspekter af udseendet (primært farven) kan ændre sig hurtigt ved håndtering, er det vigtigt, at kvalitative observationer foretages, inden dyrene fjernes fra testsystemet. Tidligere erfaringer med tykhovedet elritse tyder på, at visse hormonforstyrrende kemikalier i første omgang kan forårsage ændringer i følgende ydre karakteristika: kropsfarve (lys eller mørk), farvemønstre (lodrette bånd) og kropsform (hoved- og brystområde). Derfor bør fiskenes fysiske udseende observeres i løbet af testen og ved afslutningen af undersøgelsen.

Human aflivning af fisk

39. På dag 21, dvs. ved eksponeringens afslutning, aflives fiskene med passende mængder tricain (tricainmethansulfonat), metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l bufret med 300 mg/l NaHCO₃ (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne; blod eller væv udtages derefter med henblik på bestemmelse af vitellogenin som forklaret i punktet om vitellogenin.

Observation af sekundære kønskarakteristika

40. Visse hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage ændringer i specialiserede sekundære kønskarakteristika (antal legevorter hos tykhovedet elritse-hanner, papillære strukturer hos japansk risfisk-hanner). Kemikalier med visse virkemåder kan navnlig forårsage abnormal forekomst af sekundære kønskarakteristika hos dyr af det modsatte køn; eksempelvis kan androgene receptoragonister, som trenbolon, methyltestosteron og dihydrotestosteron, få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle fremtrædende legevorter eller japansk risfisk-hunner til at udvikle papillære strukturer (11, 20, 21). Det er også blevet beskrevet, at østrogenreceptoragonister kan reducere antallet af legevorter og størrelsen af nakkefremspringet hos voksne hanner (25, 26). Sådanne makroskopiske morfologiske observationer kan også være nyttige kvalitative og kvantitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til testning med fisk. Antallet og størrelsen af legevorter hos tykhovedet elritse og papillære strukturer hos japansk risfisk kan kvantificeres direkte eller mere praktisk hos præservede dyr. Anbefalede fremgangsmåder til evaluering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk findes i henholdsvis tillæg 5A og tillæg 5B.

Vitellogenin (VTG)

41. Blod indsamles fra halearterien/-venen med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør eller alternativt ved hjertepunktur med en kanyle. Afhængigt af fiskens størrelse kan der generelt indsamles 5-60 µl blod pr. individ hos tykhovedet elritse og 5-15 µl pr. individ hos zebrafisk. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering og opbevares med proteaseinhibitorer ved - 80 °C, indtil det skal undersøges for vitellogenin. Alternativt bruges leveren hos japansk risfisk og hoved-/halehomogenat hos zebrafisk som kilde til væv til bestemmelse af vitellogenin (tillæg 6). VTG-målingen skal være baseret på en valideret homolog ELISA-metode, og der skal anvendes en homolog VTG-standard og homologe antistoffer. Det anbefales at bruge en metode, hvor der kan påvises VTG-niveauer så lave som nogle få ng/ml plasma (eller ng/mg væv), som er baggrunds niveauet hos ikke-eksponerede hanfisk.
42. Kvalitetskontrol af vitellogeninanalyse sker ved brug af standarder, blindprøver og mindst to analyser. For hver ELISA-metode gennemføres en test for matrixeffekt (effekt af prøveopløsning) for at bestemme minimumsfaktoren for prøveopløsningen. Hver ELISA-plade, der bruges til VTG-assay, skal omfatte følgende kvalitetskontrolprøver: mindst seks kalibreringsstandarder, som omfatter det forventede interval af vitellogeninkoncentrationer, og mindst en ikke-specifik bindingsassayblindprøve (analyseres to gange). Disse blindprøvers absorbans bør være under 5 % af den maksimale kalibreringsstandardabsorbans. Der analyseres mindst to alikvoter (dobbeltp prøver i brønde) af hver prøveopløsning. Dobbeltp prøver i brønde, som afviger med mere end 20 %, analyseres igen.
43. Korrelationskoefficienten (R^2) for kalibreringskurverne bør være større end 0,99. En høj korrelation er imidlertid ikke nok til at garantere tilstrækkelig forudsigelse af koncentrationen i alle intervaller. Ud over at have en tilstrækkelig høj korrelation for kalibreringskurven, bør koncentrationen for hver standard, som beregnet på grundlag af kalibreringskurven, være 70-120 % af den nominelle koncentration. Hvis de nominelle koncentrationer afviger fra kalibreringsregressionslinjen (f.eks. ved lavere koncentrationer), kan det være nødvendigt at opdele kalibreringskurven i lave og høje intervaller eller bruge en ikke-lineær model til at tilpasse absorbansdataene. Hvis kurven er opdelt, bør R^2 for begge linjesegmenter være $> 0,99$.
44. Detektionsgrænsen (LOD) defineres som koncentrationen af den laveste analytiske standard, og kvantificeringsgrænsen (LOQ) defineres som den laveste analytiske standard ganget med den laveste fortyndingsfaktor.
45. På hver dag, hvor der gennemføres vitellogeninassay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet (tillæg 7). Forholdet mellem den forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert assaysæt gennemført på den pågældende dag.

DATA OG RAPPORTERING

Evaluering af biomarkørresponsen ved variansanalyse (ANOVA)

46. For at identificere et kemikalies potentielle hormonforstyrrende virkning sammenlignes responser for henholdsvis behandlinger og kontrolgrupper ved variansanalyse (ANOVA). Når der bruges en opløsningsmiddelkontrol, udføres en passende statistisk test til sammenligning af fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontroller for hvert endepunkt. Vejledning i hvordan data om fortyndingsvand og opløsningsmiddel håndteres i den efterfølgende statistiske analyse, findes i OECD, 2006c (27). Alle data om biologisk respons analyseres og registreres særskilt i rapporten fordelt på køn. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normalfordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartlett's eller Levenes test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA. Dunnetts test (parametrisk) på flere parvise sammenligninger eller Mann-Whitney-testen med Bonferroni-justering (ikke-parametrisk) kan bruges til ikke-monotont dosis/respons-forhold. Der kan bruges andre statistiske test (f.eks. Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test), hvis dosis/respons-forholdet omtrent er monotont. Tillæg 8 indeholder et statistisk flowdiagram, som kan hjælpe med at træffe beslutning om, hvilken statistisk test der er mest egnet. Der kan desuden findes yderligere oplysninger i OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (27).

Rapportering af testresultater

47. Undersøgellesdataene skal omfatte:

Testlaboratorium:

- Ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar
- Hvert laboratorium skal have dokumenteret kendskab til en række repræsentative kemikalier.

Testkemikalie:

- Karakterisering af testkemikalie
- Fysisk form og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- Klargøring af testkoncentrationer: metode og frekvens
- Information om stabilitet og bionedbrydelighed.

Opløsningsmiddel:

- Karakterisering af opløsningsmiddel (form, anvendt koncentration)
- Begrundelse for valg af opløsningsmiddel (hvis andet end vand).

Testdyr:

- Art og stamme.
- Leverandør og særlig leverandør
- Fiskens alder ved begyndelsen af testen og reproduktiv tilstand/gydningstilstand
- Oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr
- Fiskenes kropsvægt ved eksponeringsperiodens start (fra en delprøve af fiskebestanden).

Testbetingelser:

- Anvendt testprocedure (testtype, belastningsgrad, bestandtæthed osv.)
- Metode til fremstilling af stamopløsning og gennemstrømningshastighed
- De nominelle testkoncentrationer, ugentligt målte koncentrationer af testopløsningerne og anvendte analysemetoder, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning
- Fortyndingsvandets karakteristika (herunder pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor, samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof og samtlige andre udførte målinger)
- Vandkvalitet i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt
- Detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde samt fodermængde og fodringshyppighed såvel som analyser for relevante kontaminanter, hvis de foreligger (f.eks. PCB'er, PAH'er og organochlorpesticider).

Resultater

- Bevis for, at kontrollerne opfylder testens acceptkriterier
- Data om eventuel dødelighed ved enhver testkoncentration og kontrol
- Anvendte statistiske analyseteknikker, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker
- Data om biologiske observationer af makromorfologi, herunder sekundære kønskarakteristika og vitellogenin
- Resultater af dataanalyserne, fortrinsvis i tabelform og grafisk form
- Forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF TESTRESULTATER

48. Denne del beskriver overvejelser, der bør tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne for de forskellige målte endepunkter. Resultaterne bør fortolkes med forsigtighed, når testkemikallet tilsyneladende forårsager åbenlys toksicitet eller har indvirkning på testdyrets generelle tilstand.
49. Ved fastsættelse af testkoncentrationsintervallet skal det sikres, at den maksimalt tolererede koncentration ikke overstiges, for at give mulighed for en relevant fortolkning af dataene. Det er vigtigt at have mindst en behandling, hvor der ikke er nogen tegn på toksiske virkninger. Tegn på sygdom og tegn på toksiske virkninger bør vurderes nøje og anføres i rapporten. Det er f.eks. muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-hormonforstyrrende toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet. Fortolkningen af virkningerne kan dog styrkes af andre behandlingsniveauer, som ikke konfundes af systemisk toksicitet.
50. Nogle få aspekter skal overvejes, hvis testresultaterne skal godkendes. Som hovedregel skal VTG-niveauerne måles hos kontrolgrupper af hanner og hunner hver for sig og være adskilt med omkring tre størrelsesordener hos tykhovedet elritse og zebrafisk og omkring en størrelsesorden hos japansk risfisk. Eksempler på værdiintervallet i kontrol- og behandlingsgrupperne findes i valideringsrapporterne (1, 2, 3, 4). Høje VTG-værdier hos hanner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise svage østrogenagonister. Lave VTG-værdier hos hunner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise aromataseinhibitorer og østrogenagonister. Valideringsundersøgelserne dannede udgangspunkt for vejledningen.
51. Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør) anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence. Det anbefales at bruge kemikalier med en række virkemåder eller indvirkning på en række testendepunkter. I praksis opfordres hvert laboratorium til at opbygge sine egne historiske kontroldata for hanner og hunner og teste et positivt kontrolkemikalie for østrogenaktivitet (f.eks. østradiol-17 β ved 100 ng/l eller en kendt svag agonist), som fører til øget VTG hos hanfisk, et positivt kontrolkemikalie for aromataseinhibering (f.eks. fadrozol eller prochloraz ved 300 μ g/l), som fører til reduceret VTG hos hunfisk, og et positivt kontrolkemikalie for androgen aktivitet (f.eks. trenbolon-17 β ved 5 μ g/l), som fører til induktion af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse- og japansk risfisk-hunner. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne (1, 2, 3), for at sikre at laboratoriet har den fornødne tekniske kompetence.
52. Generelt betragtes VTG-målinger som positive, hvis der er en statistisk signifikant stigning i VTG hos hanner ($p < 0,05$) eller et statistisk signifikant fald hos hunner ($p < 0,05$), som minimum ved den højeste testede dosis, sammenlignet med kontrolgruppen, og hvis der ikke er tegn på generel toksicitet. Et positivt resultat underbygges yderligere af påvisningen af et biologisk sandsynligt forhold mellem dosis- og responskurven. Som nævnt tidligere har faldet i vitellogenin muligvis ikke udelukkende endokrin oprindelse; et positivt resultat bør dog generelt fortolkes som bevis for hormonforstyrrende virkning in vivo og bør normalt give anledning til yderligere afklaring.

LITTERATUR

- (1) OECD (2006a), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD 2007, Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) J. W. Owens (2007), Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay, CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (tilgået 18. september 2008).

- (5) US EPA 2007, Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report, ikke-offentliggjort rapport af 15. december 2007, Environmental Protection Agency Washington, DC. s. 104 ff.
- (6) OECD (2008), Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter og Jobling (1995), Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) S. Pawlowski, A. Sauer, J. A. Shears, C. R. Tyler og T. Braunbeck (2004), Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay, *Aquatic Toxicology*; 68 (3):277-91.
- (9) L. Andersen, R. Goto-Kazato, J. M. Trant, J. P. Nash, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) G. T. Ankley, M. D. Kahl, K. M. Jensen, M. W. Hornung, J. J. Korte, E. A. Makynen og R. L. Leino (2002), Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) G. H. Panter, T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, A. Sherren, R. D. Stanley og C. R. Tyler (2004), Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development, *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) L. G. Parks, A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc og C. V. Sullivan (1999), Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) G. H. Panter, C. R. Tyler, S. Maddix, P. M. Campbell, T. H. Hutchinson, R. Länge, C. Lye og J. P. Sumpter (1999), Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals, CEFIC-EMSG research report reference AQ001, CEFIC, Bruxelles, Belgien.
- (14) M. Fenske, R. B. van Aerle, S. C. Brack, C. R. Tyler og H. Segner (2001), Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals, *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) H. Holbech, L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen og P. Bjerregaard (2001), Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131.
- (16) J. Rose, H. Holbech, C. Lindholm, U. Noerum, A. Povlsen, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2002), Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*), *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) F. Brion, B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr og J. M. Porcher, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) H. Yokota, H. Morita, N. Nakano, I. J. Kang, H. Tadokoro, Y. Oshima, T. Honjo og K. Kobayashi (2001), Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*), *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) N. Tatarazako, M. Koshio, H. Hori, M. Morita og T. Iguchi (2004), Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka, *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl, J. J. Korte, M. W. Hornung, T. R. Henry, J. S. Denny, R. L. Leino, V. S. Wilson, M. C. Cardon, P. C. Hartig og L. E. Gray (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow, *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) M. Seki, H. Yokota, H. Matsubara, M. Maeda, H. Tadokoro og K. Kobayashi (2004), Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*), *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
 - (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 23, Paris
 - (23) T. H. Hutchinson, N. Shillabeer, M. J. Winter og D. B. Pickford (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; s. 69-92.
 - (24) T. H. Hutchinson, G. T. Ankley, H. Segner og C. R. Tyler (2006b), Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as »signposts«, not »traffic lights,« in risk assessment, *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (25) S. R. Miles-Richardson, V. J. Kramer, S. D. Fitzgerald, J. A. Render, B. Yamini, S. J. Barbee og J. P. Giesy (1999), Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) D. Martinovic, L. S. Blake, E. J. Durhan, K. J. Greene, M. D. Kahl, K. M. Jensen, E. A. Makynen, D. L. Villeneuve og G. T. Ankley (2008), Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action, *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised), Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, Series on Testing and Assessment No. 150. ENV/JM/MONO(2012)22
-

Tillæg 1

Forkortelser og definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

CV: Variationskoefficient.

ELISA: Enzymkoblet immunadsorptionsteknik.

Belastningsgrad: Fiskens vådvægt pr. vandvolumen.

Bestandtæthed: Antal fisk pr. vandvolumen.

VTG (vitellogenin): Phospholipid-glycoprotein-precursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

HPG-akse: Hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

MTC: Maksimalt tolereret koncentration, som udgør ca. 10 % af LC_{50} .

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Testbetingelser for assay til screening af det endokrine system hos fisk

1. Anbefalet art	Tykhovedet elritse (Pimephales promelas)	Japansk risfisk (Oryzias latipes)	Zebrafisk (Danio rerio)
2. Testtype	Gennemstrømning	Gennemstrømning	Gennemstrømning
3. Vandtemperatur	25 °C ± 2 °C	25 °C ± 2 °C	26 °C ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)
5. Lysintensitet	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode (daggryskumringsovergange er valgfri, men betragtes ikke som nødvendige)	16 t. lys, 8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke
7. Belastningsgrad	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testkammerstørrelse	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volumen testopløsning	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 6 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
11. Testorganismers alder	Se punkt 20.	Se punkt 20.	Se punkt 20.
12. Voksne fisks omtrentlige vådvægt (g)	Hunner: 1,5 ± 20 % Hanner: 2,5 ± 20 %	Hunner: 0,35 ± 20 % Hanner: 0,35 ± 20 %	Hunner: 0,65 ± 20 % Hanner: 0,4 ± 20 %
13. Antal fisk pr. testbeholder	6 (2 hanner og 4 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)
14. Antal behandlinger	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)
15. Antal beholdere pr. behandling	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Antal fisk pr. testkoncentration	16 voksne hunner og 8 hanner (4 hunner og 2 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)

17. Fodring	Levende eller frosne saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående
18. Beluftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning
19. Fortyndingsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand
20. Præ-eksponeringsperiode	7 dage anbefales	7 dage anbefales	7 dage anbefales
21. Varighed af eksponering for kemikaliet	21 dage	21 dage	21 dage
22. Biologiske endepunkter	overlevelse adfærd sek. kønskarakteristika VTG	overlevelse adfærd sek. kønskarakteristika VTG	overlevelse adfærd VTG
23. Testgodkendelse	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 24 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 26 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.

Tillæg 3

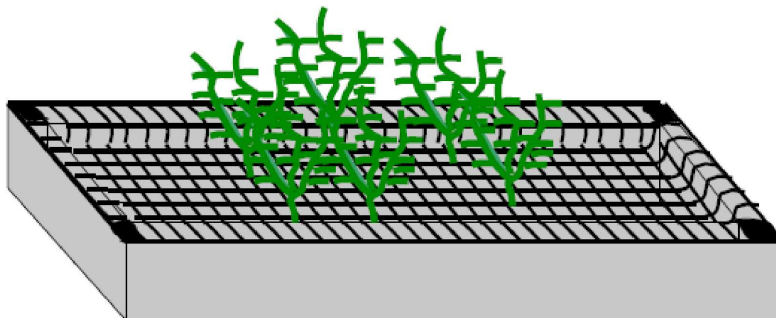
Kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

Komponent	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organiske fosforpesticider i alt	< 50 µg/l
Chlorerede organiske pesticider i alt + polychlorbiphenyler	< 50 µg/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

Tillæg 4A

Gydningssubstrat til zebrafisk

Gydningsbakke: instrumentbakke af glas, f.eks. $22 \times 15 \times 5,5$ cm ($l \times b \times d$), dækket med et aftageligt rustfrit metalgitter (maskebredde 2 mm). Gitteret bør dække instrumentbakkens åbning på et niveau under kanten.



Gydningssubstratet fastgøres på gitteret. Det skal fungere som en struktur, fisken kan bevæge sig ind i. Syntetiske akvarieplanter fremstillet af grønt plastmateriale er f.eks. egnede (NB: eventuel adsorption af testkemikaliet til plastmaterialet bør overvejes). Plastmaterialet bør være udvasket i et tilstrækkeligt volumen varmt vand, til at sikre at ingen kemikalier kan afgives til testvandet. Ved brug af glasmaterialer sikres det, at fiskene hverken skades eller sidder fast i forbindelse med deres kraftige aktivitet.

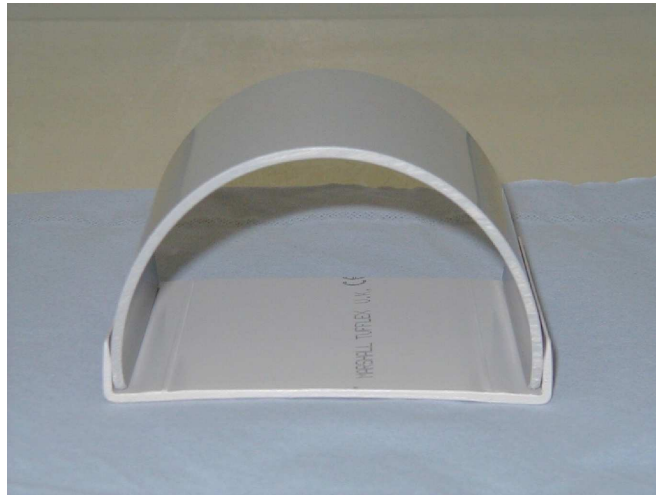
Afstanden mellem bakken og glaspladen bør være mindst 3 cm, for at sikre at gydningen ikke sker uden for bakken. De æg, der lægges på bakken, falder gennem gitteret og kan udtages 45-60 min. efter belysningens start. De gennemsigtige æg er ikke-klæbende og kan let tælles med tværgående lys. Når der bruges fem hunner pr. beholder, kan et antal æg på op til 20 om dagen betragtes som lavt, op til 100 som middel og over 100 som højt. Gydningsbakken fjernes, æggene indsamles, og gydningssbakken anbringes i testbeholderen igen, enten så sent som muligt om aftenen eller meget tidligt om morgenen. Bakken skal anbringes senest efter en time, da gydningssubstratet ellers kan forårsage individuel parring og gydning på et usædvanligt tidspunkt. Hvis situationen kræver, at gydningssbakken anbringes senere, skal det ske mindst ni timer efter belysningens start. På dette sene tidspunkt på dagen induceres gydning ikke længere.

Tillæg 4B

Gydningssubstrat til tykhovedet elritse

To eller tre kombinerede gydningsfliser og bakker af plast/keramik/glas eller rustfrit stål anbringes i hvert testkammer (f.eks. 80 mm lang grå halvcirkelformet rende på en 130 mm lang bakke med kanter) (se billede). Korrekt tørrede PVC-fliser eller keramikfliser har vist sig at være egnede til at modtage et gydningssubstrat (Thorpe et al., 2007).

Det anbefales, at fliserne slibes for at fremme adhæsion. Bakken bør desuden afskærmes for at hindre fiskenes adgang til de nedfaldne æg, medmindre det har vist sig, at æg klæber til det anvendte gydningssubstrat.



Bunden er udformet, så den indeholder eventuelle æg, der ikke klæber til flisens overflade og derfor falder ned i bunden af beholderen (eller de æg, der lægges direkte på den flade plastbund). Alt gydningssubstrat bør udvaskes i mindst 12 timer i fortyndingsvand inden brug.

LITTERATUR

K. L. Thorpe, R. Benstead, T. H. Hutchinson og C. R. Tyler (2007), An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Aquatic Toxicology*, 81, 90-98.

Tillæg 5A

Vurdering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse med henblik på påvisning af visse hormonforstyrrende kemikalier**Oversigt**

Potentielt vigtige udseenderelaterede karakteristika hos voksne fisk af arten tykhovedet elritse i test til påvisning af hormonforstyrrende stoffer omfatter kropsfarve (lys/mørk), farvemønstre (tilstedeværelse eller fravær af lodrette bånd), kropsform (hoved- og brystområde, udvidet abdomen) og specifikke sekundære kønskarakteristika (antal og størrelse af legevorter, størrelse af nakkefremspring og æglægningsorgan).

Legevorter befinder sig på hovedet (nakkefremspringet) hos formeringsaktive tykhovedet elritse-hanner og er sædvanligvis arrangeret i et bilateralt symmetrisk mønster (Jensen et al., 2001). Hunner og afkom af hankøn og hunkøn i kontrollerne udvikler ikke vorter (Jensen et al., 2001). Der kan være op til otte individuelle vorter omkring hannernes øjne og mellem næseborene. Det største antal og de største vorter befinder sig i to parallelle linjer umiddelbart under næseborene og omkring munden. Hos mange fisk er der grupper af vorter under underkæben; dem, der er tættest på munden, forekommer som regel som et enkelt par, mens sættet tættere på bugen kan bestå af op til fire vorter. Det faktiske antal vorter er sjældent højere end 30 (interval: 18-28; Jensen et al., 2001). De fremherskende vorter (for så vidt angår antal) er til stede som en enkelt, relativt rund struktur med en højde omtrent svarende til radius. De fleste formeringsaktive hanner har også, i det mindste nogle, vorter, som er så forstørrede og fremtrædende, at de ikke kan skelnes som individuelle strukturer.

Visse typer hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage abnormal forekomst af visse sekundære kønskarakteristika hos det modsatte køn; androgenreceptoragonister, såsom methyldtestosteron-17 β eller trenbolon-17 β , kan f.eks. få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle legevorter (Smith, 1974; Ankley et al., 2001; 2003), mens østrogenreceptoragonister kan mindske antallet eller størrelsen af legevorter hos hanner (Miles-Richardson et al., 1999; Harries et al., 2000).

Nedenfor beskrives karakteriseringen af legevorter hos tykhovedet elritse baseret på fremgangsmåder brugt i U.S. Environmental Protection Agencys laboratorium i Duluth, MN. Specifikke produkter og/eller specifikt udstyr kan erstattes med tilgængelige sammenlignelige alternativer.

Observation opnås bedst med et forstørrelsesglas med lys eller et 3X-dissektionsmikroskop med lys. Observer fisken fra ryggen og med forenden fremad (hoved mod objektiv).

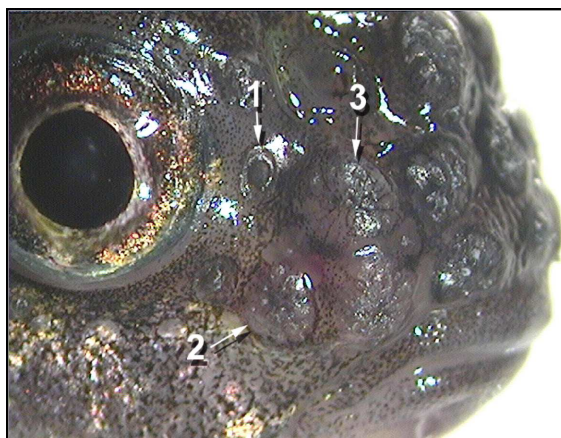
- Anbring fisken i en lille petriskål (f.eks. 100 mm i diameter) med forenden fremad og bugen nedad. Fokuser med søgeren for at identificere vorterne. Rul forsigtigt og langsomt fisken fra side til side for at identificere områder med vorter. Tæl og vurder vorterne.
- Gentag observationen for den ventrale overflade af hovedet ved at anbringe fisken på ryggen med forenden fremad i petriskålen.
- Observationer skal være afsluttet inden for to minutter pr. fisk.

Tælling og vurdering af vorter

Der er identificeret seks områder for vurdering af tilstedeværelsen og udviklingen af vorter hos voksen tykhovedet elritse. Der er udviklet en model for kortlægning af placering af og antal vorter (se sidst i dette tillæg). Antallet af vorter registreres, og deres størrelse kan kvantitativt vurderes som følger: 0 — fraværende, 1 — tilstedeværende, 2 — forstørret og 3 — udtalt for hver organisme (figur 1).

Score 0 — fravær af vorter. Score 1 — tilstedeværelse af vorter; identificeres som vorter med et enkelt punkt, hvis højde stort set svarer til dets radius (diameter). Score 2 — forstørret vorte; identificeres som væv, der ligner en asterisk, normalt med en stor radial base med fordybninger ud fra midten. Vorten er ofte mere forrevet, men kan undertiden være en smule afrundet. Score 3 — udtalt vorte; er normalt ret stor og afrundet med mindre defineret struktur. Vorterne løber nogle gange sammen og danner en enkelt masse i et område eller en kombination af områder (B, C og D, beskrevet nedenfor). Farve og mønster ligner score 2, men kan være forholdsvis vilkårligt. Med dette vurderingssystem opnås normalt en samlet score for vorter på < 50 hos en normal han i kontroller med 18-20 vorter (Jensen et al., 2001).

Figur 1



Det faktiske antal vorter kan hos nogle fisk være større end antallet af kasser i modellen (tillæg A) for et givet vurderingsområde. Yderligere vurderingstal kan i givet fald markeres i, til højre for eller til venstre for kassen. Modellen skal således ikke nødvendigvis være symmetrisk. En anden teknik til kortlægning af vorter, som er parret eller hænger sammen lodret langs mundens vandrette plan, er dobbeltmarkering af to vortevurderingspunkter i en enkelt kasse.

Kortlægningsområder:

A — Vorter omkring øjnene. Kortlagt fra ryg mod bug omkring øjnenes forkant. Almindeligvis flere hos modne hanner i kontroller, ikke til stede hos hunner i kontroller, generelt parret (en ved hvert øje) eller enkeltvis hos hunner, der eksponeres for androgener.

B — Vorter mellem næsebor (porer, sensorisk kanal). Normalt i par hos hanner i kontroller ved højere udviklingsniveauer (2 — forstørret eller 3 — udtalt). Ikke til stede hos hunner i kontroller med en vis forekomst og udvikling hos hunner, der eksponeres for androgener.

C — Vorter umiddelbart foran næseborene, parallelt med munden. Generelt forstørrede eller udtalte hos hanner i kontroller. Til stede eller forstørrede hos mindre udviklede hanner eller androgenbehandlede hunner.

D — Vorter parallelt langs mundlinjen. Vurderes generelt som udviklede hos hanner i kontroller. Fraværende hos hunner i kontroller, men til stede hos hunner, der eksponeres for androgener.

E — Vorter på underkæben, tæt på munden, normalt små og sædvanligvis i par. Varierende hos hanner i kontroller eller behandlede hanner og hos behandlede hunner.

F — Vorter ventralt i forhold til E, normalt små og i par. Tilstedeværende hos hanner i kontroller og hos hunner, der eksponeres for androgener.

LITTERATUR

- (1) G. T. Ankley, K. M. Jensen, M. D. Kahl, J. J. Korte og M. E. Makynen (2001), Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl, J. J. Korte, M. W. Hornung, T. R. Henry, J. S. Denny, R. L. Leino, V. S. Wilson, M. C. Cardon, P. C. Hartig og E. L. Gray (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow, *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) J. E. Harries, T. Runnalls, E. Hill, C. A. Harris, S. Maddix, J. P. Sumpter og C. R. Tyler (2000), Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) K. M. Jensen, J. J. Korte, M. D. Kahl, M. S. Pasha og G. T. Ankley (2001), Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) M. D. Kahl, K. M. Jensen, J. J. Korte og G. T. Ankley (2001), Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow, *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) S. R. Miles-Richardson, V. J. Kramer, S. D. Fitzgerald, J. A. Render, B. Yamini, S. J. Barbee og J. P. Giesy (1999), Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) R. J. F. Smith (1974), Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Can J Zool* 52:1031-1038.

Vortemodel

ID _____

Dato _____

Score i alt _____

Numerisk score

1 — tilstedeværende

2 — forstørret

3 — udtalt

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

Tillæg 5b

Vurdering af sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk med henblik på påvisning af visse hormonforstyrrende kemikalier

Nedenfor findes en beskrivelse af målingen af papillære strukturer (*), som er de sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk (*Oryzias latipes*).

(*) Papillære strukturer ses normalt kun hos voksne hanner og observeres på finnestråler fra den anden til den syvende eller ottende talt fra den bageste ende af gatfinnen (figur 1 og 2). Strukturerne forekommer dog sjældent på den første finnestråle fra den bageste ende af gatfinnen. Denne standardprocedure omfatter måling af strukturer på den første finnestråle (i denne standardprocedure henviser finnestrålenummeret til rækkefølgen fra den bageste ende af gatfinnen).

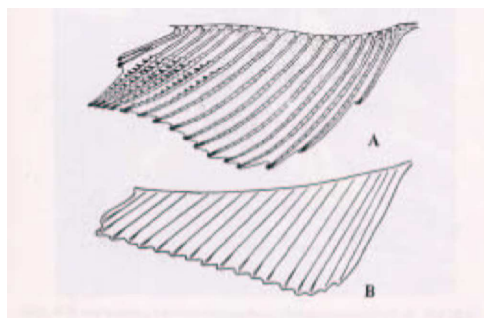
- 1) Efter udskæring af leveren (tillæg 6) anbringes kadaveret i et konisk rør, som indeholder ca. 10 ml 10 % neutralt bufret formalin (opad: hoved, nedad: hale). Hvis kønskirtlen er fikseret i andet end 10 % neutralt bufret formalin, foretages et tværsnit på tværs af kadaveret mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel, idet det omhyggeligt undgås at skade kønsåbningen og selve kønskirtlen (figur 3). Anbring kraniesiden af fiskekroppen i fikseringsopløsningen for at præservere kønskirtlen og halesiden af fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin som beskrevet ovenfor.
- 2) Når fiskekroppen er anbragt i 10 % neutralt bufret formalin, gribes den forreste del af gatfinnen med en pincet og holdes bøjet i omkring 30 sekunder for at holde gatfinnen åben. Når gatfinnen gribes med pincetten, tager man forsigtigt fat i nogle få finnestråler i den forreste del for ikke at ridse de papillære strukturer.
- 3) Når gatfinnen har været holdt åben i omkring 30 sekunder, opbevares fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin ved stuetemperatur indtil måling af de papillære strukturer (måling bør foretages efter fiksering i mindst 24 timer).

Måling

- 1) Når fiskekroppen har været fikseret i 10 % neutralt bufret formalin i mindst 24 timer, opsamles fiskekadaveret fra det koniske rør, og formalinet tørres af med filterpapir (eller en papirserviet).
- 2) Anbring fisken med abdomen opad. Afskær derefter forsigtigt gatfinnen med en lille dissektionssaks (det foretrækkes, at en smule pterygiophor afskæres sammen med gatfinnen).
- 3) Grib den forreste del af den afskårne gatfinne med en pincet, og anbring den på en glasplade med flere dråber vand. Dæk derefter gatfinnen med et dækglas. Det er vigtigt ikke at ridse de papillære strukturer, når man griber gatfinnen med pincetten.
- 4) Tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer ved hjælp af tælleren i et biologisk mikroskop (opretstående mikroskop eller omvendt mikroskop). De papillære strukturer genkendes, når en lille formation af strukturer er synlig på bagkanten af ledskiven. Registrer antallet af ledskiver med papillære strukturer i hver finnestråle på arbejdsarket (f.eks. første finnestråle: 0, anden finnestråle: 10, tredje finnestråle: 12 osv.), og indtast summen i Excel-arket for hver fisk. Tag om nødvendigt et billede af gatfinnen, og tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer på billedet.
- 5) Efter målingen anbringes gatfinnen i det koniske rør, der er beskrevet i (1), og opbevares.

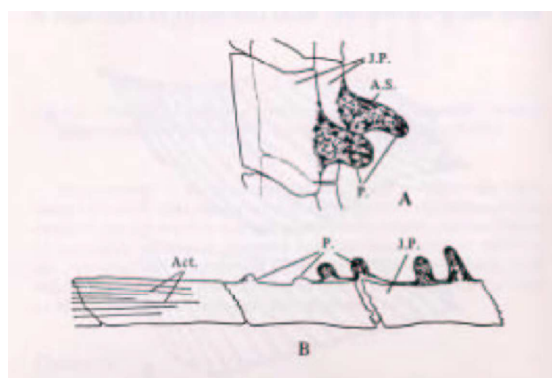
Figur 1.

Diagram, der viser kønsforskelle i gatfinnens form og størrelse. A, han; B, hun. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish, J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



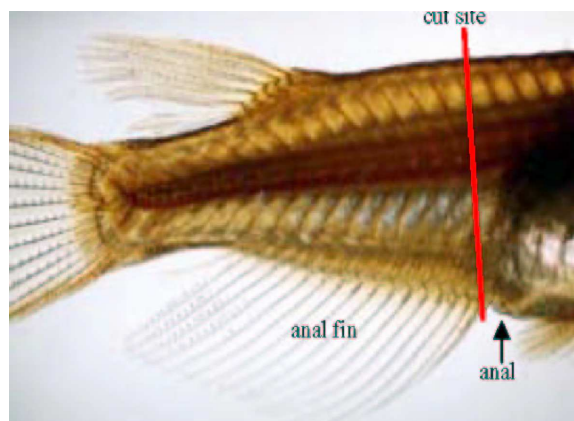
Figur 2.

A — Strukturer på gatfinnes ledskiver. J.P. (joint plate): ledskive; A.S. (axial space): aksial afstand; P. (process): struktur. B — Finnestråles distale ekstremet. Actinotrichia (Act.) er på spidsen. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish, J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Figur 3.

Billede af fiskekrop, der viser det sted, hvor der skal skæres, når kønskirtlen er fikseret i en anden fikseringsopløsning end 10 % neutralt bufret formalin. I givet fald afskæres den resterende del af kroppen mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel (rød streg). Hovedsiden af fiskens krop anbringes i fikseringsopløsningen til kønskirtlen, og halesiden af fiskekroppen anbringes i 10 % neutralt bufret formalin.



Tillæg 6

Anbefalede procedurer for prøveudtagning til vitellogeninanalyse

Det sikres, at der ikke forekommer krydskontamination mellem VTG-prøver fra hanner og hunner.

Fremgangsmåde 1A: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Efter bedøvelse afskæres haleroden delvist med en skalpel, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Når blodet er indsamlet, isoleres plasma hurtigt ved centrifugering i 3 minutter ved 15 000 g (eller alternativt i 10 minutter ved 15 000 g ved 4 °C). Om ønsket kan hæmatokritprocenten bestemmes efter centrifugering. Plasmadelen fjernes derefter fra mikrohæmatokritrøret og opbevares i et centrifugeglas med 0,13 enheder aprotinin (en proteaseinhibitor) ved – 80 °C, indtil vitellogenin kan bestemmes. Afhængigt af størrelsen af den tykhovedede elritse (som er kønsbestemt) kan der generelt indsamles et plasmavolumen på 5-60 mikroliter pr. fisk (Jensen et al., 2001).

Fremgangsmåde 1B: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra hjertet

Alternativt kan blod indsamles ved hjertepunktur med en hepariniseret kanyler (1 000 enheder heparin pr. ml). Blodet overføres til Eppendorf-rør (holdt på is) og centrifugeres (5 min., 7 000 g, stuetemperatur). Plasmaet overføres til rene Eppendorf-rør (i alikvoter, hvis plasmavolumenet tillader det) og nedfryses omgående ved – 80 °C, indtil det skal analyseres (Panter et al., 1998).

Fremgangsmåde 2A: Japansk risfisk, udskæring af leveren hos japansk risfisk

Fjernelse af testfisken fra testkammeret

- (1) Testfisk fjernes fra testkammeret med et lille fiskenet. Undgå at tabe testfisken ned i andre testkamre.
- (2) Testfisk skal principielt fjernes i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol. Derudover bør alle hanner fjernes fra et testkammer, før de resterende hunner fjernes.
- (3) Hver testfisks køn identificeres ud fra ydre sekundære kønskarakteristika (f.eks. gatfinnens form).
- (4) Anbring testfisken i en transportbeholder, og bær den til arbejdsstationen med henblik på udskæring af leveren. Kontroller, at etiketterne på testkammeret og transportbeholderen er korrekte, og at antallet af fisk, der er blevet fjernet fra testkammeret, og antallet af fisk, som er tilbage i testkammeret, er som forventet.
- (5) Hvis kønnet ikke kan identificeres ud fra fiskens ydre udseende, fjernes alle fisk fra testkammeret. I givet fald identificeres kønnet ved observation af kønskirtlen eller sekundære kønskarakteristika under stereoskopisk mikroskop.

Udskæring af leveren

- (1) Overfør testfisken fra transportbeholderen til opløsningen med anæstetikum ved hjælp af det lille fiskenet.
- (2) Når testfisken er bedøvet, overføres den til filterpapir (eller en papirserviet) med en almindelig pincet. Når testfisken gribes, bruges pincetten til at tage fat på hver side af hovedet, så halen ikke går i stykker.
- (3) Tør vandet af testfiskens overflade med filterpapiret (eller papirservietten).
- (4) Anbring fisken med abdomen opad. Foretag derefter et lille tværsnit halvvejs mellem den ventrale nakkeregion og den midterste del af bugen med en dissektionssaks.

- (5) Indfør dissektionssaksen i det lille snit, og foretag et snit i abdomen fra et punkt bag gælleklappen til den forreste del af anus langs abdomens midterlinje. Dissektionssaksen må ikke føres for dybt ind, da man risikerer at skade leveren og kønskirtlen.
- (6) Foretag følgende operationer under et stereoskopisk mikroskop.
- (7) Anbring testfisken med abdomen opad på papirservietten (petriskål af glas eller objektglas er også en mulighed).
- (8) Udvid bughulens vægge med en præcisionspincet, og blotlæg de indre organer. Det er også acceptabelt om nødvendigt at blotlægge de indre organer ved at fjerne den ene side af bughulevæggen.
- (9) Blotlæg den forbundne del af leveren og galdeblæren med en anden præcisionspincet. Grib galdegangen, og afskær galdeblæren. Sørg for ikke at ødelægge galdeblæren.
- (10) Grib spiserøret, og afskær mave-tarm-kanalen fra leveren på samme måde. Sørg for, at indholdet i mave-tarm-kanalen ikke flyder ud. Afskær den bageste del af mave-tarm-kanalen fra anus, og fjern kanalen fra bughulen.
- (11) Fjern fedtmassen og andet væv fra leverens periferi. Sørg for ikke at ridse leveren.
- (12) Grib området ved den hepatiske portal med en præcisionspincet, og fjern leveren fra bughulen.
- (13) Anbring leveren på objektglasset. Eventuelt yderligere fedt og udefrakommende væv (f.eks. laget omkring bugen) fjernes fra leverens overflade.
- (14) Mål leverens vægt med et 1,5 ml mikrorør som tara med en elektronisk analysevægt. Registrer værdien på arbejdsarket (aflæsning: 0,1 mg). Bekræft identifikationsinformationen på mikrorørets etiket.
- (15) Luk låget på det mikrorør, der indeholder leveren. Opbevar det på et kølestativ (eller isstativ).
- (16) Efter udskæringen af en lever rengøres dissektionsinstrumenterne eller erstattes med rene instrumenter.
- (17) Fjern leverne fra alle fiskene i transportbeholderen som beskrevet ovenfor.
- (18) Når leverne er skåret ud af alle fisk i transportbeholderen (dvs. alle hanner eller hunner i et testkammer), anbringes alle leverprøver i et reagensglasstativ med en identifikationsetiket og opbevares i en fryser. Når leverne gives til forbehandling kort efter udskæringen, bæres prøverne til den næste arbejdsstation på et kølestativ (eller isstativ).

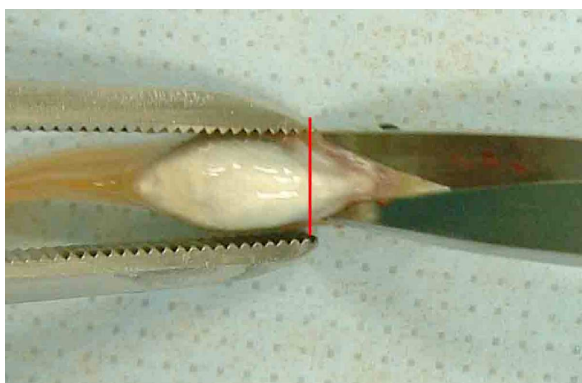
Efter udskæring af leveren kan fiskekadaveret anvendes til måling af sekundære kønskarakteristika.

Prøve

Opbevar leverprøver udtaget fra testfisken ved ≤ -70 °C, hvis de ikke bruges til forbehandling kort efter udskæringen.

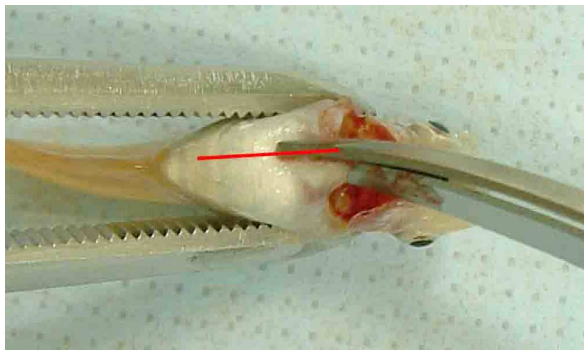
Figur 1

Der foretages et snit lige foran brystfinnerne med en saks.



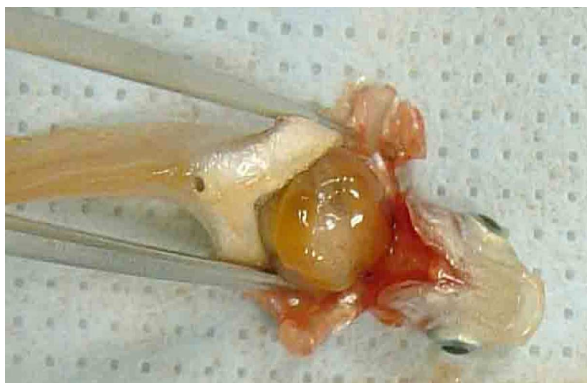
Figur 2

Der foretages et snit langs midterlinjen af abdomen til et punkt ca. 2 mm foran anus.



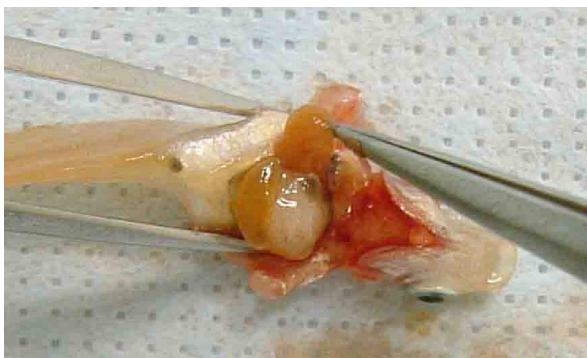
Figur 3

Bugvæggene spredes med pincet for at blottlægge leveren og andre indre organer. (Alternativt hæftes bugvæggene op lateralt).



Figur 4

Leveren dissekeres stumpt og udtages med pincet.



Figur 5

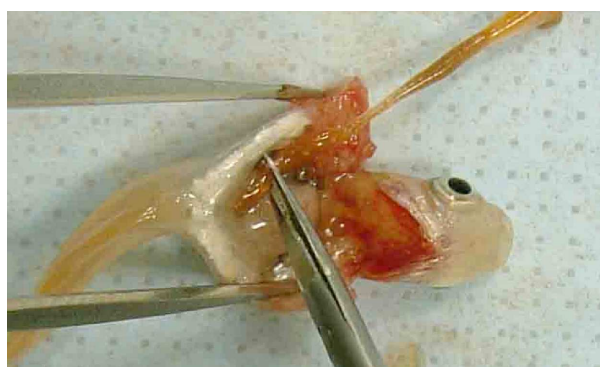
Indvoldene tages forsigtigt ud med pincet.

*Figur 6*

Begge ender af indvoldene og eventuelle tilknyttede mesenteriske strukturer afskæres med saks.

*Figur 7 (hun)*

Proceduren er identisk for hundyr.



Figur 8

Den afsluttede procedure.**Fremgangsmåde 2B: Japansk risfisk (*Oryzias latipes*), forbehandling af lever med henblik på vitellogeninanalyse**

Tag kolben med homogenatbuffer fra ELISA-kittet, og afkøl den med knust is (opløsningens temperatur: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Hvis der bruges homogenatbuffer fra EnBio ELISA-systemet, optøs opløsningen ved stuetemperatur, og kolben afkøles med knust is.

Beregn volumen af homogenatbuffer til leveren på grundlag af dens vægt (tilsæt 50 μl homogenatbuffer pr. mg lever for homogenat). Hvis leveren f.eks. vejer 4,5 mg, skal der bruges 225 μl homogenatbuffer til leveren. Udarbejd en liste over homogenatbuffervolumen for alle lever.

Klargøring af leveren til forbehandling

- (1) Tag 1,5 ml-mikrorøret, der indeholder leveren, ud af fryseren umiddelbart inden forbehandlingen.
- (2) Forbehandling af leveren fra hanner bør foretages før forbehandlingen af leveren fra hunner for at forhindre vitellogeninkontaminering. Forbehandlingen til testgrupperne bør desuden foregå i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelsoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol.
- (3) Antallet af 1,5 ml-mikrorør, som indeholder leverprøver taget fra fryseren, må på et givet tidspunkt ikke overstige det antal, der kan centrifugeres på det pågældende tidspunkt.
- (4) Arranger 1,5 ml-mikrorørene med leverprøverne i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet (det er ikke nødvendigt at optø leveren).

Udførelse af forbehandlingen**1. Tilsætning af homogeniseringsbufferen**

- (1) Se på listen, hvilket homogenatbuffervolumen der skal bruges til en specifik leverprøve, og juster mikropipetten (volumeninterval: 100-1 000 μl) til det rette volumen. Sæt en ren spids på mikropipetten.
- (2) Tag homogenatbufferen fra reagensglasset, og tilsæt bufferen til 1,5 ml-mikrorøret med leveren.
- (3) Tilsæt homogenatbuffer til alle 1,5 ml-mikrorør med lever i henhold til ovennævnte procedure. Det er ikke nødvendigt at sætte en ny spids på mikropipetten. Hvis spidsen er kontamineret eller mistænkes for at være det, skal den dog udskiftes.

2. Homogenisering af leveren

- (1) Sæt en ny støder på homogenisatoren med henblik på homogenisering.
- (2) Indfør støderen i 1,5 ml-mikrorøret. Hold homogenisatoren, således at leveren presses mellem støderens overflade og mikrorørets indervæg.
- (3) Kør homogenisatoren i 10-20 sekunder. Afkøl mikrorøret med knust is under operationen.
- (4) Løft støderen op af mikrorøret, og hold den stille i omkring ti sekunder. Undersøg derefter suspensionens tilstand visuelt.
- (5) Hvis stykker af lever observeres i suspensionen, gentages trin (3) og (4) for at fremstille et tilfredsstillende leverhomogenat.
- (6) Afkøl det opslæmmede leverhomogenat på isstativet indtil centrifugering.
- (7) Udskift støderen for hvert homogenat.
- (8) Homogeniser alle levere med homogenatbuffer i henhold til ovennævnte procedure.

3. Centrifugering af det opslæmmede leverhomogenat

- (1) Kontroller, at temperaturen i det afkølede centrifugekammer er på $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- (2) Indsæt 1,5 ml-mikrorørene med det opslæmmede leverhomogenat i den afkølede centrifuge (juster om nødvendigt balancen).
- (3) Centrifuger det opslæmmede leverhomogenat ved 13 000 g i 10 min. ved $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Hvis supernatanterne er tilstrækkeligt separeret, kan centrifugalkraften og tiden dog justeres efter behov.
- (4) Efter centrifugeringen kontrolleres det, at supernatanterne er tilstrækkeligt separeret (overflade: fedtstoffer, mellemlag: supernatant, nederste lag: levervæv). Hvis separationen ikke er tilstrækkelig, centrifugeres suspensionen igen under samme betingelser.
- (5) Fjern alle prøver fra den afkølede centrifuge, og arranger dem i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet. Sørg for ikke at resuspendere de enkelte separerede lag efter centrifugeringen.

4. Indsamling af supernatanten

- (1) Anbring fire 0,5 ml-mikrorør til opbevaring af supernatanten i reagensglasstativet.
- (2) Indsaml 30 μl af hver supernatant (separeret som det mellemliggende lag) med mikropipetten, og fyld det i et 0,5 ml-mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.
- (3) Indsaml supernatanten, og fyld den i to andre 0,5 ml-mikrorør på samme måde som beskrevet ovenfor.
- (4) Indsaml resten af supernatanten med mikropipetten (om muligt: $\geq 100 \mu\text{l}$). Fyld derefter supernatanten i det sidste mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.
- (5) Luk mikrorørets låg, og angiv supernatantens volumen på etiketten. Afkøl derefter straks mikrorørene på isstativet.
- (6) Sæt en ny spids på mikropipetten for hver supernatant. Hvis en stor mængde fedtstoffer sætter sig fast i spidsen, skal den straks udskiftes, for at forhindre at leverekstraktet kontamineres med fedtstoffet.

- (7) Fordel hele den centrifugerede supernatant i fire 0,5 ml-mikrorør i henhold til ovennævnte procedure.
- (8) Når supernatanten er fordelt i mikrorørene, anbringes de alle i reagensglasstativet med identifikationsetiketten og nedfryses straks. Hvis VTG-koncentrationerne måles umiddelbart efter forbehandlingen, holdes et af mikrorørene (som indeholder 30 µl supernatant) afkølet i reagensglasstativet og overføres til den arbejdsstation, hvor ELISA-assayet udføres. I givet fald anbringes de resterende mikrorør i reagensglasstativerne og fryses i fryseren.
- (9) Når supernatanten er indsamlet, kasseres remanensen med det samme.

Opbevaring af prøven

Opbevar mikrorørene med supernatanten fra leverhomogenatet ved $\leq -70^{\circ}\text{C}$, indtil de skal bruges til ELISA-assayet.

Fremgangsmåde 3A: Zebrafisk, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Umiddelbart efter bedøvelse afskæres haleroden på tværs, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Blodvolumenerne er 5-15 µl afhængigt af fiskens størrelse. Et tilsvarende volumen aprotininbuffer (6 µg/ml i PBS) tilsættes til mikrokapillærrøret, og plasma separeres fra blodet ved centrifugering (fem minutter ved 600 g). Plasma indsamles i testrørene og opbevares ved -20°C , indtil de skal analyseres for vitellogenin eller andre proteiner af interesse.

Fremgangsmåde 3B: Zebrafisk, indsamling af blod ved hjertepunktur

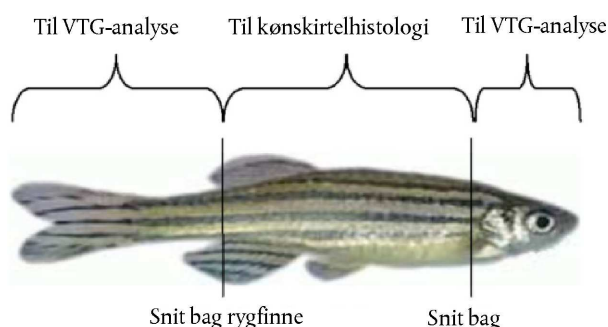
For at undgå koagulering af blod og nedbrydning af protein indsamles prøverne i fosfatbufret saltvand (PBS), som indeholder heparin (1 000 enheder/ml) og proteaseinhibitoren aprotinin (2 TIU/ml). Det anbefales at bruge ammonium-heparinsalt og lyofiliseret aprotinin som bestanddele i bufferen. Det anbefales at bruge en kanylen (1 ml) med en fast tynd nål (f.eks. Braun Omnikan-F) til blodprøveudtagning. Kanylen bør på forhånd være påfyldt buffer (ca. 100 µl) for helt at eluere de små volumener blod fra hver fisk. Blodprøverne udtages ved hjertepunktur. Først bedøves fisken med MS-222 (100 mg/l). Ved det rette anæstesi-niveau kan brugeren identificere zebrafiskens hjerteslag. Under hjertepunktur holdes kanylens stempel under svagt tryk. Der kan indsamles 20-40 mikroliter blod. Efter hjertepunktur fyldes blod/buffer-blandingen i reagensglasset. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering (20 min.; 5 000 g) og opbevares ved -80°C , indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde 3C: Standardprocedure: Zebrafisk, homogenisering af hoved og hale

- (1) Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.
- (2) Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med figur 1.

Bemærk: Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »vitellogeninforurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikke-inducerede hanner.

Figur 1



- (3) Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.
- (4) Når delene er vejede, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og nedfryses ved -80°C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is og resulterer i en homogen masse). Bemærk: Rørene nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropssektion, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.
- (5) Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold homogeniseringsbuffer (*) på 4 gange vævsvægten. Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. Vigtigt: Der bruges nye pistiller til hver fisk.
- (6) Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved 4°C ved $50\,000 \times g$ i 30 min.
- (7) Anvend en pipette til at fordele portioner a 20 μl supernatant i mindst to rør ved at dyppe spidsen af pipetten ned under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.
- (8) Rørene opbevares ved -80°C indtil brug.

(*) **Homogeniseringsbuffer:**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma)): 12 mM Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl proteaseinhibitorblanding.
 - TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), f.eks. fra Bie & Berntsen, Danmark.
 - Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv), produktnummer P 8340.
 - Bemærk: Homogeniseringsbufferen skal anvendes samme dag, som den er fremstillet. Anbringes på is under brug.
-

Tillæg 7

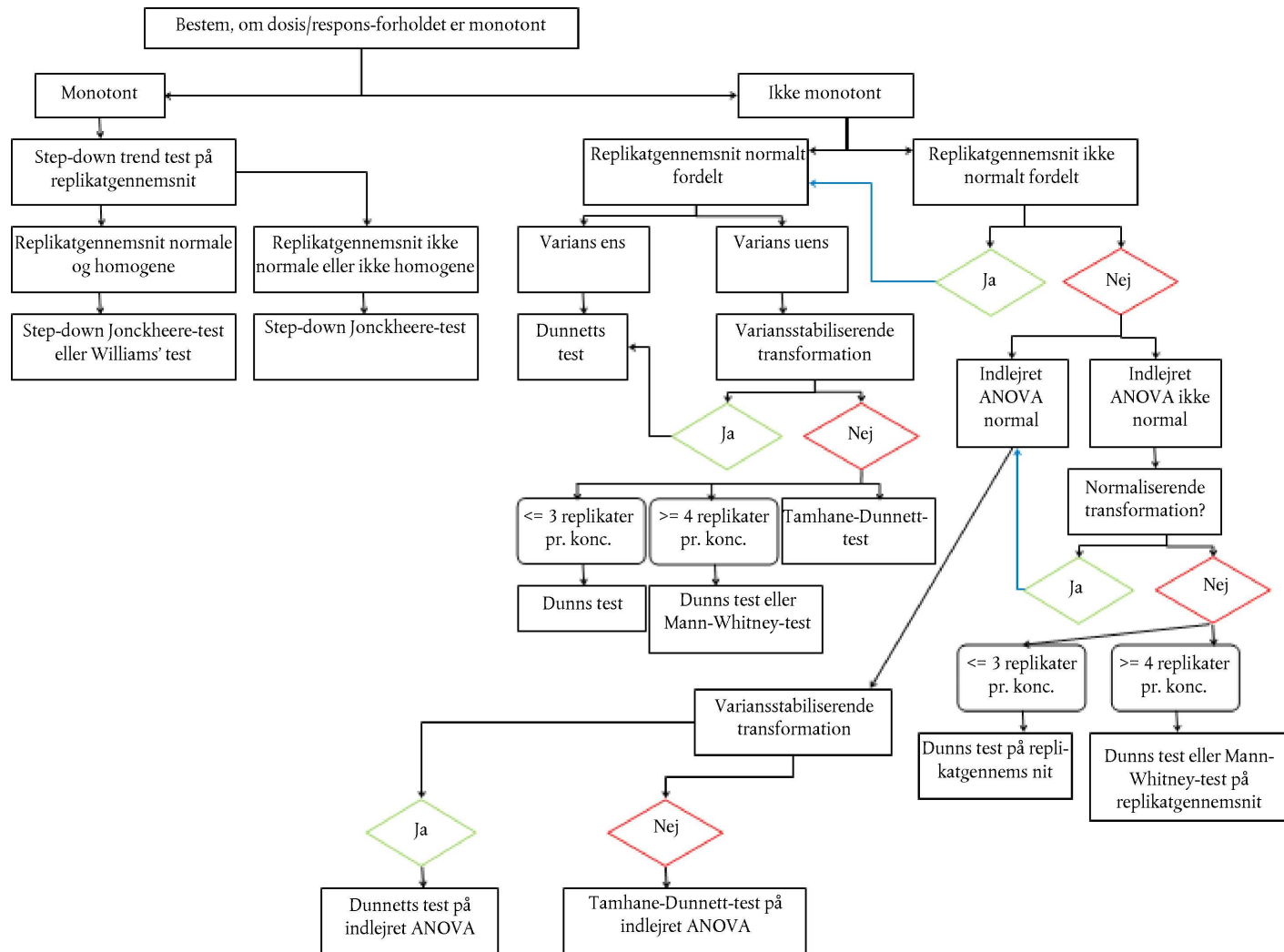
Vitellogeninspikede prøver og referencestandard for assayet

På hver dag, hvor der gennemføres vitellogeninassay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet. Det vitellogenin, der bruges til at fremstille referencestandarden for assayet, vil være fra et andet parti end det, der bruges til at fremstille kalibreringsstandarde for det udførte assay.

Den spikede prøve fremstilles ved at tilsætte en kendt mængde af standarden for assayet til en prøve af plasma fra hanner i kontrollerne. Prøven spikes til en vitellogeninkoncentration på 10-100 gange den forventede vitellogeninkoncentration for hanner i kontrollerne. Den spikede prøve af plasma fra hanner i kontrollerne kan være fra en enkelt fisk eller en kombination af flere fisk.

En underprøve af ikke-spiket plasma fra hanner i kontrollerne analyseres i mindst to brønde. Den spikede prøve analyseres også i mindst to brønde. Den gennemsnitlige mængde vitellogenin i de to ikke-spikede prøver af plasma fra hanner i kontrollerne lægges til den beregnede mængde vitellogenin, der tilsættes til prøverne for at bestemme en forventet koncentration. Forholdet mellem denne forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert sæt assay gennemført på den pågældende dag.

Beslutningsflowdiagram til statistisk analyse



C.38. AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 231 (2009). Behovet for at udvikle og validere et assay, der kan opspore kemikalier, som er aktive i hvirveldyrarters skjoldbruskkirtelsystem, udspringer af bekymringer for, at kemikaliekoncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet, der havde til formål at revidere de eksisterende TG'er og udvikle nye TG'er for screening og test af potentielle hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en TG for screening af kemikalier, som påvirker hvirvelløse dyrearters skjoldbruskkirtelsystem. Der er stillet forslag om såvel en styrkelse af testen for toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere (kapitel B.7 i dette bilag) som en metamorfoseundersøgelse hos amfibier, Amphibian Metamorphosis Assay (AMA). Den forbedrede metode B.7 gennemgik validering, og der er forelagt en revideret testmetode. Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser inden for og mellem laboratorier, og hvor assayets relevans og pålidelighed blev påvist (1, 2). Efterfølgende foretog et panel af uafhængige eksperter et peer-review af valideringen af assayet (3). Testmetoden er resultatet af erfaringerne fra valideringsundersøgelserne med henblik på påvisning af thyreoideaaktive kemikalier og af arbejde udført andre steder i OECD-medlemslandene.

PRINCIP FOR TESTEN

2. Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) er et screeningassay, som har til formål at foretage en empirisk afdækning af kemikalier, der kan forstyrre hypothalamus-hypofyse-thyreoideaaksens normale funktion (HPT-aksen). AMA er en generel model for hvirveldyr, i det omfang det er baseret på HPT-aksens bevarede strukturer og funktioner. Det er et vigtigt assay, fordi padders metamorfose viser en velundersøgt thyreoideaafhængig proces, der reagerer på kemikalier, som påvirker HPT-aksen, og det er det eneste eksisterende assay, der påviser aktivitet i skjoldbruskkirtlen hos et dyr under morfologisk udvikling.
3. Det generelle forsøgsdesign betyder, at 51 *Xenopus laevis*-haletudser eksponeres for minimum tre forskellige koncentrationer af et testkemikalie og en fortyndingsvandkontrol i 21 dage. Der foretages fire replikater af hver testbehandling. Larvetætheden ved testens start er 20 haletudser pr. testbeholder for alle behandlingsgrupper. De observationsmæssige endepunkter er baglemlængde, længde fra snude til gat, udviklingstrin, vådvægt, histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen og daglige observationer af dødelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN**Testarter**

4. *Xenopus laevis* dyrkes rutinemæssigt i laboratorier over hele verden og kan let fås fra kommercielle leverandører. Reproduktion kan let induceres hos denne art hele året ved hjælp af injektioner med humant choriogonadotropin (hCG), og de deraf følgende larver kan rutinemæssigt opdrættes i et stort antal til valgte udviklingsstadier, så det er muligt at bruge stadiespecifikke testprotokoller. Larver, der benyttes i assayet, skal helst komme fra internt opdrættede voksne individer. Med henblik på akklimatisering kan æg eller embryoner alternativt sendes til det laboratorium, der udfører testen, selv om dette ikke er den foretrukne fremgangsmåde. Forsendelsen af larver til brug i testen accepteres ikke.

Udstyr og diverse artikler

5. Følgende udstyr og artikler er nødvendige til udførelsen af dette assay:
 - a) eksponeringssystem (se beskrivelse nedenfor)
 - b) akvarier af glas eller rustfrit stål (se beskrivelse nedenfor)
 - c) ynglebeholdere
 - d) temperaturkontrolapparater (f.eks. varme- eller køleanordninger (justerbar til $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$))

- e) termometer
- f) binokulært dissektionsmikroskop
- g) digitalkamera med en opløsning på mindst 4 megapixel og mikrofunktion
- h) billeddigitaliseringssoftware
- i) petriskål (f.eks. 100 × 15 mm) eller gennemsigtigt plastkammer af tilsvarende størrelse
- j) analysevægt til måling med tre decimaler (mg)
- k) apparat til måling af opløst ilt
- l) pH-meter
- m) lysintensitetsmåler til måling i lux-enheder
- n) diverse glasudstyr og værktøjer til laboratoriebrug
- o) justerbare pipetter (10-5 000 µl) eller blandede pipetter af tilsvarende størrelser
- p) testkemikalie i tilstrækkelige mængder til at foretage undersøgelsen, helst fra en batch
- q) analyseinstrumenter, der er egnede til det testede kemikalie, eller kontraktlige analysetjenester.

Kemisk testbarhed

6. AMA er baseret på en vandig eksponeringsprotokol, hvorved testkemikaliet indføres i testkamrene via et gennemstrømningssystem. Gennemstrømningsmetoder medfører imidlertid begrænsninger af, hvilke typer kemikalier der kan testes, hvilket bestemmes af kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. Før denne protokol benyttes, bør der derfor indhentes relevante basisoplysninger om kemikaliet for at afgøre testbarheden, og OECD's Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (4) bør konsulteres. Kendetegn, der viser, at det kan være vanskeligt at teste kemikaliet i vandige systemer, omfatter: høje octanol/vandfordelingskoefficienter ($\log K_{ow}$), høj flygtighed, hydrolysefølsomhed og fotolysefølsomhed under omgivelseslysforhold i laboratoriet. Andre faktorer kan også være relevante for at fastslå testbarheden og bør bestemmes i hvert enkelt tilfælde. Hvis det ikke er muligt at foretage en vellykket test for kemikaliet ved hjælp af et gennemstrømningstestsystem, kan der benyttes et system med statisk udskiftning. Hvis ingen af systemerne egner sig til testkemikaliet, testes der som standard ikke ved hjælp af denne protokol.

Eksponeringssystem

7. Når det er muligt, foretrækkes et gennemstrømningsfortyndersystem frem for et system med statisk udskiftning. Hvis en af testkemikalierne fysiske og/eller kemiske egenskaber ikke er egnet til et gennemstrømningsfortyndersystem, kan et alternativt eksponeringssystem (f.eks. statisk udskiftning) benyttes. De af systemets komponenter, der har vandkontakt, bør være af glas, rustfrit stål og/eller polytetrafluorethylen. Egnet plast kan dog bruges, hvis det ikke skader undersøgelsen. Eksponeringsbeholderne bør være akvarier af glas eller rustfrit stål udstyret med standrør, som giver et beholdervolumen på ca. 4,0-10,0 l og en vanddybde på minimum 10-15 cm. Systemet bør kunne bære alle eksponeringskoncentrationer og en kontrol med fire replikater pr. behandling. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering (f.eks. 25 ml/min). Behandlingsbeholderne placeres vilkårligt i eksponeringssystemet med henblik på at reducere potentielle virkninger af placeringen, bl.a. mindre variationer i temperatur, lysintensitet osv. Der anvendes fluorescerende lys for at give en lysperiode på 12 timers lys: 12 timers mørke ved en intensitet på 600-2 000 lux (lumen/m²) ved vandoverfladen. Vandtemperaturen holdes på 22 ° ± 1 °C, pH opretholdes mellem 6,5 og 8,5, og koncentrationen af opløst ilt (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % af luftmætningen) i hver testbeholder. Som minimum måles vandtemperatur, pH og opløst ilt en gang om ugen, temperaturen skal helst måles løbende i mindst en testbeholder. I bilag 1 skitseres de forsøgsbetingelser, hvorunder protokollen udføres. For yderligere oplysninger om fastsættelse af gennemstrømningseksponeringssystemer og/eller systemer med statisk udskiftning henvises til ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (5) og generelle toksikologiske test i vand.

Vandkvalitet

8. Der kan anvendes lokalt tilgængeligt vand (f.eks. kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand), som muliggør normal vækst og udvikling af *X. laevis*-haletudser. Da den lokale vandkvalitet kan variere betydeligt fra det ene område til det andet, bør vandkvaliteten analyseres, især hvis der ikke foreligger historiske data om, hvorvidt vandet kan bruges til at opdrætte *Xenopus*. Man skal være særligt opmærksom på, at vandet ikke indeholder kobber, chlorin og chloraminer, som alle er giftige for frøer og haletudser. Det anbefales yderligere at analysere vandet for baggrundsværdier af fluor, perchlorater og chlorat (biprodukter ved desinficering af drikkevand), da alle disse anioner er iodtransportstoffer fra skjoldbruskkirtlen, og høje niveauer af hver af disse anioner kan forstyrre undersøgelsens resultat. Der foretages analyser før påbegyndelse af testen, og testvandet må normalt ikke indeholde disse anioner.

Iodidkoncentration i testvandet

9. For at få skjoldbruskkirtlen til at syntetisere TH skal der være tilstrækkeligt iodid tilgængelig for larverne gennem en kombination af vandige kilder og kostkilder. I øjeblikket er der ingen empirisk afledte retningslinjer for minimale iodidkoncentrationer. Iodidtilgængelighed kan dog påvirke skjoldbruskkirtelsystemets modtagelighed for thyreoideaaktive agenser og er kendt for at modulere skjoldbruskkirtlens basale aktivitet, et aspekt, som fortjener opmærksomhed ved fortolkning af resultaterne fra den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Derfor anføres målte vandige iodidkoncentrationer fra testvandet. På grundlag af de tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne har protokollen vist sig at fungere godt, når iodidkoncentrationerne (I^-) i testvandet lå mellem 0,5 og 10 $\mu\text{g/l}$. Ideelt bør minimumsiodidkoncentrationen i testvandet ligge på 0,5 $\mu\text{g/l}$. Hvis testvandet rekonstitueres på grundlag af deioniseret vand, tilsættes iodet ved en minimumskoncentration på 0,5 $\mu\text{g/l}$. En eventuel tilsætning af iod eller andre salte til testvandet anføres i rapporten.

Opbevaring af dyrene

Pasning af voksne og avl

10. Pasning af voksne og avl udføres i overensstemmelse med standardretningslinjer, og læseren henvises til yderligere oplysninger i standardvejledningen for udførelse af Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX) (6). Disse standardretningslinjer omfatter et eksempel på relevante pasnings- og avlsmetoder, men en streng overholdelse er ikke påkrævet. For at inducere avl injiceres (3-5) par voksne hunner og hanner med humant choriogonadotropin (hCG). Hunner og hanner injiceres med henholdsvis ca. 800 IU-1 000 IU og 600 IU-800 IU hCG opløst i en 0,6-0,9 % saltvandsopløsning. Ynglende par opbevares uforstyrrede og under statiske betingelser i store beholdere for at fremme amplexus. Bunden af hver ynglebeholder bør have en falsk bund af rustfrit stål eller plastvæv, så æggemasserne kan falde ned i beholderens bund. Frøer, som injiceres sidst på eftermiddagen, vil normalt lægge de fleste af deres æg midt på den følgende formiddag. Efter at en tilstrækkelig mængde æg er frigivet og befrugtet, fjernes de voksne dyr fra ynglebeholderne.

Pasning og udvælgelse af larver

11. Efter at de voksne er fjernet fra ynglebeholderne, indsamles æggene og vurderes med henblik på levedygtighed ved hjælp af en repræsentativ delmængde af embryoner fra alle ynglebeholdere. Den eller de bedste gydninger (2-3 anbefales for at vurdere kvaliteten af gydningerne) udtages baseret på embryonernes levedygtighed og tilstedeværelsen af et tilstrækkeligt antal (minimum 1 500) embryoner. Alle organismer, der anvendes i en undersøgelse, bør stamme fra en enkelt gydning (dvs. at gydningerne ikke bør sammenblandes). Embryonerne overføres til en stor flad skål, og alle åbenlyst døde eller abnorme æg (se definition i (5)) fjernes ved hjælp af en pipette eller øjendråbetæller. De sunde embryoner fra hver af de tre gydninger overføres til tre separate udklækningsbeholdere. Fire dage efter at være blevet placeret i udklækningsbeholderne udvælges den bedste gydning baseret på levedygtighed og udklækningssucces, og larverne overføres til et passende antal opdrætsbeholdere ved $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$. Endvidere flyttes nogle ekstra larver til ekstra beholdere til brug som erstatninger i tilfælde af dødelighed i opdrætsbeholderne i den første uge. Denne fremgangsmåde sikrer en konsistent populationstæthed og mindsker dermed de udviklingsmæssige afvigelser inden for kohorten af en enkelt gydning. Alle opdrætsbeholdere suges rene dagligt. Af forsigtighedshensyn foretrækkes vinyl- eller nitrilhandsker frem for latexhandsker. Hver dag fjernes døde individer, og erstatningslarver udsættes for at opretholde populationstætheden i den første uge. Fodring foretages mindst to gange om dagen.

12. I præeksponeringsfasen akklimatiseres haletudserne til de faktiske eksponeringsbetingelser, bl.a. fodertype, temperatur, lys-/mørkecyklus og dyrkningsmedium. Det anbefales derfor, at det samme dyrknings-/fortyndingsvand bruges i præeksponeringsfasen og i eksponeringsfasen. Hvis haletudserne holdes i et statisk dyrkningssystem i præeksponeringsfasen, udskiftes dyrkningsmediet helt mindst hver anden uge. Sammenklumpning forårsaget af høj larvetæthed i præeksponeringsperioden bør undgås, fordi sådanne virkninger i høj grad kan påvirke haletudsernes udvikling i den efterfølgende testfase. Derfor bør opdrætnings-tætheden ikke overstige omkring fire haletudser/l dyrkningsmedium (statisk eksponeringssystem) eller 10 haletudser/l dyrkningsmedium (med en gennemstrømningshastighed på f.eks. 50 ml/min. i præeksponerings- eller dyrkningssystemet). Under disse betingelser bør haletudserne udvikle sig fra stadium 45/46 til stadium 51 på 12 dage. Repræsentative haletudser fra denne stampopulation kontrolleres dagligt med henblik på udviklingsstadium for at anslå et rette tidspunkt for indledning af eksponeringen. Det bør sikres, at stress og traumer for haletudserne minimeres, især under flytning, rensning af akvarier og håndtering af larver. Belastende betingelser/aktiviteter bør undgås, såsom høj og/eller uophørlig støj, bankning på akvariet, vibrationer i akvariet, for høj aktivitet i laboratoriet og hurtige ændringer i miljømedier (lystilgængelighed, temperatur, pH, DO, vandgennemstrømningshastighed osv.). Udvikler haletudserne sig ikke til stadium 51 inden for 17 dage efter befrugtning, må for høj stress betragtes som en potentiel årsag.

Larvedyrkning og -fodring

13. Haletudser fodres med f.eks. det kommercielle haletudsefoder, som anvendes i valideringsundersøgelserne (se også bilag 1), i hele præeksponeringsperioden (efter Nieuwkoop og Faber (NF) stadium 45/46 (8)) og i hele testperioden på 21 dage eller anden diæt, som har vist sig at give samme resultat af Amphibian Metamorphosis Assay. Fodringen i præeksponeringsperioden justeres omhyggeligt, så den opfylder kravene til haletudsernes udvikling, dvs. at der gives de nyudklækkede haletudser små portioner foder flere gange om dagen (mindst to). Overskydende foder bør undgås for at i) bevare vandkvaliteten og ii) undgå tilstopning af gællefiltre med fødepartikler og affald. De daglige rationer af det haletudsefoder, der bruges i valideringsundersøgelserne, øges i takt med haletudsens vækst til ca. 30 mg/dyr/dag kort før indledningen af testen. Dette kommercielt tilgængelige foder har i valideringsundersøgelserne vist sig at understøtte X. laevis-haletudsernes korrekte vækst og udvikling og er et finpartikulært produkt, som bliver hængende i vandsøjlen i lang tid og udvaskes med strømmen. Derfor bør den samlede daglige fodermængde opdeles i mindre portioner og gives mindst to gange dagligt. Fodringshyppigheden for dette foder er anført i tabel 1. Fodermængden registreres. Foderet kan gives tørt eller som en stamopløsning fremstillet i fortyndingsvand. En sådan stamopløsning fremstilles frisk hver anden dag og opbevares ved 4 °C, når den ikke er i brug.

Tabel 1

Fodring med kommercielt haletudsefoder anvendt i valideringsundersøgelserne for X. laevis-haletudser i in vivo-delen af AMA under gennemstrømningsbetingelser.

Undersøgelsesdag	Foderration (mg foder/dyr/dag)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analytisk kemi

14. Før gennemførelsen af en undersøgelse vurderes stabiliteten af testkemikaliets på grundlag af eksisterende information om dets opløselighed, nedbrydelighed og flygtighed. Testopløsninger fra hver replikatbeholder for hver enkelt koncentration udtages til kemiske analyser ved testens påbegyndelse (dag 0) og ugentligt under testen for mindst fire prøver. Det anbefales også, at hver testkoncentration analyseres under klargøring af systemet, før testen påbegyndes, for at kontrollere systemets effektivitet. Endvidere anbefales det, at stamopløsningerne analyseres, når de skiftes, især hvis mængden af stamopløsning ikke giver tilstrækkelige kemikaliemængder, der kan udstrækkes til rutineprøvetagningsperiodernes varighed. I tilfælde af kemikalier, som ikke kan påvises ved nogle eller alle de i testen anvendte koncentrationer, bør stamopløsninger måles og systemgennemstrømningshastigheder registreres med henblik på at beregne nominelle koncentrationer.

Kemikaliertilførsel

15. Den anvendte metode til at indføre testkemikaliets i systemet kan variere alt efter dets fysisk-kemiske egenskaber. Vandopløselige kemikalier kan opløses i aliquoter af testvandet ved en koncentration, der giver mulighed for tilførsel ved målttestkoncentrationen i et gennemstrømningssystem. Kemikalier, der er flydende ved stuetemperatur og tungtopløselige i vand, kan indføres ved hjælp af væske: væskemætningsmetoder. Kemikalier, der er faste ved stuetemperatur og tungtopløselige i vand, kan indføres ved hjælp af mætningskolonner med glasuld (7). Der skal helst benyttes et testsystem uden bærestof. Forskellige testkemikalier vil dog have forskellige fysisk-kemiske egenskaber, der sandsynligvis vil kræve forskellige tilgange til fremstilling af vand til kemikalieeksponering. Der skal helst gøres en indsats for at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: i) visse opløsningsmidler selv kan føre til toksicitet og/eller uønskede eller uventede endokrinologiske reaktioner, ii) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker gennem brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, og iii) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm i forbindelse med mikrobiel aktivitet. For kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (4), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af kemikaliets kemiske egenskaber. Opløsningsmidler, som er konstateret effektive til toksicitetstest i vandmiljø, omfatter acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol. Såfremt der benyttes et opløsningsmiddel som bærestof, skal opløsningsmidlets koncentrationer ligge under den kroniske nuleffekt-koncentration (NOEC). OECD anbefaler højst 100 µl/l i sit Guidance Document, mens det i en senere oversigt anbefales, at der bruges opløsningsmiddelkoncentrationer helt ned til 20 µl/l fortyndingsvand (12). Bruges der opløsningsmidler som bærestoffer, bør passende opløsningsmiddelkontroller evalueres ud over ikkeopløsningsmiddelkontroller (rent vand). Hvis det ikke er muligt at administrere et kemikalie via vandet enten på grund af fysisk-kemiske egenskaber (lav opløselighed) eller begrænset kemisk tilgængelighed, kan det overvejes at indføre det gennem ernæringen. Der er udført forberedende arbejde vedrørende eksponering gennem føden, men denne eksponeringsvej benyttes almindeligvis ikke. Valget af metode dokumenteres og kontrolleres gennem analyse.

Udvælgelse af testkoncentrationer

Fastsættelse af den høje teststofkoncentration

16. Med henblik på denne test fastsættes den høje teststofkoncentration ved testkemikaliets opløselighedsgrænse, den maksimalt tolererede koncentration (MTC) for akut toksiske kemikalier eller 100 mg/l, alt efter hvilken der er lavest.
17. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en akut dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger empiriske data om akut dødelighed, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC. Selv om brugen af regressionsmodeller kan være den teknisk set mest forsvarlige metode til at anslå MTC, kan en nyttig tilnærmelse til MTC afledes af eksisterende akutte data ved at anvende 1/3 af den akutte LC₅₀-værdi. Der kan dog mangle data om akut toksicitet for de arter, der testes. Såfremt der ikke foreligger data om artsspecifik akut toksicitet, kan der foretages en 96-timers LC₅₀-test med haletudser, som er repræsentative (dvs. samme stadie) for dem, der testes i AMA. Hvis data fra andre akvatiske arter er tilgængelige (f.eks. LC₅₀-undersøgelser af fisk eller paddearter), kan der ved et fagligt skøn anslås en sandsynlig MTC på grundlag af ekstrapolering mellem arter.

18. Er kemikaliet ikke akut toksisk og opløseligt over 100 mg/l, bør 100 mg/l alternativt betragtes som den højeste testkoncentration (HTC), da denne koncentration normalt betragtes som »praktisk talt ikketoksisk«.
19. Selv om det ikke er den anbefalede fremgangsmåde, kan statiske udskiftningsmetoder benyttes, hvis gennemstrømningsmetoder er utilstrækkelige til at nå frem til MTC. Benyttes der metoder med statisk udskiftning, skal stabiliteten af testkemikaliet koncentration dokumenteres og ligge inden for resultatkravenes grænser. Der anbefales udskiftningsperioder på 24 timer. Udskiftningsperioder på over 72 timer accepteres ikke. Desuden bør vandkvalitetsparametre (f.eks. DO, temperatur, pH osv.) måles ved afslutningen af hver udskiftningsperiode, umiddelbart før udskiftning.

Testkoncentrationsområde

20. Der kræves som minimum tre testkoncentrationer og en kontrolgruppe med rent vand (og om nødvendigt en bærestofkontrolgruppe). Testkoncentrationens minimumsdifference mellem den højeste og den laveste bør være omkring en størrelsesorden. Den maksimale dosisadskillelse er 0,1, og den minimale er 0,33.

FREM GANGSMÅDE

Indledning og gennemførelse af test

Dag 0

21. Eksponeringen indledes, når et tilstrækkeligt antal haletudser i præeksponeringsbestanden har nået udviklingsstadium 51 ifølge Nieuwkoop og Faber (8) og er 17 dage gamle eller derunder efter befrugtning. Ved udvælgelse af forsøgsdyr pooles sunde og normalt udseende haletudser i stampopulationen i en enkelt beholder, der indeholder en passende mængde fortyndingsvand. Til bestemmelse af udviklingsstadium fjernes haletudser enkeltvis fra poolingbeholderen ved hjælp af et lille net eller en sigte og overføres til et gennemsigtigt målekammer (f.eks. en 100 mm Petriskål) med fortyndingsvand. Ved bestemmelse af stadium skal der helst ikke bruges bedøvelsesmidler, men haletudserne kan bedøves enkeltvis før håndtering med 100 mg/l tricain methansulfonat (f.eks. MS-222) med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat (pH 7,0). Hvis der bruges bedøvelse, bør metoden til korrekt brug af f.eks. MS-222 tilvejebringes fra erfarne laboratorier og anføres sammen med testresultaterne. Dyrene håndteres forsigtigt under denne overførsel for at minimere håndteringsstress og undgå skader.
22. Dyrenes udviklingsstadium bestemmes ved hjælp af et binokulært dissektionsmikroskop. For at reducere den endelige variabilitet i udviklingsstadium er det vigtigt, at denne stadietinddeling foretages så nøjagtigt som muligt. Ifølge Nieuwkoop og Faber (8) er baglemsmorfologi det primære udviklingsmæssige kendetegn ved udvælgelse af stadium 51-organismer. Baglemmernes morfologiske karakteristika undersøges under mikroskop. Selv om Nieuwkoop og Fabers (8) fuldstændige vejledning bør konsulteres for at få omfattende information om stadietinddeling af haletudser, kan man pålideligt bestemme stadier gennem fremtrædende morfologiske kendetegn. Følgende tabel kan bruges til at forenkle og standardisere stadietinddelingsprocessen under hele undersøgelsen ved at identificere de fremtrædende morfologiske kendetegn i forbindelse med de forskellige stadier, under antagelse af at udviklingen er normal.

Tabel 2

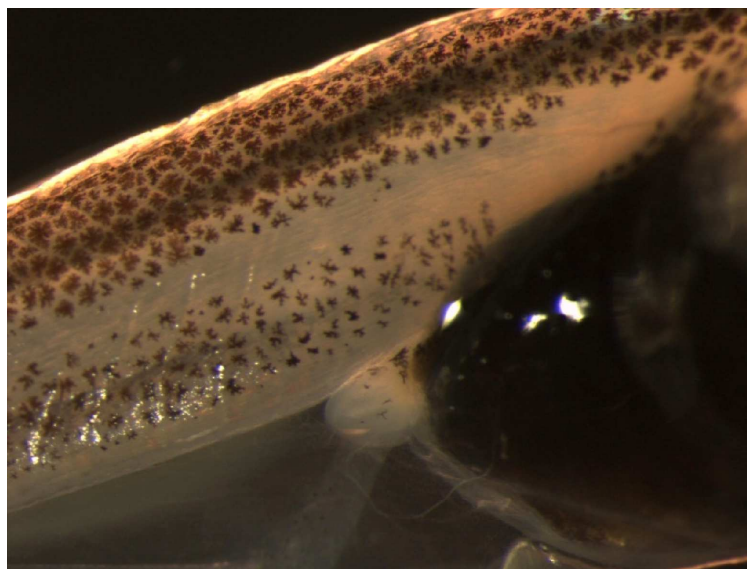
Fremtrædende morfologiske kendetegn til stadietinddeling i henhold til Nieuwkoop og Fabers vejledning

Fremtrædende morfologiske kendetegn	Udviklingsstadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Baglem	X	X	X	X	X	X	X									
Forlem						X	X	X	X	X						
Kraniofacial struktur										X	X	X	X			
Lugtnerve morfologi											X	X	X			
Halelængde													X	X	X	X

23. Alle haletudser skal være på stadium 51 for at indlede testen. Det mest fremtrædende morfologiske kendetegn i forbindelse med stadiainddeling er for det stadium baglemsmorfologien, som vises i figur 1.

Figur 1.

Baglemsmorfologi i stadium 51 hos en *X. laevis*-haletudse.



24. Ud over udvælgelse efter stadium kan der anvendes en valgfri udvælgelse af forsøgsdyr efter størrelse. Til det formål måles hele kropslængden (ikke snude til gat) på dag 0 for en delprøve på ca. 20 haletudser på stadium 51 efter Nieuwkoop og Faber. Efter beregning af gennemsnittet af den fulde kropslængde for denne gruppe dyr kan der fastsættes minimums- og maksimumsgrænser for hele forsøgsdyrenes kropslængde, således at gennemsnitsværdien kan svinge ± 3 mm (gennemsnitsværdier af hele kropslængden svinger 24,0-28,1 mm for stadium 51-haletudser). Inddelingen i udviklingsstadier er dog den primære parameter for at bestemme, om hvert forsøgsdyr er klar. Haletudser med meget synlige misdannelser eller skader udelukkes fra assayet.
25. Haletudser, som opfylder de ovenfor beskrevne stadietkriterier, opbevares i en beholder med rent dyrkningsvand, indtil stadiainddelingen er afsluttet. Når stadiainddelingen er afsluttet, fordeles larverne vilkårligt i eksponeringsbehandlingsbeholdere, indtil hver beholder indeholder 20 larver. Hver behandlingsbeholder inspiceres for dyr med et abnormt udseende (f.eks. skader, abnorm svømmeadfærd osv.). Åbenlyst usundt udseende haletudser fjernes fra behandlingsbeholderne og erstattes af nyudvalgte larver fra poolingbeholderen.

Observationer

26. For mere tilbundsående information om testafslutningsprocedurer og behandling af haletudser henvises til OECD's Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Dag 7-målinger

27. På dag 7 fjernes fem tilfældigt valgte haletudser pr. replikat fra hver forsøgsbeholder. Den tilfældige udvælgelse bør give hver testet organisme lige stor sandsynlighed for at blive valgt. Dette kan opnås ved at benytte en randomiseringsmetode, men kræver, at alle haletudser fanges og tages op. Haletudser, der ikke udvælges, returneres til oprindelsesbeholderen, og udvalgte haletudser aflives humanitært i 150-200 mg/l f.eks. MS-222 med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat for at komme op på en pH-værdi på 7,0. De aflivede haletudser skylles i vand og duppes tørre, hvorefter kropsvægten bestemmes til nærmeste milligram. Baglemslængde, snude-til-gat-længde og udviklingsstadium (ved hjælp af binokulært dissektionsmikroskop) bestemmes for hver haletudse.

Dag 21-målinger (testafslutning)

28. Ved testens afslutning (dag 21) fjernes de resterende haletudser fra forsøgsbeholderne og aflives humanitært i 150-200 mg/l f.eks. MS-222 med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat, jf. ovenfor. Haletudserne skylles i vand og duppes tørre, hvorefter kropsvægten bestemmes til nærmeste milligram. Udviklingsstadiet, SVL og baglemlængder måles for hver haletudse.
29. Alle larver anbringes i Davidson's fiksativ i 48-72 timer enten som helkropsprøver eller som trimmede hovedvævsprøver med underkæbe til histologiske bedømmelser. Til histopatologi udtages i alt fem haletudser fra hver replikatbeholder. Da follikelcellehøjde afhænger af stadium (10), er den mest egnede stikprøvemethode til histologiske analyser at anvende individer i tilsvarende stadium, når det er muligt. For at udvælge individer i samme stadium inddeles alle larver først i stadier før udvælgelsen og efterfølgende behandling til dataindsamling og opbevaring. Dette er nødvendigt, fordi en normal divergens i udvikling vil resultere i forskellige fordelinger på stadier i hver enkelt replikatbeholder.
30. Dyr, som udvælges til histopatologisk undersøgelse ($n = 5$ fra hvert replikat), matches i forhold til kontrollernes medianstadium (poolede replikater), når det er muligt. Hvis der er replikatbeholdere med over fem larver på det rette stadium, udvælges fem larver tilfældigt.
31. Hvis der er replikatbeholdere med under fem larver på det rette stadium, udtages tilfældigt udvalgte individer fra det næste lavere eller højere udviklingsstadium for at nå op på den samlede prøvestørrelse på fem larver pr. replikat. Beslutningen om at udtage ekstra larver fra det næste enten lavere eller højere udviklingsstadium træffes på grundlag af en samlet vurdering af stadiefordelingen i kontrol- og kemikaliebehandlinger. Dvs. hvis den kemiske behandling er forbundet med en udviklingshæmning, udtages der ekstra larver fra det næste lavere stadium. Hvis den kemiske behandling er forbundet med en fremskyndelse af udviklingen, udtages der ekstra larver fra det næste højere stadium.
32. I tilfælde af alvorlige forandringer i haletudsernes udvikling på grund af behandling med et testkemikalie er der muligvis ingen overlapning i stadiefordeling i de kemiske behandlinger med udviklingsstadiet i den beregnede kontrolmedian. Kun i disse tilfælde bør udvælgelsesprocessen ændres ved at anvende et andet stadium end kontrolmedianstadiet til at nå en udtagning af larver på matchende stadier til histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Er stadiet endvidere ubestemt (dvs. asynkronicitet), vælges fem haletudser fra hvert replikat tilfældigt ud til histologisk analyse. Begrundelsen for at udtage en larve, som ikke er på et stadium svarende til kontrolmedianens udviklingsstadium, anføres.

Bestemmelse af biologiske endepunkter

33. I den 21 dage lange eksponeringsfase foretages måling af primære endepunkter på dag 7 og dag 21, men daglig observation af forsøgsdyrene er dog nødvendig. Tabel 3 giver et overblik over målingens endepunkter og de tilsvarende observationstidspunkter. Mere detaljerede oplysninger om tekniske procedurer for måling af slutpunkter og histologiske vurderinger er tilgængelige i OECD's vejledningsdokumenter (9).

Tabel 3

Observationstidspunkter for primære endepunkter i AMA

Slutpunkter	Dagligt	Dag 7	Dag 21
— Dødelighed	•		
— Udviklingsstadium		•	•
— Baglemlængde		•	•
— Snude-gat-længde		•	•
— Kropsvægt (våd)		•	•
— Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtel			•

Slutpunkter

34. Udviklingsstadie, baglemslængde, SVL og vådvægt er slutpunkter for AMA, og hver enkelt diskuteres kort i det følgende. Yderligere teknisk information om indsamling af disse data er tilgængelig i de vejledningsdokumenter, der er henvist til, bl.a. procedurer for computerstøttet analyse, som det anbefales at bruge.

Udviklingsstadium

35. *X. laevis*-haletuders udviklingsstadium bestemmes ved hjælp af Nieuwkoop og Fabers stadieinddelingskriterier (8). Data om udviklingsstadier bruges til at bestemme, om udviklingen er fremskyndet, asynkron, forsinket eller upåvirket. Fremskyndelse eller forsinkelse af udviklingen bestemmes ved at foretage en sammenligning mellem det medianstadie, som nås af kontrolgrupperne og de behandlede grupper. Asynkron udvikling anføres, når de undersøgte væv ikke er misdannede eller abnorme, men det relative tidspunkt for morfogenesen eller udviklingen af forskellige væv forstyrres hos en enkelt haletudse.

Baglemslængde

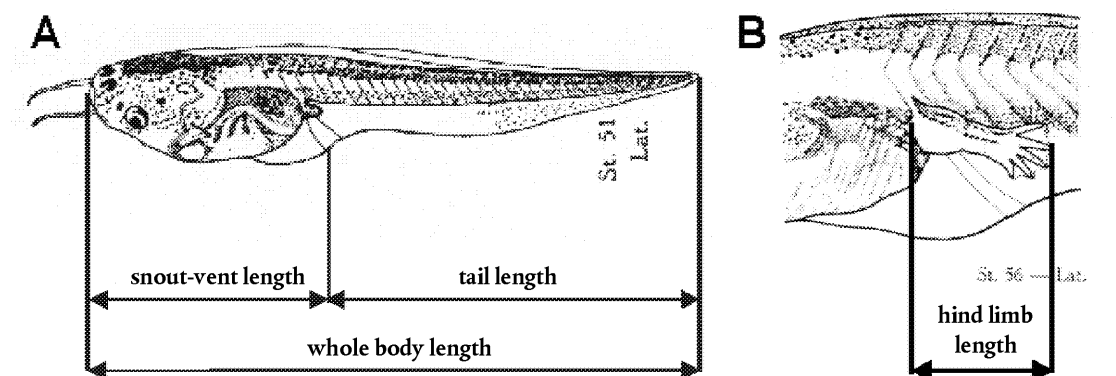
36. Differentiering og vækst af baglemmer kontrolleres af skjoldbruskkirtelhormoner og er vigtige udviklingsmæssige kendetegn, som allerede benyttes i bestemmelsen af udviklingsstadium. Udviklingen af baglemmer bruges kvalitativt i bestemmelsen af udviklingsstadie, men betragtes her som et kvantitativt endepunkt. Derfor måles baglemslængde som et endepunkt for at afdække virkninger på thyreoideaaksen (figur 2). Af konsekvenshensyn måles baglemslængden på det venstre baglem. Baglemslængden evalueres både på forsøgets dag 7 og dag 21. På dag 7 er måling af baglemslængden ligetil, som det fremgår af figur 2. Det er dog mere kompliceret at måle baglemslængden på dag 21, da lemmerne krummer. Derfor måles baglemslængden på dag 21 fra kropsvæggen og ved at følge lemmets midterlinje gennem alle vinkelafvigelser. Ændringer i baglemslængden på dag 7 anses stadig for væsentlige for potentiel aktivitet i skjoldbruskkirtlen, selv om de ikke er synlige på dag 21. Længdemålinger foretages på digitale fotografier ved hjælp software til billedanalyse som beskrevet i OECD's Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Kropslængde og vådvægt

37. Bestemmelser af snude-til-gat-længde (SVL) (figur 2) og vådvægt er inkluderet i testprotokollen for at vurdere testkemikaliernes mulige virkninger på haletuders vækstrate sammenlignet med kontrolgruppen og er nyttige ved påvisning af generel toksicitet i testkemikaliets. Da fjernelse af vedhængende vand ved vægtbestemmelsen kan skabe stressende forhold for haletuderne og kan forårsage hudskader, udføres disse målinger på dag 7 for haletuderne i delprøven og for alle de resterende haletudser ved testens afslutning (dag 21). Af konsekvenshensyn anvendes den øvre side af gattet som målingens halegrænse.
38. Snude-til-gat-længden (SVL) bruges til at vurdere haletudsens vækst som illustreret i figur 2.

Figur 2

(A) Typer af kropslængdemålinger og (B) Målinger af baglemslængder for *X. laevis*-haletudser (1).



Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtel

39. Selv om udviklingsstadium og baglemlængde er vigtige endepunkter til at evaluere eksponeringsrelaterede ændringer i metamorfisk udvikling, kan udviklingsforsinkelse ikke i sig selv betragtes som en diagnostisk indikator for aktivitet, der skader skjoldbruskkirtlen. Nogle ændringer kan kun observeres ved rutinemæssig histopatologisk analyse. Diagnostiske kriterier omfatter forstørret/formindsket skjoldbruskkirtel, follikelcellehypertrofi, follikelcellehyperplasi og som supplerende kvalitative kriterier: follikulært lumenområde, kolloid kvalitet og follikelcellehøjde/-form. Klassificering i alvorsgrader (4 grader) anføres. Oplysninger om, hvordan prøver udtages og behandles til histologisk analyse, og om udførelse af histologiske analyser af vævsprøver er tilgængelige i »Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation« og »Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas« (9). Laboratorier, der udfører assayet for første gang, bør søge råd hos erfarne patologer med henblik på uddannelse, før de foretager en histologisk analyse og vurdering af skjoldbruskkirtlen. Åbenlyse og væsentlige ændringer i slutpunkter, der viser fremskyndet eller asynkron udvikling, kan betyde, at det ikke er nødvendigt at foretage en histopatologisk analyse af skjoldbruskkirtlerne. Manglende åbenlyse morfologiske ændringer eller bevis for udviklingsforsinkelse skal underkastes histologiske analyser.

Dødelighed

40. Alle testbeholdere kontrolleres dagligt for døde haletudser, og antallene registreres for hver beholder. Dato, koncentration og beholdernummer for eventuel observation af dødelighed registreres. Døde dyr fjernes fra testbeholderen, så snart de observeres. En dødelighed på over 10 % kan tyde på uhensigtsmæssige testbetingelser eller toksiske virkninger af testkemikaliets.

Yderligere observationer

41. Tilfælde af abnorm adfærd og meget synlige misdannelser og læsioner registreres. Dato, koncentration og beholdernummer for eventuelle observationer af abnorm adfærd, grove misdannelser eller læsioner registreres. Normal adfærd er kendetegnet ved, at haletudserne hænger i vandsøjlen med halen hævet over hovedet, slår regelmæssigt og rytmisk med halefinnen, jævnligt kommer op til overfladen for at ånde og reagerer på stimuli. Abnorm adfærd omfatter f.eks. at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli. Endvidere skal store forskelle i fødeindtagelse mellem behandlingerne registreres. Grove misdannelser og læsioner kan omfatte morfologiske abnormiteter (f.eks. deformiteter på lemmer), hæmoragiske læsioner, bakterie- eller svampeinfektioner for blot at nævne nogle få. Disse bestemmelser er kvalitative og anses for at svare til kliniske tegn på sygdom/stress og foretages ved sammenligning med kontroldyr. Hvis forekomsten eller omfanget er større i eksponerede beholdere end i kontrollerne, betragtes disse som bevis for åbenlys toksicitet.

DATA OG RAPPORTERING

Dataindsamling

42. Alle data indsamles ved hjælp af elektroniske eller manuelle systemer, der er i overensstemmelse med god laboratoriepraksis (GLP). Undersøgelsesdataene skal omfatte:

Testkemikalie:

- karakterisering af testkemikaliets: fysisk-kemiske egenskaber, information om stabilitet og bionedbrydelighed
- kemiske oplysninger og data: blanding af fortyndinger: metode og frekvens. Oplysninger om testkemikaliets omfatter faktiske og nominelle koncentrationer af testkemikaliets og i nogle tilfælde eventuelt det ikkeoprindelige kemikalie. Målinger af testkemikaliets kan være påkrævet for både stamopløsninger og testopløsninger
- opløsningsmiddel (hvis det er andet end vand): begrundelse for valg af opløsningsmiddel og beskrivelse af opløsningsmidlet (art, anvendt koncentration).

Testbetingelser:

- Operationelle registreringer: disse består af observationer vedrørende testsystemets funktionsmåde og støttemiljø samt infrastruktur. Typiske registreringer omfatter: omgivende temperatur, testtemperatur, lysperiode, status for kritiske komponenter i eksponeringssystemet (f.eks. pumper, cyklustællere, tryk), gennemstrømningshastigheder, vandstand, standflaskeændringer og foderregistrering. Generelle vandkvalitetsparametre omfatter: pH, DO, ledningsevne, total iod, alkalinitet og hårdhed
- afvigelser fra forsøgsmetoden: denne information bør omfatte alle oplysninger eller forklarende beskrivelser af afvigelser fra forsøgsmetoden.

Resultater:

- biologiske observationer og data: disse omfatter daglige observationer af dødelighed, fødeindtagelse, abnorm svømmeadfærd, sløvhed, tab af balance, misdannelser, læsioner osv. Observationer og data indsamlet med forud fastsatte intervaller omfatter: udviklingsstadiet, baglemslængde, snude-til-gat-længde og vådvægt
- anvendte statistiske analyseteknikker og begrundelse for de anvendte teknikker, resultater af den statistiske analyse, helst i tabelform
- histologiske data: disse omfatter forklarende beskrivelser samt gradueret sværhedsgrad og specifikke observationers hyppighed, jf. nærmere oplysninger i vejledningsdokumentet vedrørende histopatologisk undersøgelse
- ad hoc-observationer: disse observationer bør omfatte forklarende beskrivelser af undersøgelsen, som ikke passer ind i de hidtil beskrevne kategorier.

Indberetning af data

43. Tillæg 2 indeholder regneark med daglig dataindsamling, der kan bruges som vejledning for indtastning af rådata og for beregninger af statistikoversigter. Endvidere stilles der indberetningsskemaer til rådighed, som passer til indsendelse af resuméer af endepunktsdata. Indberetningsskemaer til histologiske vurderinger kan ses i tillæg 2.

Resultatkrav og testens brugbarhed/validitet

44. Generelt vil grove afvigelser fra testmetoden resultere i uacceptable data til fortolkning eller indberetning. Derfor er følgende kriterier i tabel 4 blevet udarbejdet som vejledning i at bestemme kvaliteten af den udførte test, kontrolorganernes generelle præstation.

Tabel 4

Resultatkrav for AMA

Kriterium	Acceptable grænser
Testkoncentrationer	Opretholdt med en variationskoefficient på $\leq 20\%$ (variabilitet i målt testkoncentration) over den 21 dage lange test
Dødelighed blandt kontroldyrene	$\leq 10\%$ — dødelighed i et hvilket som helst replikat i kontrollerne må ikke overstige 2 haletudser
Minimumsmedian for udviklingsstadium i kontrollerne ved afslutning af testen	57
Spredning i udviklingsstadium i kontrollen	Den 10. og 90. percentil af udviklingsstadiefordelingen må ikke adskille sig med mere end fire stadier
Opløst ilt	$\geq 40\%$ luftmætning (*)

Kriterium	Acceptable grænser
pH	pH bør fastholdes på 6,5-8,5. Forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige 0,5.
Vandtemperatur	22 ° ± 1 °C — forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige 0,5 °C
Testkoncentrationer uden åbenlys toksicitet	≥ 2
Resultat af replikatet	≤ 2 replikater på tværs af forsøget kan være kompromitteret
Særlige betingelser for brug af opløsningsmiddel	Hvis der bruges et opløsningsmiddel som bærestof, benyttes der både en kontrolgruppe med opløsningsmiddel og en kontrolgruppe med rent vand, og resultaterne registreres
	Statistisk signifikante forskelle mellem kontrolgrupperne med opløsningsmiddel og med vand behandles specielt. Se nærmere oplysninger nedenfor
Særlige betingelser for system med statisk udskiftning	Repræsentative kemiske analyser før og efter udskiftning registreres
	Ammoniakniveauer måles umiddelbart inden udskiftning
	Alle vandkvalitetsparametre anført i tabel 1 i tillæg 1 måles umiddelbart inden udskiftning
	Udskiftningsperioden må ikke overstige 72 timer
	Passende ernæringsplan (50 % af den daglige foderration af kommercielt haletudsefoder)

(*) Beluftning af vand kan ske ved gennemboblingsflasker. Det anbefales at indstille gennemboblingsflaskerne på niveauer, der ikke skaber unødigt stress for haletudserne.

Testningens gyldighed

45. Følgende krav skal opfyldes, hvis en test skal anses for acceptabel/gyldig:

Gyldigt forsøg i en test, der bestemmes negativ med hensyn til aktivitet i skjoldbruskkirtlen:

- (1) For en given behandling (inklusive kontrolgrupper) må dødeligheden ikke overstige 10 %. For et bestemt replikat må dødeligheden ikke overstige tre haletudser, ellers anses replikatet for at være kompromitteret.
- (2) Mindst to behandlingsniveauer med alle fire ukompromitterede replikater bør være tilgængelige for analyse.
- (3) Mindst to behandlingsniveauer uden åbenlys toksicitet bør være tilgængelige for analyse.

Gyldigt forsøg i en test, der bestemmes positiv med hensyn til aktivitet i skjoldbruskkirtlen:

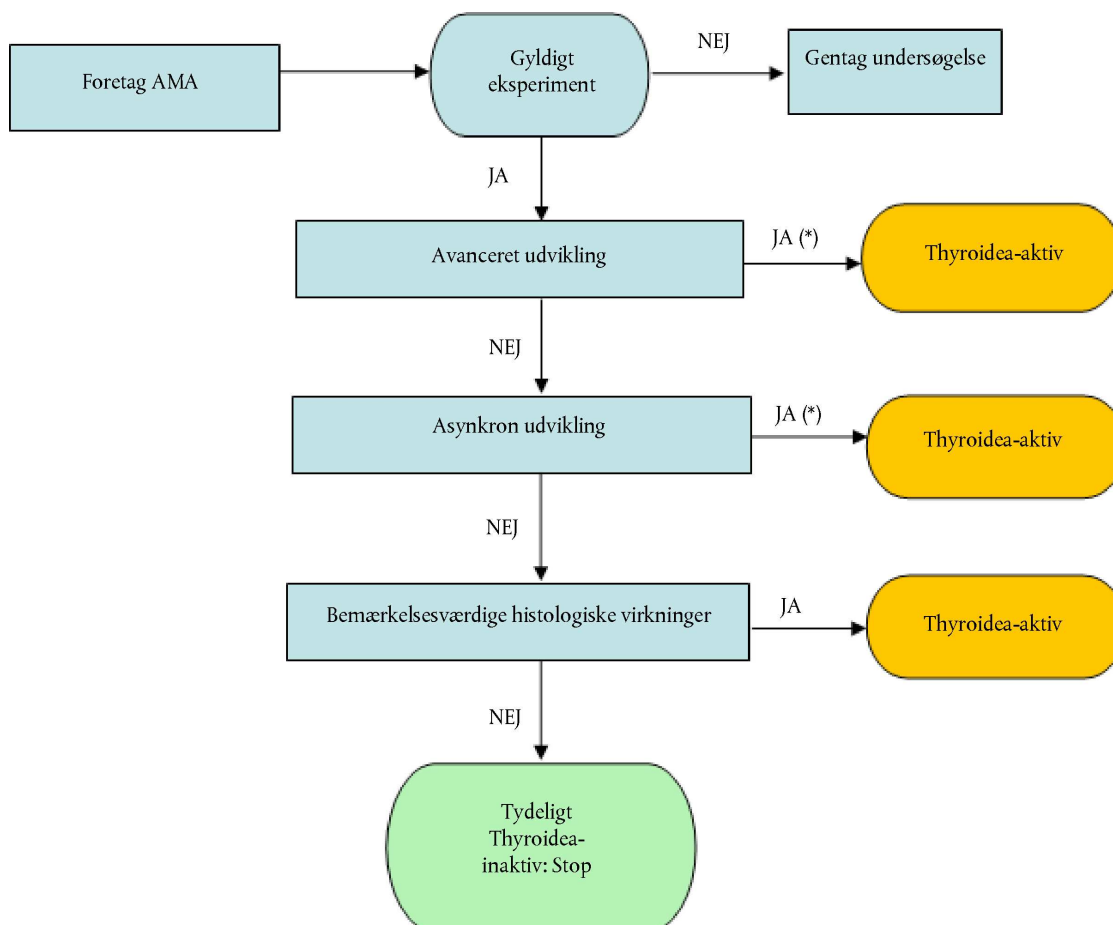
- (1) Dødelighed hos højst to haletudser/replikater i kontrolgruppen kan forekomme.

Beslutningsforløb for gennemførelse af AMA

46. Beslutningsforløbet blev udviklet for AMA for at yde logisk bistand til gennemførelse og fortolkning af resultaterne af bioassayet (se fremgangsmåde i figur 3). Beslutningsforløbet vægter grundlæggende endepunkterne i den avancerede udvikling, asynkron udvikling og histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen tungt, mens forsinket udvikling, snude-til-gat-længde og kropsvægt (våd), som er parametre, der potentielt kan påvirkes af generel toksicitet, vejer mindre tungt.

Figur 3

Beslutningsforløb for gennemførelse af AMA



(*) Nogle tilsynsmyndigheder kan kræve en histologisk analyse til trods for betydelige forskelle i avanceret og asynkron udvikling. Den enhed, der udfører denne test, opfordres til at rådføre sig med de nødvendige myndigheder forud for udførelsen af testen for at fastslå, hvilke endepunkter der kræves.

Avanceret udvikling (bestemt gennem udviklingsstadium, snude-til-gat-længde (SVL) og baglemlængde (HLL))

47. Avanceret udvikling vides kun at forekomme gennem virkninger, som er knyttet til thyreoideahormonet. Disse kan være virkninger på perifert væv såsom direkte interaktion med thyreoideahormonreceptoren (som med T4) eller virkninger, der forandrer niveauet af cirkulerende thyreoideahormoner. I begge tilfælde anses det for tilstrækkeligt bevis for, at kemikaliet er thyreoideaaktivt. Avanceret udvikling vurderes på en af to måder. For det første kan det generelle udviklingsstadium vurderes under anvendelse af den standardiserede tilgang, som er beskrevet nærmere hos Nieuwkoop og Faber (8). For det andet kan særlige morfologiske træk kvantificeres såsom baglemlængde på både dag 7 og 21, som associeres positivt med agonistiske virkninger på thyreoideahormonreceptoren. Hvis der forekommer statistisk signifikante fremskridt i udvikling eller baglemlængde, viser testen, at kemikaliet er thyreoideaaktivt.
48. Vurderingen af forsøgsdyr for forekomst af fremskyndet udvikling i forhold til kontrolpopulationen baseres på resultater af statistiske analyser udført for følgende fire endepunkter:
- baglemlængde (normaliseret ved SVL) på undersøgelsesdag 7
 - baglemlængde (normaliseret ved SVL) på undersøgelsesdag 21
 - udviklingsstadium på undersøgelsesdag 7
 - udviklingsstadium på undersøgelsesdag 21
49. Statistiske analyser af baglemlængde udføres på grundlag af målinger af længden af det venstre baglem. Baglemlængden normaliseres ved at beregne forholdet mellem et individs baglemlængde og snude-til-gat-længde. Herefter sammenlignes gennemsnittet af de normaliserede værdier for hvert behandlingsniveau. Fremskyndet udvikling vises ved en væsentlig stigning i gennemsnitlig baglemlængde (normaliseret) i en kemisk behandlingsgruppe sammenlignet med kontrolgruppen på undersøgelsesdag 7 og/eller undersøgelsesdag 21 (se tillæg 3).
50. Statistiske analyser af udviklingsstadium udføres på grundlag af bestemmelsen af udviklingsstadier ifølge de morfologiske kriterier beskrevet af Nieuwkoop og Faber (8). Det er tegn på fremskyndet udvikling, når der ved en »multi-quantal« analyse påvises en signifikant stigning i værdier for udviklingsstadium i en kemikaliebehandlingsgruppe sammenlignet med kontrolgruppen på undersøgelsesdag 7 og/eller undersøgelsesdag 21.
51. I AMA-testmetoden anses en signifikant virkning på et af de ovennævnte fire endepunkter for at være tilstrækkeligt til en positiv påvisning af fremskyndet udvikling. Det vil sige, at signifikante virkninger på baglemlængde på et bestemt tidspunkt ikke kræver underbygning af signifikante virkninger på baglemlængde på det alternative tidspunkt eller af signifikante virkninger på udviklingsstadium på dette bestemte tidspunkt. Endvidere kræver signifikante virkninger på udviklingsstadium på et bestemt tidspunkt ikke underbygning af signifikante virkninger på udviklingsstadium på det alternative tidspunkt eller af signifikante virkninger på baglemlængde på dette bestemte tidspunkt. Vægten af evidens for fremskyndet udvikling vil ikke desto mindre øges, hvis signifikante virkninger påvises for mere end et endepunkt.

Asynkron udvikling (bestemt gennem udviklingsstadietkriterier)

52. Asynkron udvikling er karakteriseret ved forstyrrelse af den relative timing af morfogenesen eller udvikling af forskellige væv hos en enkelt haletudse. Den manglende evne til klart at fastslå en organismes udviklingsstadium ved hjælp af rækken af morfologiske endepunkter, som anses for typiske for et givet stadium, viser, at vævene udvikler sig asynkront gennem metamorfosen. Asynkron udvikling er en indikator for thyreoideaaktivitet. De eneste kendte virkningsmekanismer, som forårsager asynkron udvikling, er gennem kemikaliers virkninger på perifer thyreoideahormonfunktion og/eller thyreoideahormonmetabolisme i væv under udvikling, som det observeres med deiodinaseinhibitorer.
53. Vurdering af forsøgsdyr for forekomst af asynkron udvikling i forhold til kontrolpopulationen skal være baseret på makroskopisk morfologisk vurdering af forsøgsdyrene på undersøgelsesdag 7 og undersøgelsesdag 21.
54. Nieuwkoop og Fabers (8) beskrivelse af en normal udvikling af *Xenopus laevis* danner rammerne for afdækning af en sekventiel rækkefølge for normal vævsremodellering. Udtrykket »asynkron udvikling« omhandler specifikt

de afvigelser i makroskopisk morfologisk udvikling hos haletudser, som hindrer en endelig bestemmelse af et udviklingsstadium ifølge Nieuwkoop og Fabers kriterier (8), fordi centrale morfologiske kendetegn viser karakteristiske træk ved forskellige stadier.

55. Som det ligger i udtrykket »asynkron udvikling«, bør der kun tages hensyn til tilfælde af afvigelser i fremskridt med remodelleringen af specifikke væv i forhold til fremskridt med remodelleringen af andre væv. Nogle klassiske fænotyper omfatter forsinkelse eller fravær af frembrud af forlemmer til trods for normal eller fremskyndet udvikling af baglemmer og halevæv eller tidlig resorption af gæller i forhold til stadiet for baglemsmorfogenese og haleresorption. Et dyr vil blive registreret for at udvise asynkron udvikling, hvis det ikke kan knyttes til et bestemt stadium, fordi det ikke opfylder et flertal af afgørende udviklingskriterier for et givet stadium, jf. Nieuwkoop og Faber (8), eller hvis der er ekstrem forsinkelse eller fremskyndelse af et eller flere nøgletræk (f.eks. helt resorberet hale, men ingen frembrud af forlemmer). Denne vurdering udføres kvalitativt og omfatter hele rækken af afgørende kendetegn, jf. Nieuwkoop og Faber (8). Det er dog ikke nødvendigt at registrere udviklingsstatus for de forskellige afgørende kendetegn ved de dyr, som observeres. Dyr, der registreres for at udvise asynkron udvikling, knyttes ikke til et udviklingsstadium i henhold til Nieuwkoop og Faber (8).
56. Et centralt kriterium for at betegne tilfælde af abnorm morfologisk udvikling som »asynkron udvikling« er, at den relative timing af vævsremodellering og vævsmorfogenese er forstyrret, mens de berørte vævs morfologi ikke er åbenlyst abnorm. Et eksempel til at illustrere denne fortolkning af makroskopiske morfologiske abnormiteter er, at forsinket baglemsmorfogenese i forhold til udviklingen af andre væv vil opfylde kriteriet for »asynkron udvikling«, mens tilfælde af manglende baglemmer, abnorme fingre eller tæer (f.eks. ektrodaktylia, polydaktylia) eller andre åbenlyse misdannelser af lemmer ikke skal betragtes som »asynkron udvikling«.
57. I den forbindelse bør de vigtigste morfologiske kendetegn, der skal vurderes for deres koordinerede metamorfiske fremskridt, omfatte baglemsmorfogenese, forlemsmorfogenese, forlemsfrembrud, stadiet for haleresorption (især resorption af halefinne) og hovedmorfologi (f.eks. gællestørrelse og gælleresorptionsstadium, underkæbemorfologi, protrusion af Meckels brusk).
58. Alt efter den kemiske virkningsmåde kan der forekomme forskellige makroskopiske morfologiske fænotyper. Nogle klassiske fænotyper omfatter forsinkelse eller fravær af forlemsfrembrud til trods for normal eller fremskyndet udvikling af baglemmer og halevæv, tidlig resorption af gæller i forhold til remodellering af baglemmer og hale.

Histopatologi

59. Hvis kemikaliet ikke forårsager åbenlys toksicitet og ikke fremskynder udviklingen eller forårsager asynkron udvikling, vurderes den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlerne ved hjælp af det rette vejledningsdokument (9). Udviklingsforsinkelse er — i fravær af toksicitet — en stærk indikator for aktivitet, der skader skjoldbruskkirtlen, men udviklingsstadiet er mindre følsom og mindre diagnostisk end den histopatologiske analyse af skjoldbruskkirtlen. Derfor er det i dette tilfælde påkrævet at foretage histopatologiske analyser af skjoldbruskkirtlerne. Virkninger på skjoldbruskkirtlens histologi er blevet påvist i mangel af virkninger på udviklingen. Forekommer der ændringer i skjoldbruskkirtlens histologi, anses kemikaliet for at være thyreoideaaktivt. Hvis der ikke observeres udviklingsforsinkelser eller vævslæsioner i skjoldbruskkirtlerne, anses kemikaliet for at være thyreoideainaktivt. Begrundelsen for denne afgørelse er, at skjoldbruskkirtlen er under indflydelse af TSH, og et hvilket som helst kemikalie, som forandrer cirkulerende thyreoideahormoner tilstrækkeligt til at forandre TSH-sekretet, vil resultere i histopatologiske ændringer i skjoldbruskkirtlerne. Forskellige virkningsmåder og -mekanismer kan forandre cirkulerende thyreoideahormon. Så selv om thyreoideahormonniveauet viser en skjoldbruskkirtelrelateret virkning, er det utilstrækkeligt til at fastslå, hvilken virkningsmåde eller -mekanisme der hænger sammen med reaktionen.
60. Da dette endepunkt ikke egner sig til grundlæggende statistiske metoder, skal bestemmelsen af en virkning i forbindelse med eksponeringen for et kemikalie foretages ved ekspertudtalelse fra en patolog.

Forsinket udvikling (bestemt gennem udviklingsstadiet, HLL, kropsvægt (BW), SLV)

61. Forsinket udvikling kan forekomme på grund af mekanismer, der skader skjoldbruskkirtlen, og indirekte toksicitet. En lidt forsinket udvikling sammen med åbenlyse tegn på toksicitet viser sandsynligvis en ikkespecifik toksisk virkning. Vurdering af toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen er et væsentligt element i forsøget for at

mindske sandsynligheden for falske positive resultater. Overdødelighed er et klart tegn på, at der forekommer andre toksiske mekanismer. Tilsvarende tyder lette vækstreduktioner, som bestemmes af vådvægt og/eller SVL-længde også på toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Tilsyneladende vækststigninger observeres i almindelighed med kemikalier, som påvirker normal udvikling negativt. Som følge heraf viser forekomsten af større dyr ikke nødvendigvis toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Man bør imidlertid aldrig udelukkende basere sig på vækst for at bestemme toksicitet i skjoldbruskkirtlen. Vækst bør snarere bruges sammen med udviklingsstadium og histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen til at bestemme thyreoideaaktivitet. Andre endepunkter bør også inddrages ved bestemmelse af åbenlys toksicitet, herunder ødemer, hæmoragiske læsioner, sløvhed, nedsat fødeindtagelse, uregelmæssig/ændret svømmeadfærd osv. Viser alle testkoncentrationer tegn på åbenlys toksicitet, revurderes testkemikallet ved lavere testkoncentrationer, før det fastslås, om kemikallet er potentielt thyreoideaaktivt eller -inaktivt.

62. Statistisk signifikante udviklingsforsinkelser viser — i mangel af andre tegn på åbenlys toksicitet — at kemikallet er thyreoideaaktivt (antagonistisk). I mangel af stærke statistiske reaktioner kan dette resultat suppleres af resultater fra en histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen.

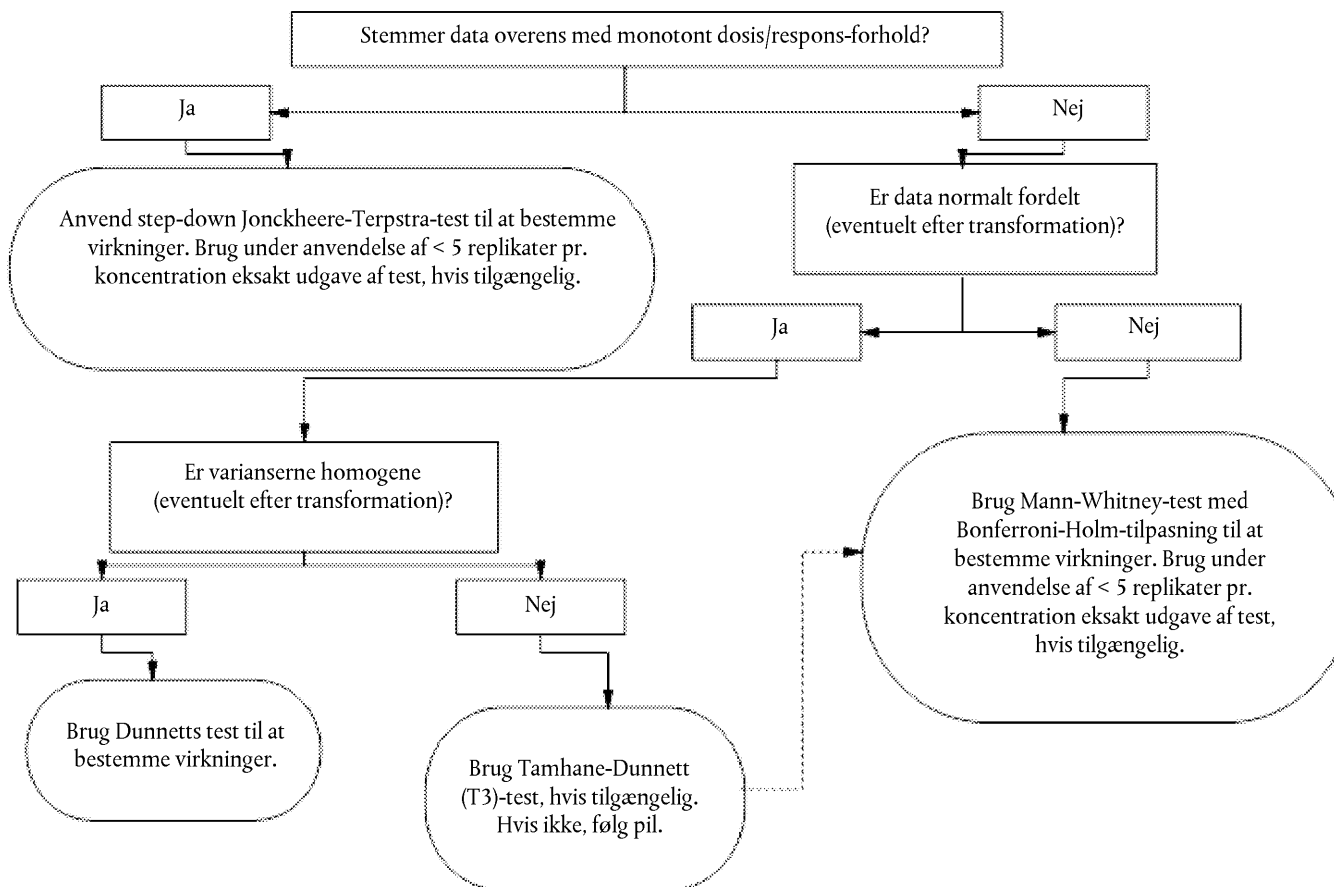
Statistiske analyser

63. Statistiske dataanalyser skal helst følge de procedurer, der er beskrevet i dokumentet *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). For alle kontinuerte kvantitative endepunkter (HLL, SVL, vådvægt), som er i overensstemmelse med en monoton dosisrespons, anvendes Jonckheere-Terpstra-testen på en nedadgående måde for at fastslå en signifikant behandlingseffekt.
64. For kontinuerte endepunkter, der ikke er i overensstemmelse med en monoton dosisrespons, vurderes dataene for normalitet (fortrinsvis ved hjælp af Shapiro-Wilk- eller Anderson-Darling-testen) og varianshomogenitet (fortrinsvis ved hjælp af Levene-testen). Begge test udføres på residualer fra en ANOVA. Ekspertvurderinger kan bruges i stedet for disse formelle test for normalitet og varianshomogenitet, selv om formelle test foretrækkes. Konstateres der ikkenormalitet eller variansheterogenitet, bør der søges en normaliserende, variansstabiliserende transformation. Hvis dataene (eventuelt efter en transformation) er normalt fordelt med homogen varians, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Dunnett's test. Hvis dataene (eventuelt efter en transformation) er normalt fordelt med heterogen varians, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Tamhane-Dunnett- eller T3-testen eller ved Mann-Whitney-Wilcoxon U-testen. Kan der ikke konstateres en normaliserende transformation, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Mann-Whitney-Wilcoxon U-testen ved hjælp af en Bonferroni-Holm-tilpasning til p-værdierne. Dunnett-testen anvendes uafhængigt af en ANOVA F-test, og Mann-Whitney-testen anvendes uafhængigt af en overordnet Kruskal-Wallis-test.
65. Signifikant dødelighed forventes ikke, men vurderes ved Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor dataene er i overensstemmelse med dosis/respons-monotoni og ellers ved Fisher's Exact-test med en Bonferroni-Holm-tilpasning.
66. En signifikant behandlingseffekt for udviklingsstadium bestemmes ved at anvende Jonckheere-Terpstra-testen på en nedadgående måde på replikaternes medianer. Alternativt, og fortrinsvis, anvendes Jonckheeres »multiquantal test« fra den 20. til den 80. percentil til bestemmelse af virkning, da den tager hensyn til ændringer i fordelingsprofilen.
67. Den rette analyseenhed er replikatet, så dataene består af medianer fra replikatet, hvis Jonckheere-Terpstra- eller Mann-Whitney U-testen benyttes, eller gennemsnit fra replikatet, hvis Dunnett's test benyttes. Dosis/respons-monotoni kan vurderes visuelt fra replikatet og middelværdierne for behandlingerne eller medianer eller fra formelle test som tidligere beskrevet (11). Med under fem replikater pr. behandling eller kontrolgruppe bør de nøjagtige permutationsversioner af Jonckheere-Terpstra- og Mann-Whitney-testene benyttes, hvis de er tilgængelige. Den statistiske signifikans af alle angivne test vurderes ved signifikansniveau 0,05.
68. Figur 4 er et flowdiagram for udførelse af statistiske test på kontinuerte data.

Figur 4

Flowdiagram over statistiske metoder for data om kontinuerlig respons

Flowdiagram for kontinuerlig respons



Særlige overvejelser over dataanalyse

Brug af kompromitterede behandlingsniveauer

69. Der skal tages hensyn til flere faktorer, når det bestemmes, om et replikat eller en hel behandling påviser åbenlys toksicitet og skal fjernes fra analysen. Åbenlys toksicitet defineres som en dødelighed > 2 i ethvert replikat, der kun kan forklares ved toksicitet snarere end teknisk fejl. Andre tegn på åbenlys toksicitet omfatter blødning, abnorm adfærd, abnorme svømmemønstre, anoreksi og andre kliniske sygdomstegn. For subletale tegn på toksicitet kan kvalitative vurderinger være nødvendige og skal altid foretages i forhold til kontrolgruppen med rent vand.

Opløsningsmiddelkontroller

70. Opløsningsmidler bør kun bruges som sidste udvej, når alle andre muligheder for kemikaliertilførsel er overvejet. Hvis der bruges et opløsningsmiddel, skal der samtidig være en kontrolgruppe med rent vand. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger. Dette sker ved en statistisk sammenligning af kontrolgruppen med opløsningsmiddel og kontrolgruppen med rent vand. De mest relevante endepunkter, der skal behandles i denne analyse, er udviklingsstadium, SVL og vådvægt, da disse kan påvirkes gennem former for toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Hvis der konstateres statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem kontrolgruppen med rent vand og kontrolgruppen med opløsningsmiddel, bestemmes undersøgelsens endepunkter for responsmålingerne ved hjælp af kontrolgruppen med rent vand. Hvis der ikke er nogen statistisk signifikant forskel mellem kontrolgruppen med rent vand og kontrolgruppen med opløsningsmiddel for alle målte responsvariable, bestemmes undersøgelsens endepunkter for responsmålingerne ved hjælp af det opsamlede fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontrollerne.

Behandlingsgrupper, som når udviklingsstadium 60 og derover

71. Efter stadium 60 er haletudsernes størrelse og vægt mindsket på grund af vævsresorption og reduktion af absolut vandindhold. Målinger af vådvægt og SVL kan således ikke bruges hensigtsmæssigt i statistiske analyser med henblik på forskelle i vækstrater. Derfor bør vådvægts- og længdedata fra organismer $> \text{NF60}$ bortensures og kan ikke bruges i analyser af gennemsnit eller medianer fra replikater. To forskellige metoder kan bruges til at analysere disse vækstrelaterede parametre.
72. En metode er kun at se på haletudser med udviklingsstadier under eller svarende til stadium 60 ved statistiske analyser af vådvægt og/eller SVL. Denne metode menes at give tilstrækkeligt fyldestgørende information om alvoren af mulige vækstvirkninger, så længe en lille del af forsøgsdyrene fjernes fra analyserne ($\leq 20\%$). Såfremt et øget antal haletudser udviser en udvikling over stadium 60 ($\geq 20\%$) i en eller flere nominelle koncentration(er), bør der foretages en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur på alle haletudser for at vurdere vækstvirkninger som følge af kemisk behandling, samtidig med at der tages hensyn til, hvordan udvikling i et sent stadium påvirker væksten. Tillæg 3 indeholder vejledning i tofaktor-ANOVA-analyse af vægt og længde.

LITTERATUR

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 76, Paris.
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 92, Paris.
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, Paris.

- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
 - (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX). E 1439-98
 - (7) M.D. Kahl, C.L. Russom, D.L. DeFoe og D.E. Hammermeister (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, s. 539-551
 - (8) P.D. Nieuwkoop og J. Faber (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
 - (10) M.H.I. Dodd og J.M. Dodd (1976) Physiology of Amphibia. B. Lofts (ed.), Academic Press, New York, s. 467-599
 - (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
 - (12) T.H. Hutchinson, N. Shillabeer, M.J. Winter og D.B. Pickford, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
-

Tillæg 1

Tabel 1

Forsøgsbetingelser for det 21 dage lange Amphibian Metamorphosis Assay

Forsøgsdyr	Xenopus laevis-larver	
Første larvestadium	Nieuwkoop og Faber stadium 51	
Eksponeringsperiode	21 dage	
Kriterier for udvælgelse af larver	Udviklingsstadium og samlet længde (valgfri)	
Testkoncentrationer	Minimum 3 koncentrationer, der spænder over ca. en størrelsesorden	
Eksponering	Gennemstrømning (foretrækkes) og/eller statisk udskiftning	
Testsystemets gennemstrømningshastighed	25 ml/min. (fuldstændig udskiftning af volumen ca. hver 2,7 time)	
Primære endepunkter / Bestemmelsesdage	Dødelighed	Dagligt
	Udviklingsstadium	D 7 og 21
	Baglemlængde	D 7 og 21
	Snude-gat-længde	D 7 og 21
	Kropsvægt (våd)	D 7 og 21
	Histologisk undersøgelse af thyreoidea	D 21
Fortyndingsvand / Laboratoriekontrol	Afkloret ledningsvand (trækulsfiltreret) eller tilsvarende laboratorie-kilde	
Larvetæthed	20 larver / testbeholder (5 / l)	
Testopløsning / Testbeholder	4-10 l (minimum 10-15 cm vand) / Testbeholder af glas eller rustfrit stål (f.eks. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Gengivelse	4 testbeholdere til replikat / testkoncentration og kontrolprøve	
Acceptabel dødelighed i kontrollerne	≤ 10 % pr. replikattestbeholder	
Fiksering af skjold-bruskkirtel	Fikseret antal	Alle haletudser (5/replikat vurderes først)
	Område	Hoved eller hele kroppen
	Fikseringsmiddel	Davidson's fikseringsmiddel

Fodring	Foder	Sera Micron® eller tilsvarende
	Mængde / Frekvens	Se tabel 1 for fodringhyppighed med Sera Micron®
Belysning	Lysperiode	12 timers lys: 12 timers mørke
	Intensitet	600-2 000 lux (målt ved vandoverfladen)
Vandtemperatur		22 ° ± 1 °C
pH		6,5-8,5
Koncentration af opløst ilt (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % luftmætning)
Tidsplan for kemiske analyseprøver		En gang om ugen (4 prøver pr. test)

Tillæg 2

Indberetningsskemaer til rådata og oversigtsdata

Tabel 1

Generelle oplysninger om testkemikalie

Kemisk information			
Indfør testkemikalie, koncentrationsenheder og behandlinger			
Testkemikalie:			
Koncentrationsenheder:			
Behandling 1			
Behandling 2			
Behandling 3			
Behandling 4			
Dato (dag 0):			Indfør dato (mm/dd/åå)
Dato (dag 7):			Indfør dato (mm/dd/åå)
Dato (dag 21):			Indfør dato (mm/dd/åå)

Tabel 2

Skemaer til indsamling af rådata for dag 7 og dag 21

DAG X

DATO 00/00/00

	Koncentration	Behandlings-nummer	Replikat-nummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklings-stadium	SVL-længde (mm)	Baglemlængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Koncentration	Behandlings-nummer	Replikat-nummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklings-stadium	SVL-længde (mm)	Baglemlængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Koncentration	Behandlings-nummer	Replikat-nummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklings-stadium	SVL-længde (mm)	Baglems-længde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Koncentration	Behandlings-nummer	Replikat-nummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklings-stadium	SVL-længde (mm)	Baglems-længde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Tabel 3

Beregnete oversigter for endepunktsdata fra dag 7 og dag 21

TRT	REP	Udviklingsstadium			SVL (mm)		Baglemlængde (mm)		Vægt (mg)	
		MIN	MEDIAN	MAX	GNSN	STD DEV	GNSN	STD DEV	GNSN	STD DEV
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindførsler i tabel 2

Tabel 4

Daglige data om dødelighed

Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Værdi!																
2	#Værdi!																
3	#Værdi!																
4	#Værdi!																
5	#Værdi!																
6	#Værdi!																
7	#Værdi!																
8	#Værdi!																
9	#Værdi!																
10	#Værdi!																
11	#Værdi!																
12	#Værdi!																
13	#Værdi!																
14	#Værdi!																
15	#Værdi!																
16	#Værdi!																
17	#Værdi!																
18	#Værdi!																
19	#Værdi!																
20	#Værdi!																
21	#Værdi!																
Optælling af replikater		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Optælling af behandlinger		0				0				0				0			

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindsførsler i tabel 1.

Tabel 5

Vandkvalitetskriterier

Eksporeringsystem (gennemstrømning/statisk udskiftning):	
Temperatur:	
Lysintensitet:	
Lys-/mørkecyklus:	
Foder:	
Fodermængde:	
Vandets pH:	
Iodkoncentration i testvandet:	

Tabel 6

Oversigt over kemiske data

Kemisk navn:																							
Cas #:																							
Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
0	00/00/00																						
1	#Værdi!																						
2	#Værdi!																						
3	#Værdi!																						
4	#Værdi!																						
5	#Værdi!																						

Kemisk navn:																							
Cas #:																							
Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
6	#Værdi!																						
7	#Værdi!																						
8	#Værdi!																						
9	#Værdi!																						
10	#Værdi!																						
11	#Værdi!																						
12	#Værdi!																						
13	#Værdi!																						
14	#Værdi!																						
15	#Værdi!																						
16	#Værdi!																						
17	#Værdi!																						
18	#Værdi!																						
19	#Værdi!																						
20	#Værdi!																						
21	#Værdi!																						

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindførsler i tabel 1.

Tabel 7

Indberetningsskemaer vedrørende histopatologi for centrale kriterier

Dato:

Kemikalie:

Patolog:

i alt:	Kontrol­dyr ID — replikat 2	Kontrol­dyr ID — replikat 1			Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)
					Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)
					Follikelcellehypertrofi
					Follikelcellehyperplasi

[illegible]

i alt:	Dosis dyr ID — replikat 2		Dosis dyr ID — replikat 1				
							Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)
							Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)
							Follikelcellehypertrofi
							Follikelcellehyperplasi

i alt:	Dosis dyr ID — replikat 2		Dosis dyr ID — replikat 1				
							Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)
							Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)
							Follikelcellehypertrofi
							Follikelcellehyperplasi

Tabel 8

Supplerende histopatologiske kriterier

Dato:

Kemikalie:

Patolog:

					Follikulært lumenområde stigning	Follikulært lumenområde fald
Kontrol dyr ID — replikat 1						
Kontrol dyr ID — replikat 2						
i alt:						

		Follikulært lumenområde stigning					Follikulært lumenområde fald				
Dosis dyr ID — replikat 1											
Dosis dyr ID — replikat 2											
i alt:											

		Follikulært lumenområde stigning					Follikulært lumenområde fald				
Dosis dyr ID — replikat 1											
Dosis dyr ID — replikat 2											
i alt:											

							Follikulært lumenområde stigning		Follikulært lumenområde fald	
Dosis dyr ID — replikat 1										
Dosis dyr ID — replikat 2										
i alt:										

Tabel 9

Forklarende beskrivelser for histopatologiske fund

Dato:

Kemikalie:

Patolog:

Forklarende beskrivelse

Kontrol dyr ID — replik 1		
Kontrol dyr ID — replik 2		
Dosis dyr ID — replik 1		
Dosis dyr ID — replik 2		

Dosis dyr ID — replik 1		
Dosis dyr ID — replik 2		
Dosis dyr ID — replik 1		
Dosis dyr ID — replik 2		

Tabel 10

Oversigt over skabelon til indberetningsskema for dag x (7 eller 21) i AMA

		Kontrol				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
Endepunkt	Replikat	Midd- el	SD	VK	N	Midd- el	SD	VK	N	p-værdi	Midd- el	SD	VK	N	p-værdi	Midd- el	SD	VK	N	p-værdi
Baglem Længde (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			
Vådvægt (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			

Tabel 11

Oversigt over skabelon til indberetningsskema for dag x (7 eller 21) udviklingsstadiedata for AMA

		Kontrol				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
	Replikat	Median	Min	Max	N	Median	Min	Max	N	p-værdi	Median	Min	Max	N	p-værdi	Median	Min	Max	Median	p-værdi
Udviklingssta- die	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			

Tillæg 3

Alternativ analyse af vægt og længde i tilfælde af, at sen stadiudvikling gælder for over 20 % af haletudserne i en eller flere koncentration(er)

Såfremt et relativt stort antal haletudser udviser en udvikling over stadium 60 (≥ 20 %) i en eller flere nominelle koncentration(er), bør der foretages en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur på alle haletudser for at vurdere vækstvirkninger som følge af kemisk behandling, samtidig med at der tages hensyn til, hvordan udvikling i et sent stadium påvirker væksten.

Det foreslås at bruge alle data, men tage hensyn til virkningen af udvikling i et sent stadium. Dette kan gøres med en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur. Definer SentStadie=»Ja« for et dyr, hvis dets udviklingsstadium er 61 eller derover. Ellers definer SentStadie=»Nej«. Herefter kan der foretages en tofaktor-ANOVA med koncentration og SentStadie og deres vekselvirkning med Rep(Konc) en vilkårlig faktor og Haletudse(Rep) en anden vilkårlig virkning. Dette behandler stadig replikatet som analyseenheden og giver i al væsentlighed de samme resultater som en vægtet analyse af rep*sentstadie-gennemsnit, vægtet med antallet af dyr pr. gennemsnit. Hvis dataene ikke opfylder ANOVA's normalitets- eller varianshomogenitetskrav, kan der foretages en normaliseret rangordenstransformation for at fjerne denne indsigelse.

Ud over standard-ANOVA F-test for virkningerne af Conc, SentStadie og vekselvirkningerne mellem dem, kan vekselvirknings-F-testen »deles« i to supplerende ANOVA F-test, en vedrørende de gennemsnitlige responser på tværs af koncentrationer for SentStadie=»Nej« og en anden vedrørende gennemsnitsresponserne på tværs af koncentrationer for SentStadie=»Ja«. Yderligere sammenligninger af middelværdier for behandlingen i forhold til kontroller foretages inden for hvert enkelt SentStadie-niveau. En tendestypeanalyse kan foretages ved hjælp af passende kontraster, eller der kan foretages simple parvise sammenligninger, hvis der er evidens for ikkemonoton dosisrespons inden for et niveau af SentStadie-variabel. En Bonferroni-Holm-tilpasning til p-værdierne foretages kun, hvis den tilsvarende F-skive ikke er signifikant. Dette kan gøres i SAS og — formentlig — andre statistiske softwarepakker. Der kan opstå komplikationer, når der i nogle koncentrationer ikke er dyr i et sent stadium, men disse situationer kan håndteres på en enklere måde.

*Tillæg 4***Definitioner**

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

C.39. COLLEMBOLFORMERINGSTEST I JORD

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 232 (2009). Denne testmetode er designet til at vurdere virkningerne af kemikalier på collembolers (springhalers) formeringsevne i jord. Den er baseret på eksisterende procedurer (1) (2). Den partenogenetiske *Folsomia candida* og seksuelt reproducerende *Folsomia fimetaria* er to af de mest tilgængelige collembolararter, og de kan dyrkes og kan fås i handelen. Når specifikke habitater, som ikke er dækket af de to arter, skal vurderes, kan fremgangsmåden også udvides til andre collembolararter, hvis de kan opfylde testens validitetskriterier.
2. Jordboende collemboler er økologisk relevante arter til økotoxikologiske test. Collemboler er heksapoder med et tyndt luft- og vandgennemtrængeligt exoskelet og repræsenterer leddyrarter med en anden eksponeringsvej og grad sammenlignet med regnorme og enchytraeider.
3. Collembolers populationstætheder når i almindelighed op på 10^5 m^{-2} i jord- og førnlag i mange terrestriske økosystemer (3) (4). Voksne individer måler typisk 0,5-5 mm, og deres bidrag til den samlede jordbaserede animalske biomasse og respiration er lavt, anslået 1-5 % (5). Deres vigtigste rolle kan derfor være som potentielle regulatorer af processer gennem mikrobe- og mikrofaunaprædation. Springhaler er byttedyr for en bred vifte af hvirvelløse dyr under og over jorden såsom mider, tusindben, edderkopper, løbebiller (*Carabidae*) og rovbiller. Collemboler bidrager til nedbrydningsprocesser i sur jordbund, hvor de kan være de vigtigste jordlevende hvirvelløse dyr ud over enchytraeider, eftersom regnorme og diplopoder normalt er fraværende.
4. *F. fimetaria* findes i hele verden og er almindelig i flere jordtyper fra sandede til lerede jorde og fra muld- til morjorde. Det er en øjeløs upigmenteret collembol. Den er registreret i landbrugsjorde over hele Europa (6). Den er altædende og spiser bl.a. svampehyfer, bakterier, protozoer og affald i sin føde. Den interagerer gennem græsning med infektioner af plantepatogene svampe (7) og kan påvirke mykorrhiza, som det vides at være tilfældet for *F. candida*. Som de fleste collembolararter formerer den sig seksuelt, hvilket kræver en permanent tilstedeværelse af hanner til befrugtning af æg.
5. *F. candida* findes også i hele verden. Skønt den ikke er almindelig i de fleste naturlige jorde, forekommer den ofte i meget høje antal på humusrige steder. Det er en øjeløs upigmenteret collembol. Den har en veludviklet »furca« (springorgan) og en aktiv løbebevægelse og springer let, hvis den forstyrres. *F. candida*'s økologiske rolle ligner *F. fimetaria*'s, men habitaterne er rigere på organisk materiale. Den har partenogenetisk formering. Hanner kan forekomme med under en pr. tusind.

PRINCIP FOR TESTEN

6. Synkrone voksne collemboler (*F. fimetaria*) eller collembolyngel (*F. candida*) eksponeres for en række koncentrationer af testkemikaliets blandet i en modificeret syntetisk jord (8) med et indhold på 5 % organisk stof (eller en alternativ jord). Testscenariet kan inddeles i to trin:
 - en forberedende test, såfremt der ikke foreligger tilstrækkelig information om toksicitet, hvor dødelighed og reproduktion er de vigtigste endepunkter, der vurderes efter to uger for *F. fimetaria* og tre uger for *F. candida*
 - en endelig reproduktionstest, hvor den samlede mængde afkom frembragt af forældredyr og forældredyrenes overlevelse vurderes. Denne endelige test varer tre uger for *F. fimetaria* eller fire uger for *F. candida*.

Testkemikaliets toksiske virkning på voksnes dødelighed og formeringsevne udtrykkes som LC_x og EC_x ved at tilpasse dataene til en passende model ved ikke-lineær regression for at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage henholdsvis en dødelighed eller et fald i formeringsevne på x % eller alternativt som NOEC-/LOEC-værdi (9).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Testkemikaliets fysiske egenskaber, vandopløselighed, K_{ow} , fordelingskoefficient mellem jord og vand og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord, såsom fotolyse- og hydrolysehastigheder, og biotisk nedbrydning er ønskelige. Kemisk identifikation af testkemikaliets ifølge IUPAC-nomenklaturen, CAS-nummer, parti, batch, strukturformel og renhed dokumenteres, når det foreligger.
8. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilsætningsmåden for testkemikaliets variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-vandfordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

TESTENS VALIDITET

9. Følgende kriterier skal opfyldes i de ubehandlede kontroller, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:
 - Den gennemsnitlige dødelighed blandt voksne individer må ikke overstige 20 % ved testens afslutning.
 - Det gennemsnitlige antal unge individer pr. beholder bør være mindst 100 ved forsøgets afslutning.
 - Variationskoefficienten beregnet for antal unge individer bør være under 30 % ved afslutningen af den endelige test.

REFERENCEKEMIKALIE

10. Et referencekemikalie bør med jævne mellemrum testes ved sin EC_{50} -koncentration for den valgte prøvejordtype eller muligvis inkluderes i hver test for at kontrollere, at testorganismerne i testsystemet ligger inden for det normale niveau. Et egnet referencekemikalie er borsyre, som bør nedbringe formeringsevnen med 50 % (10) (11) ved omkring 100 mg pr. kg jord (tørvægt) for begge arter.

BESKRIVELSE AF TESTEN

Testbeholdere og -udstyr

11. Beholdere, som kan rumme 30 g fugtig jord, er egnede testbeholdere. Materialet bør enten være glas eller inert plast (ikketoksisk). Det bør dog undgås at bruge plastbeholdere, hvis eksponeringen for testkemikaliets sænkes på grund af sorption. Testbeholderne bør have et tværsnitsareal, som giver en faktisk jorddybde i testbeholderen på 2-4 cm. Beholderne bør have låg (f.eks. glas eller polyethylen), der er designet til at reducere vandfordampning, samtidig med at der kan ske en gasudveksling mellem jord og atmosfære. Beholderen bør i det mindste være delvis gennemslæbende for at sikre lysgennemtrængelighed.
12. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:
 - tørreskab
 - stereomikroskop
 - pH-meter and luxmeter
 - egnede nøjagtige vægte
 - passende udstyr til temperaturkontrol
 - passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne er dækket af låg)
 - temperaturstyret inkubator eller lille rum
 - pincetter eller en lavtsugende luftgennemstrømningsanordning.

Fremstilling af testjord

13. Der anvendes en modificeret syntetisk jord (8) med et indhold af organisk materiale på 5 %. Alternativt kan der anvendes en naturlig jord, da den syntetiske jord ikke ligner naturlige jordtyper. Den anbefalede sammensætning af den syntetiske jord er som følger (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):
 - 5 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel)
 - 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit
 - ca. 74 % lufttørret industrisand (afhængigt af den nødvendige mængde CaCO_3) overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm . Den nøjagtige mængde sand afhænger af mængden af CaCO_3 (se nedenfor), idet de til sammen skal ligge på 75 %.
 - 1,0 % calciumcarbonat (CaCO_3 , pulveriset, analysekvalitet) for at få en pH-værdi på $6,0 \pm 0,5$. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art (se bemærkning 1).

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde CaCO_3 vil afhænge af jordsubstratets bestanddele og bestemmes ved at måle pH-værdien af præinkuberede fugtige delprøver af jord umiddelbart før testen.

Bemærkning 2: Det anbefales at måle pH-værdi og eventuelt C/N-forhold, kationudvekslingskapacitet (CEC) og indhold af organisk materiale i jorden for at sikre en normalisering på et senere tidspunkt og fortolke resultaterne bedre.

Bemærkning 3: Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlig jord fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssubstrat. Anvendes der naturlig jord, bør det dog som minimum karakteriseres ved oprindelse (indsamlingssted), pH, tekstur (partikelstørrelsesfordeling), CEC og indhold af organisk materiale, og det bør være uden forurening. For naturlig jord anbefales det at påvise dens egnethed til en test og til at opfylde testvaliditetskriterierne, før jorden anvendes i en endelig test.

14. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratoriemixer). Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 5. Testjordens fugtindhold optimeres for at opnå en løs porøs jordstruktur, så collemboleerne kan komme ind i porerne. Dette er normalt mellem 40-60 % af den maksimale vandholdende evne.
15. Den tørre syntetiske jord fugtes på forhånd ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold 2-7 dage før testens start med henblik på at ækvilibrere/stabilisere surhedsgraden. Til bestemmelse af pH-værdien anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid (CaCl_2) i forholdet 1:5 (ifølge tillæg 6). Hvis jorden er mere sur end det krævede område, kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde CaCO_3 . Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af en uorganisk syre, der ikke skader collemboleer.
16. Den fugtede jord opdeles i portioner svarende til antallet af testkoncentrationer (og eventuelt referencekemikalie) og kontroller, der benyttes til testen. Testkemikalierne tilsættes, og vandindholdet reguleres ifølge punkt 24.

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

17. Den partenogenetiske *F. candida* er den anbefalede art, da denne art i ringtesten af testmetoden (11) opfyldte validitetskriterierne for overlevelse oftere end *F. fimetaria*. Anvendes der en alternativ art, skal den opfylde de i punkt 9 anførte validitetskriterier. Ved testens begyndelse skal dyrene være godt opfodrede og være 23-26 dage for *F. fimetaria* og 9-12 dage for *F. candida*. For hvert replikat bør der for *F. fimetaria* være 10 hanner og 10 hunner, og for *F. candida* anvendes 10 hunner (se tillæg 2 og tillæg 3). De synkrone dyr udvælges tilfældigt fra skålene, og deres sundhed og fysiske tilstand kontrolleres for hvert parti, der tilsættes et replikat. Hver gruppe på 10/20 individer tilsættes til en tilfældigt udvalgt testbeholder, og de store hunner af *F. fimetaria* udvælges for at sikre en korrekt skelen fra *F. fimetaria*-hanner.

Fremstilling af testkoncentrationer

18. Der kan benyttes fire metoder til tilsætning af testkemikaliet: 1) blanding af testkemikaliet i jorden med vand som bærestof, 2) blanding af testkemikaliet i jorden med et organisk opløsningsmiddel som bærestof, 3) blanding af testkemikaliet i jorden med sand som bærestof eller 4) påføring af testkemikaliet på jordoverfladen. Valget af den egnede metode afhænger af kemikaliet's kendetegn og formålet med testen. Generelt anbefales det at blande testkemikaliet i jorden. Tilførselsprocedurer, som er i overensstemmelse med den praktiske anvendelse af testkemikaliet, kan dog være påkrævet (f.eks. sprøjtning af flydende formulering eller brug af særlige pesticid-formuleringer såsom granulat- eller frøbehandlinger). Jorden behandles, før collembolerne tilsættes, undtagen når testkemikaliet tilsættes til jordoverfladen, hvor collembolerne skal have lov til at komme ned i jorden.

Vandopløseligt testkemikalie

19. En opløsning af testkemikaliet fremstilles i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Hver opløsning af testkemikaliet blandes grundigt med et parti fugtet jord, før det indføres i testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliet opløses i den mindst mulige mængde egnede opløsningsmiddel (f.eks. acetone), idet der stadig sikres en korrekt blanding af kemikaliet i jorden og blanding heraf med en del af det nødvendige kvartssand. Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Når der anvendes et organisk opløsningsmiddel, bør alle testkoncentrationer og ekstra negative kontrolprøver med opløsningsmiddel indeholde den samme minimumsmængde opløsningsmiddel. Tilførselsbeholdere bør efterlades uåbne i en vis periode, så det opløsningsmiddel, som er knyttet til tilførsel af testkemikaliet, kan fordampe, så det sikres at det giftige kemikalie ikke spredes i den tid.

Testkemikalie, der er tungtopløseligt i vand og organiske opløsningsmidler

21. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes kvartssand, som skal være en del af den samlede mængde sand, der tilsættes jorden, med mængden af testkemikalie for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding deles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der fremstilles også en passende kontrolgruppe.

Påføring af testkemikaliet på jordoverfladen

22. Når testkemikaliet er et pesticid, kan det være hensigtsmæssigt at sprøjte det på jordoverfladen. Jorden behandles, efter at collembolerne er tilsat. Testbeholderne fyldes først med det fugtede jordsubstrat, og dyrene tilsættes. Herefter vejes testbeholderne. For at undgå en direkte eksponering af dyrene for testkemikaliet ved direkte kontakt påføres testkemikaliet mindst en halv time efter indførelsen af collembolerne. Testkemikaliet påføres så jævnt som muligt på jordoverfladen ved hjælp af en egnet laboratoriesprøjteanordning for at simulere sprøjteanvendelse i marken. Påføringen finder sted ved en temperatur inden for en variation på $\pm 2^\circ\text{C}$ og for vandige opløsninger, emulsioner eller spredninger ved en vandtilførselshastighed ifølge henstillinger om risikovurdering. Hastigheden kontrolleres ved hjælp af en egnet kalibreringsteknik. Særlige formuleringer som granulat- eller frøblandinger kan påføres på en måde, der er i overensstemmelse med praksis i landbruget. Foder tilsættes efter påsprøjtning.

FREMGANGSMÅDE**Testbetingelser:**

23. Den gennemsnitlige testtemperatur skal være $20 \pm 1^\circ\text{C}$ med et temperaturområde på $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 12 timers lys og 12 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholderens område.

24. For at kontrollere jordfugtigheden vejes beholderne i begyndelsen, i midten og ved afslutningen af testen. Vægttab på > 2 % erstattes ved tilsætning af deioniseret vand. Det skal bemærkes, at tab af vand kan reduceres ved at opretholde en høj luftfugtighed (> 80 %) i testinkubatoren.
25. pH-værdien måles i begyndelsen og afslutningen af både den forberedende test og den endelige test. Målinger foretages i en ekstra kontrolprøve og en ekstra prøve på de behandlede (alle koncentrationer) jordprøver, der fremstilles og opbevares på samme måde som testkulturerne, men uden tilsætning af collembolerne.

Testprocedure og målinger

26. For hver testkoncentration fyldes en mængde testjord svarende til 30 g våd vægt i testbeholderen. Vandkontroller uden testkemikaliets fremstilles også. Hvis der bruges et bærestof til tilførsel af testkemikaliets, testes en kontrolserie indeholdende bærestoffet alene ud over testserierne. Koncentrationen med opløsnings- eller dispergeringsmiddel skal være den samme som den, der bruges i testbeholderne med testkemikaliets.
27. De enkelte springhaler overføres forsigtigt til hver testbeholder (fordeles tilfældigt i testbeholderne) og placeres på jordoverfladen. For at sikre en effektiv overførsel af dyrene kan der benyttes en lavtsugende luftgennemstrømningsanordning. Antallet af replikater til testkoncentrationer og kontroller afhænger af det anvendte testdesign. Testbeholderne placeres tilfældigt i testinkubatoren, og disse placeringer randomiseres på ny en gang om ugen.
28. Til *F. fimetaria*-testen bruges 10 hanner og 10 hunner, 23-26 dage gamle, pr. testbeholder. På dag 21 ekstraheres collembolerne fra jorden og tælles. For *F. fimetaria* skelnes kønnene efter størrelse i det synkroniserede parti dyr, der bruges til testen. Hunner er klart større end hanner (se tillæg 3).
29. Til *F. candida*-testen bruges der ti 9-12 dage gamle unge individer pr. testbeholder. På dag 28 ekstraheres collembolerne fra jorden og tælles.
30. Som egnet fødekilde tilsættes en tilstrækkelig mængde, f.eks. 2-10 mg kommercielt tilgængeligt granuleret bagetørgær til husholdningsbrug, til hver beholder ved begyndelsen af testen og efter omkring to uger.
31. Ved afslutningen af testen vurderes dødelighed og formering. Efter tre uger (*F. fimetaria*) eller fire uger (*F. candida*) ekstraheres collembolerne fra testjorden (se tillæg 4) og tælles (12). En collembol registreres som død, hvis den ikke er til stede i ekstraktionen. Ekstraktions- og tællemetoden valideres. Validiteten omfatter en større ekstraktionseffektivitet for afkom end 95 %, f.eks. ved at tilføre jorden et kendt antal.
32. Praktisk resumé og tidsplan for testmetoden er beskrevet i tillæg 2.

Testdesign

Indledende test til bestemmelse af dosisinterval

33. Når det er nødvendigt, udføres der en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100, og 1 000 mg/kg jord (tørvægt) og to replikater for hver behandlings- og kontrolprøve. Supplerende information — fra test med lignende kemikalier eller fra litteraturen — om collembolers dødelighed eller formeringsevne kan også være nyttig ved beslutningen af, hvilke koncentrationsområder der skal benyttes i den indledende test til bestemmelse af dosisinterval.
34. Varigheden af den indledende test til bestemmelse af dosisinterval er to uger for *F. fimetaria* og tre uger for *F. candida* for at sikre, at der er frembragt et kuld unger. Ved afslutningen af testen vurderes collembolernes dødelighed og formering. Antallet af voksne og forekomsten af afkom registreres.

Endelig test

35. For at bestemme EC_x -værdien (f.eks. EC_{10} , EC_{50}) testes der 12 koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentrationsbehandling og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere alt efter dosis/respons-mønstret.
36. For at bestemme NOEC/LOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentrationsbehandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.
37. En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC/LOEC og EC_x . Til denne kombinerede metode anvendes der otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.
38. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til fastlæggelse af dosisområdet (dvs. 1 000 mg/kg), kan formeringstesten udføres som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg og kontrolprøven. En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at der ikke er nogen statistisk signifikant virkning ved grænsekoncentrationen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrolprøven.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

39. Formeringsevnen er det vigtigste endepunkt (f.eks. antallet af unge individer produceret pr. testbeholder). Den statistiske analyse, f.eks. ANOVA-procedurer, sammenligner behandlinger med Student t-test, Dunnett's test eller Williams' test. Der beregnes 95 %-konfidensintervaller for individuelle middelværdier for behandling.
40. Antallet af overlevende voksne individer i de ubehandlede kontroller er et væsentligt validitetskriterium og skal dokumenteres. Som i testen til fastlæggelse af dosisområdet skal alle andre tegn på skadevirkninger også anføres i den endelige rapport.

 LC_x og EC_x

41. EC_x -værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for parameteren beregnes efter passende statistiske metoder (f.eks. logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Kärber-metoden eller simpel interpolation). En EC_x -værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x underkastes hele datasættet en regressionsanalyse. LC_{50} anslås normalt ved probabilistisk analyse eller lignende analyse, der tager hensyn til de binomialfordelte dødelighedsdata.

NOEC/LOEC

42. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved en statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Passende statistiske metoder anvendes i overensstemmelse med OECD Document 54 on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (9). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliets sammenlignet med kontrolprøverne ved hjælp af en ensidet hypotesetest ved $p \leq 0,05$.
43. Normal fordeling og varianshomogenitet kan testes ved hjælp af en passende statistisk test, f.eks. henholdsvis Shapiro-Wilk-testen og Levene-testen ($p \leq 0,05$). Der kan udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Multiple sammenligninger (f.eks. Dunnett's test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Document 54 (9)). Ellers kan ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstra's trend test) benyttes til at bestemme NOEC og LOEC.

Grænsetest

44. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrolprøve og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.
45. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrolprøver og kontrolprøver med opløsningsmiddel) kan replikaterne af hver kontrolprøve testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrolprøver og kontrolprøver med opløsningsmiddel samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med kontrolprøven med opløsningsmiddel.

Testrapport

46. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

- testkemikaliet identitet, parti, batch- og CAS-nummer, renhed
- testkemikaliet fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. log Kow, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og gerne oplysninger om testkemikaliet skæbne i jord), hvis de foreligger
- formuleringen af testkemikaliet og tilsætningsstofferne specificeres, medmindre det rene kemikalie testes

Testorganismer

- identifikation af arter og leverandør af testorganismerne, beskrivelse af opdrætningsbetingelser og testorganismernes aldersgruppe

Testbetingelser:

- beskrivelse af forsøgsdesign og procedure
- oplysninger om fremstilling af testjorden, detaljeret specifikation, hvis der bruges naturlig jord (oprindelse, historie, partikelstørrelsesfordeling, pH, indhold af organisk stof)
- jordens vandholdende evne
- beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilsætte testkemikaliet til jorden
- testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklusernes varighed, temperatur
- en beskrivelse af fodringhyppighed, type og mængde af foder anvendt i testen, fodringsdatoer
- jordens pH-værdi og vandindhold ved påbegyndelse og afslutning af testen (kontrolprøve og hver behandling)
- detaljeret beskrivelse af ekstraktionsmetode og ekstraktionseffektivitet.

Testresultater

- antal unge individer bestemt i hver testbeholder ved afslutningen af testen
- antal voksne individer og deres dødelighed (%) i hver testbeholder ved afslutningen af testen
- en beskrivelse af synlige fysiologiske eller patologiske symptomer eller tydelige adfærdssændringer
- resultater opnået med referencetestkemikaliet
- NOEC-/LOEC-værdier, LC_x for dødelighed og EC_x for formeringsevne (fortrinsvis LC₅₀, LC₁₀, EC₅₀ og EC₁₀) sammen med 95 % konfidensintervaller. En graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning, dens funktionsligning og parametre (se (9))

- alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne
- styrken af den konkrete test, hvis der afprøves hypoteser (9)
- afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelt usædvanlige hændelser under testen
- testens validitet
- når NOEC anslås, den mindste påviselige forskel.

LITTERATUR

- (1) J.A. Wiles og P.H. Krogh (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (red. H Løkke og C.A.M. Van Gestel), s. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. Den Internationale Standardiseringsorganisation (ISO), Geneve
- (3) A. Burges og F. Raw (red.) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) H. Petersen og M. Luxton (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388
- (5) H. Petersen (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118
- (6) S.P. Hopkin (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 s. (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) B. Ulber (1983) Einfluss von *Onychiurus fimeatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow, einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Ph. Lebrun, H.M. André, A. De Medts, Grégoire-Wibo, G. Wauthy (red.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgien), 30. august-2. september 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261-268
- (8) Kapitel C.36 i dette bilag, Rovmide (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) — formeringstest i jord.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) J.J. Scott-Fordsmand og P.H. Krogh (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen s. 61 ff. Det danske Miljøministerium.
- (11) P.H. Krogh, 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Miljøstyrelsen, Environmental Project No. 1256, s. 66.
- (12) P.H. Krogh, K. Johansen og M. Holmstrup (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205
- (13) A. Fjellberg (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) C.A. Edwards (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. I Soil Zoology (D.K. Kevan McE., red.). Butterworths, London, s. 412-416
- (15) H.E. Goto (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner finder anvendelse for denne testmetode (i denne test udtrykkes alle virksomme koncentrationer som en masse af testkemikalie pr. tør masse testjord):

Kemikalie: et stof eller en blanding.

NOEC (nuleffekt-koncentration, no observed effect concentration): den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har den koncentration, der svarer til NOEC, ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med kontrolprøven.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, lowest observed effect concentration): den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrolprøven har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode.

ECx (effekt-koncentration for x % virkning): den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrolprøve. EC₅₀ er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på et testdepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Tillæg 2

De vigtigste trin og tidsplan for udførelse af en collemboltest

De enkelte trin i testen kan opsummeres som følger:

Time (day)	Handling
– 23 til – 26	Fremstilling af synkron <i>F. fimetaria</i> -kultur.
– 14	Fremstil syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele). Kontroller den syntetiske jords pH og foretag relevante justeringer. Mål jordens maksimale vandholdende evne.
– 9 til – 12	Fremstilling af synkron <i>F. candida</i> -kultur.
– 2 til – 7	Fugt jorden.
– 1	Fordel unge individer i partier. Fremstil stamopløsninger og tilsæt testkemikalie, hvis der er brug for opløsningsmiddel.
0	Fremstil stamopløsninger, og tilsæt testkemikalie, hvis fast kemikalie, vandopløseligt, eller overflade-påføring er nødvendig. Mål jordens pH, og vej beholderne. Tilsæt foder. Anbring collemboler.
14	Indledende test til bestemmelse af dosisinterval for <i>F. fimetaria</i> : Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt). Endelige test: Mål fugtindhold, fyld op med vand, og tilsæt 2-10 mg gær.
21	Endelig <i>F. fimetaria</i> -test: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt). Indledende test til bestemmelse af dosisinterval for <i>F. candida</i> : Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt).
28	Endelig <i>F. candida</i> -test: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt).

Tillæg 3

Vejledning i opdræt og synkronisering af *F. fimetaria* og *F. candida*

Tid og varigheder i denne vejledning kontrolleres for hver specifik collembolstamme for at sikre, at tidsangivelserne vil give et tilstrækkeligt antal synkroniserede unge individer. Grundlæggende er det forekomsten af æglægning, efter at de voksne individer er overført til frisk substrat, og udklækning af æg, som afgør, hvilken dag der er den rette til udtagning af æg og udtagning af synkrone unge individer.

Det anbefales at have en fast stamkultur bestående af f.eks. 50 beholdere/petriskåle. Stamkulturen holdes i god foderstand gennem ugentlig fodring, vanding og fjernelse af gammelt foder og kadavere. For få collemboler på substratet kan resultere i inhibering af mere svampevækst. Bruges stamkulturen til ægproduktion for ofte, kan kulturen blive træt. Tegn på træthed er døde voksne individer og mug på substratet. De resterende æg fra produktionen af synkrone dyr kan bruges til at forynge kulturen.

I en synkron *F. fimetaria*-kultur skelnes hanner fra hunner primært på baggrund af størrelse. Hanner er klart mindre end hunner, og hanners ganghastighed er højere end hunners. En korrekt udvælgelse af køn kræver ikke meget øvelse og kan bekræftes ved mikroskopisk inspektion af det genitale område (13).

1. Opdræt**1.a. Fremstilling af dyrkningssubstrat**

Dyrkningssubstratet er gips (calciumsulfat) med aktiveret kul. Dette giver et fugtigt substrat, idet kullets funktion er at absorbere spildgasser og ekskreter (14) (15). Forskellige former for kul kan bruges til at lette observationerne af collembolerne. F.eks. bruges kulpulver til *F. candida* og *F. fimetaria* (som giver en sort/grå gips):

Substratets bestanddele:

- 20 ml aktiveret kul
- 200 ml destilleret vand
- 200 ml gips

eller

- 50 g aktiveret pulveriseret kul
- 260-300 ml destilleret vand
- 400 g gips

Substratblandingen sætter sig før brug.

1.b. Avl

Collemboler opbevares i beholdere, f.eks. petriskåle (90 mm × 13 mm), hvor bunden er dækket af et 0,5 m lag gips-/kuls substrat. De dyrkes ved 20 ± 1 °C ved en lys-/mørkecyklus på 12-12 timer (400-800 Lux). Beholderne holdes fugtige hele tiden, idet det sikres, at den relative luftfugtighed i beholderne er 100 %. Dette kan sikres ved, at der er frit vand i den porøse gips, idet det undgås at skabe en vandfilm på gipsoverfladen. Vandtab kan forebygges ved fugtighed i den omgivende luft. Eventuelle døde individer og eventuel muggen føde fjernes fra beholderne. For at fremme ægproduktionen er det nødvendigt at overføre voksne dyr til petriskåle med nyfremstillet gips-/kuls substrat.

1.c. Fødekilde

Granuleret tørgær til bagning bruges som det eneste foder til både *F. candida* og *F. fimetaria*. Frisk foder gives en eller to gange om ugen for at undgå mugdannelse. Det lægges direkte på gipsen i en lille dyng. Massen af den tilsatte bagegær justeres til størrelsen af collembolpopulationen, men som regel er 2-15 mg tilstrækkeligt.

2. Synkronisering

Testen udføres med synkroniserede dyr for at opnå homogene forsøgsdyr på samme stadium og i samme størrelse. Endvidere gør synkroniseringen det muligt at skelne *F. fimetaria*-hanner og -hunner fra 3-ugers alderen og frem baseret på den seksuelle dimorfi, dvs. størrelsesforskelle. Nedenstående procedure er et forslag til, hvordan man kan få synkroniserede dyr (den praktiske fremgangsmåde er valgfri).

2.a. Synkronisering.

- Beholderne klargøres med et lag på 0,5 cm gips-/kuls substrat.
- Til æglægning overføres 150-200 voksne *F. fimetaria* og 50-100 *F. candida* fra de bedste 15-20 stamkultur-beholdere med 4-8 uger gammelt substrat til beholderne og fodres med 15 mg bagegær. Det undgås at bringe unge individer sammen med voksne, da tilstedeværelsen af unge kan hæmme ægproduktionen.
- Kulturen holdes på 20 ± 1 °C (gennemsnittet er 20 °C) og en lys-/mørkecyklus på 12-12 timer (400-800 Lux). Det sikres, at der er frisk føde tilgængelig, og at luften er vandmættet. Manglende føde kan føre til, at dyrene lægger afføring på æggene, hvilket resulterer i svampevækst på æggene, eller *F. candida* kan æde sine egne æg. Efter 10 dage indsamles æggene forsigtigt med en nål og spatel og flyttes over på »æggepapir« (små stykker filterpapir dyppet i gips-/kulvælling), som anbringes i en beholder med frisk gips-/kuls substrat. Nogle få gærpartikler tilsættes til substratet for at tiltrække unge individer og få dem til at forlade æggepapiret. Det er vigtigt, at æggepapiret og substratet er fugtigt, ellers vil æggene dehydrere. Som alternativ kan voksne dyr fjernes fra dyrkningsboksene til synkronisering, når de har produceret æg i 2-3 dage.
- Efter tre dage vil de fleste af æggene på æggepapiret være udklækket, og nogle unge individer kan findes under æggepapiret.
- For at få unge i samme alder fjernes æggepapiret med udklækkede æg fra petriskålen med en tang. De unge individer, som nu er 0-3 dage, bliver i skålen og fodres med bagegær. Udklækkede æg bortskaffes.
- Æg og udklækkede unge dyrkes på samme måde som voksne individer. Især for *F. fimetaria* træffes følgende foranstaltninger: der sikres tilstrækkelig frisk foder, gammelt muggent foder fjernes, efter en uge deles de unge individer i nye petriskåle, forudsat at tætheden er over 200.

2.b. Håndtering af colleboler ved testens begyndelse

- 9-12 dage gamle *F. candida* eller de 23-26 dage gamle *F. fimetaria* indsamles, f.eks. ved sug og frigives i en lille beholder med fugtigt gips-/kuls substrat, og deres fysiske tilstand kontrolleres under binokulært mikroskop (sårede og skadede dyr kasseres). Alle trin gennemføres, mens collebolerne holdes i en fugtig atmosfære for at undgå stress på grund af vandmangel, f.eks. ved hjælp af våde overflader osv.
- Beholderen vendes med bunden i vejret, og der bankes på den, så collebolerne overføres til jorden. Statisk elektricitet neutraliseres, ellers kan dyrene flyve op i luften eller klæbe til siden af testbeholderen og tørre ud. En ionisator eller et fugtigt klæde under beholderen kan anvendes til neutralisering.
- Foderet spredes over hele jordoverfladen og ikke bare i en dyng.

- Under transport og i testperioden undgås det at banke på testbeholderne eller på anden vis fysisk forstyrre dem, da dette kan øge jordens komprimering og hæmme samspillet mellem collembolerne.

3. **Alternative collembolarter**

Andre collembolarter kan vælges til testning ifølge denne testmetode, f.eks. *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. En række forudsætninger skal opfyldes på forhånd, før der anvendes alternative arter:

- de er entydigt identificeret
 - der angives en begrundelse for valg af art
 - det sikres, at reproduktionsbiologien er inkluderet i testfasen, så det bliver et potentielt mål under eksponeringen
 - livshistorien er kendt: alder ved kønsmodning, ægudviklingens varighed og stadier, der skal eksponeres
 - testsubstratet og fødeforsyningen skal give optimale betingelser for vækst og reproduktion
 - variationen skal være tilstrækkeligt lav til en præcis og nøjagtig toksicitetsberegning.
-

Tillæg 4

Ekstraktion og tælling af dyr**1. Der kan anvendes to ekstraktionsmetoder**

- 1.a. Første metode: Der kan anvendes en ekstraktor med kontrolleret temperaturgradient baseret på MacFadyens principper (1). Varmen kommer fra et varmeelement øverst i ekstraktionsboksen (reguleret gennem en termistor placeret på jordprøvens overflade). Temperaturen i den afkølede væske omkring opsamlingsbeholderen reguleres gennem en termistor placeret på opsamlingsboksens overflade (anbragt under jordkernen). Termistorerne er forbundet til en programmerbar kontrolenhed, som øger temperaturen efter en forprogrammeret plan. Dyr indsamles i den afkølede opsamlingsboks (2 °C) med et lag af gips/kul i bunden. Ekstraktionen påbegyndes ved 25 °C, og temperaturen øges automatisk hver 12. time med 5 °C, og varer i alt 48 timer. Efter 12 t. ved 40 °C er ekstraktionen slut.
- 1.b. Anden metode: Efter den eksperimentelle inkubationsperiode vurderes antallet af unge collemboler ved hjælp af flotation. Til det formål udføres testen i beholdere på ca. 250 ml. Ved afslutning af testen tilsættes ca. 200 ml destilleret vand. Jorden omrøres forsigtigt med en fin pensel, så collembolerne kan flyde til vandoverfladen. En lille smule — ca. 0,5 ml — sort Kentmere fotofarve kan tilsættes til vandet, så kontrasten mellem vandet og de hvide collemboler bliver større, og det bliver nemmere at tælle dem. Farven er ikke giftig for collemboler.

2. Tælling:

Tælling af antal kan foretages med det blotte øje eller under et lysmikroskop ved hjælp af et gitter, der placeres over flotationsbeholderen eller ved at fotografere overfladen af hver beholder og senere tælle collembolerne på forstørrede tryk eller projicerede slides. Optællingerne kan også foretages ved hjælp af digitale billedbehandlings-teknikker (12). Alle teknikker valideres.

Tillæg 5

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne (WHC) har vist sig at være hensigtsmæssig. Den beskrives i bilag C til ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Del 2: Determination of effects on reproduction).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor osv.). Bunden af røret dækkes med et stykke vådt filtrerpapir, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filtrerpapirmasse

T = tara (rørmasse + filtrerpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

*Tillæg 6***Bestemmelse af jordens pH**

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH.

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 t. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sin mængde af enten en 1 M opløsning kaliumchlorid (KCl), analysekvalitet, eller af en 0,01 M opløsning calciumchlorid (CaCl₂), analysekvalitet. Suspensionen rystes grundigt i fem minutter og henstår herefter til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende række bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

C.40. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER OVER EN HEL LIVSCYKLUS MED FORURENET VAND ELLER FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 233 (2010). Den har til formål at vurdere virkningerne på den tovingede ferskvands-Chironomus sp. af livslang eksponering for kemikalier med fuld dækning af den første generation (P-generationen) og den tidlige del af anden generation (F1-generationen). Det er en udvidelse af de eksisterende testmetoder C.28 (1) eller C.27 (15), der anvender et eksponeringsscenarie med henholdsvis forurennet vand eller forurennet sediment. Den tager hensyn til eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus dilutus (tidligere benævnt C. tentans (2)), som blev udarbejdet i Europa og Nordamerika (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) og efterfølgende ringtestet (1) (7) (10) (11) (12). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (13) (14). Hele eksponeringsvarigheden er 44 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og ca. 100 dage for C. dilutus.
2. Både vand- og sedimenteksponeringsscenarierne beskrives i denne testmetode. Valget af et velegnet eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Vandeksponeringsscenariet, hvor vandsøjlen spikes, har til formål at simulere et tilfælde af aerosolspredning af pesticider og dækker den første topkoncentration i overfladevand. Spiking af vand kan også bruges til andre typer af eksponering (herunder kemikalieudslip), men ikke til akkumuleringsprocesser i sedimentet, der varer længere end testperioden. I så fald — og også når afstrømning er pesticidernes vigtigste tilførselsvej til vandområder — kan et forurennet sedimentdesign være mere hensigtsmæssigt. Hvis andre eksponeringsscenarier er af interesse, kan testdesignet let tilpasses. Hvis fordelingen af testkemikalie mellem vandfasen og sedimentlaget f.eks. ikke er af interesse, og adsorption til sedimentet skal minimeres, kan det overvejes at anvende et syntetisk sediment som erstatning (f.eks. kvartssand).
3. Kemikalier, der kræver test af levende organismer, som lever i sediment, kan persistere i sediment over lange perioder. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres på forskellige måder. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, det tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. Ved stærkt adsorberende kemikalier eller ved kemikalier, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile kemikalier kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af testkemikaliets (se punkt 31). Derfor er det muligt at inkludere alle eksponeringsveje og alle livsstadier.
4. Målte endepunkter er det samlede antal udviklede voksne (for både første og anden generation), udviklingshastighed (for både første og anden generation), kønsfordeling mellem fuldt udviklede og levende voksne (for både første og anden generation), antal æggesnore pr. hun (kun første generation) og æggesnorenes fertilitet (kun første generation).
5. Formuleret sediment anbefales stærkt. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:
 - udsving i testene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikkekontaminerede og rene sedimentkilder
 - test kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna
 - færre omkostninger sammenlignet med udtagning på stedet af de tilstrækkelige mængder, som er nødvendige til rutinetest
 - formuleret sediment giver mulighed for toksicitetssammenligninger på tværs af undersøgelser og rangordning af kemikalier i overensstemmelse hermed (3).
6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af testkemikaliets i sediment/vandsystemet. Testen begynder med, at æglarver (første generation) anbringes i testbægerglas med forurenede sediment, alternativt er testkemikaliets tilsat vandet efter tilsætning af larverne. Chironomidudvikling, udviklingstid og kønsfordeling af de fuldt udviklede og levende individer vurderes. Udviklede voksne overføres til avlsbure for at fremme sværming, parring og æglægning. Antallet af producerede æggesnore og deres fertilitet vurderes. Af disse æggesnore fås æglarver af anden generation. Disse larver placeres i frisk fremstillede testbægerglas (spiking-procedure som for første generation) for at bestemme anden generations levedygtighed ved at vurdere deres udvikling, udviklingstid og kønsfordeling af de fuldt udviklede og levende individer (en skematisk fremstilling af livscyklustesten kan ses i tillæg 5). Alle data analyseres enten efter en regressionsmodel for at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage X % reduktion i det relevante endepunkt, eller ved at bruge hypotesetest for at bestemme en nuleffekt-koncentration (NOEC). Sidstnævnte kræver en sammenligning af behandlingsrespons med de relevante kontrolrespons ved hjælp af statistiske test. I tilfælde af hurtigt nedbrydelige kemikalier bemærkes det i scenariet med forurenede vand, at de senere livsstadier af hver generation (f.eks. puppefasen) kan blive eksponeret for et betydeligt lavere koncentrationsniveau i det overliggende vand end æglarverne. Hvis det er et problem, og der er brug for et sammenligneligt eksponeringsniveau for hvert livsstadium, kan følgende ændringer i testmetoden overvejes:

- parallelle test med spiking på forskellige livsstadier eller
- gentagen spiking (eller udskiftning af overliggende vand) af testsystemet i begge testfaser (første og anden generation), hvorved spiking- (udskiftnings-)intervallerne justeres til testkemikaliets skæbne.

Sådanne ændringer kan kun lade sig gøre i scenariet med forurenede vand, men ikke i scenariet med forurenede sediment.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Testkemikaliets vandopløselighed, damptryk og $\log K_{ow}$, målt eller beregnet fordeling i sediment og stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og detektionsgrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter testkemikaliets strukturformel og renhed. Testkemikaliets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttig. For kemikalier, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (16).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at laboratoriepopulationens følsomhed ikke har ændret sig. Som med dafnier vil det være tilstrækkeligt at udføre en 48-timers akuttest (efter 17). Indtil der foreligger en valideret akut retningslinje, kan der overvejes en kronisk test ifølge kapitel C.28 i dette bilag. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13). (1) (3) (6) (7) (18).

TESTENS GYLDIGHED

10. Testens validitet forudsætter følgende:
- gennemsnitsudviklingen i kontrolbehandlingen bør være mindst 70 % ved afslutningen af eksponeringsperioden for begge generationer (1) (7)
 - for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* bør 85 % af det samlede antal udviklede voksne individer fra kontrolbehandlingen i begge generationer fremkomme mellem 12 og 23 dage efter anbringelsen af æglarverne i beholderne. For *C. dilutus* er en periode på 20-65 dage acceptabel

- den gennemsnitlige kønsfordeling af fuldt udviklede og levende voksne (som andel hunner eller hanner) i kontrolbehandlingen af begge generationer bør være mindst 0,4, men højst 0,6
- for hvert avlsbur bør antallet af æggesnore i kontrollerne af første generation være mindst 0,6 pr. hun, der indsættes i avlsburet
- andelen af fertile æggesnore i hvert avlsbur for kontrolgrupperne af første generation bør være mindst 0,6
- ved afslutningen af eksponeringsperioden for begge generationer måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hver beholder. Iltkoncentrationen bør være mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV ⁽¹⁾), og pH-værdien for det overliggende vand bør være mellem 6 og 9 i alle testbeholdere
- vandtemperaturen må højst variere med $\pm 1,0$ °C.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testbeholdere og avlsbure

11. Larverne eksponeres i 600 ml glasbægre, der måler 8,5 cm i diameter (se tillæg 5). Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sediment-overfladen skal være tilstrækkelig (2-3 cm² pr. larve). Forholdet mellem sedimentlagets dybde og dybden af det overliggende vand bør være ca. 1:4. Der bruges avlsbure (minimum 30 cm i alle tre dimensioner) med gaze (maskestørrelse ca. 1 mm) øverst og på mindst den ene side af buret (se tillæg 5). I hvert bur anbringes en 2 l krystallisationsskål med testvand og sediment til æglægning. Også for krystallisationsskålen skal forholdet mellem sedimentlagets dybde og dybden af det overliggende vand være ca. 1:4. Efter at æggesnorene er indsamlet fra krystallisationsskålen, anbringes de på en mikrotiterplade med 12 brønde (en snor pr. brønd indeholdende mindst 2,5 ml vand fra den spikede krystallisationsskål), hvorefter pladerne dækkes med et låg for at forhindre væsentlig fordampning. Andre beholdere, som er egnede til opbevaring af æggesnore, kan også anvendes. Med undtagelse af mikrotiterpladerne bør alle testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testsystemet, være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. polytetrafluor-ethylen).

Valg af art

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis *Chironomus riparius*. *C. yoshimatsui* kan også benyttes. *C. dilutus* er også egnet, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Nærmere oplysninger om dyrkningsmetoder er anført i tillæg 2 for *C. riparius*. Information om dyrkningsbetingelser er også tilgængelig for *C. dilutus* (5) og *C. yoshimatsui* (14). Identifikation af arterne bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismerne kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomidelarverne. Det anbefales også, at sedimentet før testen behandles i syv dage under testbetingelser. Følgende formulerede sediment, jf. (1), anbefales (1) (20) (21):
 - a. 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5-6,0 som muligt. Det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret
 - b. 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

⁽¹⁾ Ved 20 °C og under atmosfærisk standardtryk er ASV i ferskvand lig med 9,1 mg/l (60 % svarer til 5,46 mg/l).

- c. 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 µm)
 - d. deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %
 - e. kemisk rent calciumcarbonat (CaCO_3) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på $7,0 \pm 0,5$
 - f. det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % ($\pm 0,5$ %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i a) og c).
14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser og organiske phosphorforbindelser). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som CaCO_3 . Hvis der imidlertid er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og testkemikalien, anvendes vand med en lavere hårdhedsgrad (og dermed må Elendt Medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand anvendes i hele testen. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenede vand

16. a. Testkoncentrationer beregnes på grundlag af vandsøjlekoncentrationer, dvs. vandet over sedimentet. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger fremstilles fortrinsvis ved at opløse testkemikalien i testvandet. Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Som opløsningsmiddel kan der benyttes acetone, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Koncentrationen af opløselighedsfremmere i det færdige testmedium skal være så lille som muligt (dvs. $\leq 0,1$ ml/l) og bør være den samme i alle behandlingsprøver. Når der benyttes opløselighedsfremmere, må dette ikke have nogen væsentlig virkning på overlevelsen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest med opløsningsmiddel sammenlignet med en negativ (vand)kontrol. Det undgås så vidt muligt at bruge sådanne materialer.

Stamopløsninger — forurenede sediment

16. b. Forurenede sediment af den valgte koncentration fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af testkemikalien tilsættes sedimentet direkte. En stamopløsning af testkemikalien opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valse, en foderblander eller manuel blanding. Hvis testkemikalien er tungopløselig i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med 10 g fint kvartssand til hvert testglas. Vent, indtil opløsningsmidlet er fordampet, og fjern det helt fra sandet. Sandet blandes herefter med en passende mængde sediment. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse,

dispergere eller emulgere testkemikaliet. Det sand, der findes i testkemikaliet og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment skal således fremstilles med mindre sand). Det sikres, at det testkemikalie, der tilsættes sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bestemme homogeniteten.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau, antal larver pr. testglas, antal krystallisationsskåle og avlsbure. Design for EC_x , NOEC og en grænsetest er beskrevet nedenfor.

Design til regressionsanalyse

18. Effektkoncentrationen (EC_x) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliet virkning, skal være omfattet af testen, således at endepunktet ikke ekstrapoleres uden for rammerne for de genererede data. Ekstrapolering meget under den laveste eller over den højeste koncentration bør undgås. En indledende test til bestemmelse af dosisinterval ifølge testmetode C.27 eller C.28 kan være nyttig med henblik på at vælge et passende testkoncentrationsområde.
19. Til en EC_x -metode kræves der mindst fem koncentrationer og otte replikater til hver koncentration. Til hver koncentration bruges to avlsbure (A og B). De otte replikater inddeles i to grupper à fire replikater til hvert avlsbur. Denne sammensmeltning af replikater er nødvendig på grund af det antal individer, der er nødvendig i buret for at sikre forsvarlige reproduktionsvurderinger. Den anden generation har dog otte replikater igen, som indledes på grundlag af de eksponerede populationer i avlsburene. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosis/respons-kurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres til seks (tre for hvert avlsbur), hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for EC_x .

Design til beregning af NOEC

20. Til en NOEC-metode bruges fem testkoncentrationer med mindst otte replikater (fire for hvert avlsbur A og B), og faktoren mellem koncentrationerne må ikke være større end to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($\alpha = 0,05$). Til udviklingshastighed, befrugtningsevne og fertilitet er en variansanalyse (ANOVA) normalt passende efterfulgt af Dunnetts test eller Williams' test (22-25). Til emergensforhold og kønsfordeling kan Cochran-Armitage, Fishers eksakte test med Bonferroni-korrektion eller Mantel-Haenszels test være egnede.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (en testkoncentration og kontrol(ler)), hvis der ikke observeres nogen virkninger i den valgfrie indledende test til fastlæggelse af koncentrationsområde op til en maksimumskoncentration. Formålet med grænsetesten er at vise, at eventuelle toksiske virkninger af testkemikaliet findes ved større niveauer end den testede grænsekoncentration. For vand foreslås 100 mg/l og for sediment 1 000 mg/kg (tørvægt). Normalt er mindst otte replikater for både behandlings- og kontrolgruppen nødvendige. Der skal påvises statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($\alpha = 0,05$). Med hensyn til metrisk respons (f.eks. udviklingshastighed) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). En T-test justeret for forskel i varians eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whitney-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser*Klargøring af vand- og sedimentsystemet (spiking af vand)*

22. a. Formuleret sediment (se punkt 13-14 og tillæg 3) tilsættes hver testbeholder og krystallisationsskål, så det danner et lag på mindst 1,5 cm (for krystallisationsskålen kan det være noget lavere), men højst 3 cm. Vand (se punkt 15) tilsættes, så forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af vandet ikke overstiger 1:4. Efter klargøring af testbeholderne hensættes sediment-vandsystemet til forsigtig beluftning i ca. syv dage, inden æglarverne af første og anden generation tilsættes (se punkt 14 og tillæg 3). Sediment-vandsystemet i krystallisationsskålene beluftes ikke under testen, da de ikke skal sikre larvernes overlevelse (æggesnorene indsamles allerede før udklækning). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes herefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

Klargøring af vand- og sedimentsystemet (forurenede sediment)

22. b. Forurenede sediment klargjort i overensstemmelse med punkt 16, b), anbringes i beholdere og krystallisationsskål, og overliggende vand tilsættes til et forhold mellem sediment- og vandvolumen på 1:4. Dybden af sedimentlaget skal ligge inden for området 1,5-3 cm (det kan være noget lavere for krystallisationsskålen). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger. Når det forurenede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at testkemikaliets fordeling sig fra sediment til den vandige fase (4) (5) (7) (18). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde op til fem uger. Da mange kemikalier i dette tidsrum ville blive nedbrudt, afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer anbefales. Når det vides, at kemikaliets nedbrydningshalveringstid i sedimentet er lang (se punkt 8), kan ækvilibreringstiden forlænges. Efter denne yderligere ækvilibreringstid måles koncentrationen af testkemikaliets i det overliggende vand, porevandet og sedimentet som minimum ved den højeste koncentration og en lavere (se punkt 38). Disse analytiske bestemmelser af testkemikaliets gør det muligt at beregne en massebalance og angive resultater baseret på målte koncentrationer.
23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). Under testen kan vandmængden om nødvendigt suppleres op til det oprindelige volumen for at kompensere for fordampning. Dette gøres med destilleret eller deioniseret vand for at forhindre saltophobning. Krystallisationsskåle i avlsburene dækkes ikke og kan, men behøver ikke, tilpasses for at kompensere for vandtab i testperioden, eftersom æggesnorene kun er i kontakt med vandet i omkring en dag, og skålene kun bruges i en kort fase af testen.

Tilsætning af testorganismer

24. 4-5 dage før tilsætningen af æglarver af første generation udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Under alle omstændigheder kan en lille mængde foder, f.eks. et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager tilsættes dyrkningsmediet (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for *Chironomus riparius* ved 20 °C og 1-4 dage for *Chironomus dilutus* ved 23 °C og *Chironomus yoshimatsui* ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Æglarver (højst 48 timer efter udklækning) anvendes i testen. Larver i første stadium kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (7).

25. Æglarver fordeles tilfældigt, så der er 20 i hvert testglas med sediment/vandsystemet, ved hjælp af en stump pipette. Beluftning af vandet standses, mens larverne tilsættes til testglassene og i 24 timer derefter (se punkt 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se punkt 19-20) anvendes der mindst 120 larver pr. koncentration (6 replikater pr. koncentration) i forbindelse med bestemmelse af EC_x-tilgangen og 160 i forbindelse med NOEC-tilgangen (8 replikater pr. koncentration). Ved designet med forurenat sediment begynder eksponeringen med tilsætning af larverne.

Spiking af det overliggende vand

26. 24 timer efter tilsætning af æglarverne af første generation tilsættes testkemikaliets i den overliggende vandsøjle, og let beluftning tilføres igen (se punkt 7 for eventuelle ændringer af testdesign). Små mængder stamopløsninger af testkemikaliets tilsættes under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. I designet med forurenat vand begynder eksponeringen med spiking af vandet (dvs. en dag efter tilsætning af larverne).

Udtagning af udviklede voksne

27. Udviklede individer af første generation udtages mindst en gang, men helst to gange om dagen (se punkt 36) fra testglassene ved hjælp af et sugeapparat eller lignende (se tillæg 5). Det er vigtigt at undgå at skade de voksne individer. De udtagne individer fra fire testglas i en behandling udsættes i et avlsbur, som de tidligere var blevet udvalgt til. På dagen for første emergens (hanner) tilsættes krystallisationsskålene en lille mængde stamopløsning af testkemikaliets ved pipettering under vandoverfladen (design med forurenat vand). Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. Koncentrationen af testkemikaliets i krystallisationsskålen er nominelt den samme som i de behandlingsglas, der er valgt til det specifikke avlsbur. Til designet med forurenat sediment klargøres krystallisationsskålene omkring dag 11 efter påbegyndelse af eksponeringen (dvs. tilsætning af larverne af første generation), så de kan ækvilibrere i omkring 48 timer, før de første æggesnore produceres.
28. Æggesnore indsamles fra krystallisationsskålen i avlsburet ved hjælp af pincetter eller en stump pipette. Hver æggesnor anbringes i et glas med dyrkningsmedium fra den krystallisationsskål, den blev indsamlet fra (f.eks. en brønd på en mikropode med 12 brønde sammen med mindst 2,5 ml medium). Glassene med æggesnore dækkes med et låg for at forhindre væsentlig fordampning. Æggesnorene opbevares til observation i mindst seks dage efter at de er blevet produceret, således at de kan klassificeres som frugtbare eller ufrugtbare.

Til at starte den anden generation udvælges mindst tre, men fortrinsvis seks fertile æggesnore fra hvert avlsbur sammen med noget føde og henstilles til udklækning. Disse æggesnore skulle være produceret, når æglægningen er på sit højeste, hvilket normalt sker omkring testdag 19 i kontrollerne. Ideelt set påbegyndes anden generation af alle behandlinger den samme dag, men på grund af kemikaliets virkninger på larvernes udvikling er dette måske ikke altid muligt. I så fald kan de højere koncentrationer påbegyndes senere end de lavere behandlinger og kontrollen (med opløsningsmiddel).

29. a. I designet med forurenat vand klargøres sediment/vandsystemet til den anden generation ved at tilsætte testkemikaliets til den overliggende vandsøjle, ca. en time før æglarverne tilsættes i testglassene. Små mængder testkemikalietsopløsninger tilsættes nu under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. Efter spiking tilføres let beluftning.
29. b. I designet med forurenat sediment klargøres eksponeringsglassene med sediment/vandsystemet til den anden generation på samme måde som til første generation.
30. 20 æglarver (højst 48 timer efter udklækning) af anden generation fordeles tilfældigt til hvert testglas med det forurenede sediment/vandsystem ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet standses, mens

ægglarverne tilsættes til testglassene og i 24 timer efter tilsætningen af larverne. Afhængigt af det anvendte testdesign (se punkt 19-20) anvendes der mindst 120 larver pr. koncentration (6 replikater pr. koncentration) i forbindelse med bestemmelse af EC_x-tilgangen og 160 i forbindelse med NOEC-tilgangen (8 replikater pr. koncentration).

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for *C. yoshimatsui*) pr. larve pr. dag er tilstrækkeligt til unge larver i de første 10 dage af deres udvikling. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1,0 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen reduceres i alle behandlings- og kontrolprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis dødelighed observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen.

Den toksikologiske relevans af eksponering via indtagelse er generelt højere i kemikalier med en høj affinitet for organisk kulstof eller kemikalier, der kovalent bindes til sedimentet. Ved test af kemikalier med disse egenskaber skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre larvernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes til det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden afhængigt af myndighedernes krav. For at forhindre forværring af vandkvaliteten anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (*Urtica dioica*), morbærtræ (*Morus alba*), hvidkløver (*Trifolium repens*) eller spinat (*Spinacia oleracea*). Andet plantemateriale (*Cerophyl* eller α -cellulose) kan også anvendes. Tilsætning af en fuld ration af en organisk foderkilde til sedimentet før spiking er ikke uvæsentlig for vandkvaliteten og den biologiske ydeevne (21), heller ikke en standardiseret metode, men nye undersøgelser tyder på, at denne metode fungerer (19) (26). Voksne individer i buret har normalt ikke brug for at blive fodret, men befrugtningsevne og fertilitet styrkes, når et stykke vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, gives som foder til udviklede voksne (34).

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages 24 timer efter tilsætningen af ægglarver af begge generationer og fortsættes gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-pipette af glas, hvis udløb er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget og giver nogle få bobler pr. sekund. Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet, samtidig med at validitetskriteriet om minimum 60 % ASV (punkt 10) opfyldes. Nærmere detaljer findes i (16).
33. Testen med *C. riparius* udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For *C. dilutus* og *C. yoshimatsui* anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten bør være 500-1 000 lux. Til avlsburene kan der inkluderes en ekstra times morgen- og aftenfase.

Eksponeringsvarighed

34. Design med forurenat vand: Eksponeringsperioden for den første generation begynder, når testkemikaliets tilsættes til det overliggende vand i testglassene (som er en dag efter ilægning af larverne — med henblik på eventuelle ændringer af eksponeringsdesignet, se punkt 7). Eksponering af den anden generation af larver begynder straks, eftersom de lægges i et sediment/vandsystem, der allerede er blevet forurenat. Den maksimale eksponeringsvarighed for første generation er 27 dage og for anden generation 28 dage (første generations larver tilbringer en dag i glassene uden eksponering) for så vidt angår *C. riparius* og *C. yoshimatsui*. I betragtning af overlappningen varer hele testen ca. 44 dage. For *C. dilutus* er den maksimale eksponeringsvarighed henholdsvis 64 og 65 dage for første og anden generation. Den samlede varighed er ca. 100 dage.

Design med forurenat sediment: eksponeringen begynder med tilsætningen af larver og varer højst 28 dage for begge generationer for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og højst 65 dage for begge generationer for *C. dilutus*.

Observationer

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede og levende han- og hunindivider bestemmes for begge generationer. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner og tynde krop.
36. Testglassene for begge generationer observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere eventuel abnorm adfærd hos larverne (om individer f.eks. forlader sedimentet eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af emergensperioden, som starter omkring 12 dage efter tilsætning af larverne for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* (efter 20 dage for *C. dilutus*), foretages en tælling og kønsbestemmelse af de udviklede individer mindst en gang, men helst to gange om dagen (tidligt om morgenen og sent om eftermiddagen). Efter identifikation fjernes individerne af første generation forsigtigt fra beholderne og overføres til avlsburet. Individer af anden generation fjernes og aflives efter identifikation. Eventuelle æggesnore i testglassene fra første generation indsamles individuelt og overføres med mindst 2,5 ml frisk vand til mikroplader med 12 brønde (eller andre egnede beholdere), som dækkes med et låg for at hindre væsentlig fordampning. Antallet af døde larver og synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Eksempler på avlsbur, testglas og exhauster kan ses i tillæg 5.

Reproduktion

37. Virkninger på reproduktion vurderes via antallet af æggesnore produceret af den første generation af individer og disse æggesnors fertilitet. En gang om dagen indsamles æggesnorene fra krystallisationsskålen, der står i hver avlsbeholder. Æggesnore indsamles og overføres med mindst 2,5 ml frisk vand til en mikroplade med 12 brønde (en æggesnor i hver brønd) eller andre egnede beholdere, som dækkes med et låg for at hindre væsentlig fordampning. Følgende kendetegn dokumenteres for hver æggesnor: produktionsdag, størrelse (normal, dvs. $1,0 \pm 0,3$ cm eller lille, typisk $\leq 0,5$ cm) og struktur (normal = bananform med snoet æggestreng eller abnorm, f.eks. ikkesnoet æggestreng) og fertilitet (fertil eller infertil). I løbet af seks dage efter at æggesnoren er produceret, vurderes dens fertilitet. En æggesnor anses for fertil, når mindst en tredjedel af æggene udklækkes. Det samlede antal hunner, der tilføres avlsburet, bruges til at beregne antallet af æggesnore pr. hun og antallet af fertile æggesnore pr. hun. Om nødvendigt kan antallet af æg i en æggesnor anslås ikkedestruktivt ved hjælp af ringtællemetoden (beskrevet i 32 og 33).

Analysemålinger

Testkemikaliet koncentration

38. Som minimum analyseres prøver af det overliggende vand, porevandet og sedimentet ved eksponeringens begyndelse (helst en time efter tilsætning af testkemikaliets ved spiking af vand) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Dette gælder glas fra begge generationer. Fra krystallisationsskålene i avlsburet analyseres kun det overliggende vand, eftersom det er det, æggesnorene kommer i kontakt med (for det forurenede sedimentdesign kan en analytisk bekræftelse af sedimentkoncentrationen overvejes). Der kan foretages yderligere målinger af sediment, porevand eller overliggende vand under testen, hvis det anses for nødvendigt. Disse bestemmelser af testkemikaliekoncentrationen giver oplysninger om testkemikaliet opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet. Prøvetagning af sediment- og porevand ved testens begyndelse og under testen (se punkt 39) kræver supplerende testglas for at foretage analytiske bestemmelser. Målinger i sediment i designet med forurenede vand er måske ikke nødvendige, hvis fordelingen af testkemikaliets mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i en vand- og sedimenttest under lignende betingelser (f.eks. forholdet mellem vand og sediment, anvendelsestype og organisk kulstofindhold i sediment), eller hvis det viser sig, at målte koncentrationer i det overliggende vand forbliver inden for 80-120 % af de nominelle eller målte startkoncentrationer.
39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7 og/eller 14), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt (pore-) vand. Hvis det påvises, at testkemikaliets ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen kan være for lille.

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur samt opløst ilt i vandet og krystallisationsskålene måles på en hensigtsmæssig måde (se punkt 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og i et testglas og krystallisationsskålen ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne livscyklustest er at bestemme testkemikaliets virkning på reproduktionen og, for to generationer, udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede og levende han- og hunindivider. For emergensforholdet samles data for hanner og hunner. Hvis der ikke er statistisk signifikante forskelle mellem følsomhed i udviklingshastigheden for de to køn, kan resultater for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse.
43. Effektkoncentrationer udtrykt som koncentrationer i det overliggende vand (for forurenede vand) eller i sedimentet (for forurenede sediment) beregnes normalt ud fra målte koncentrationer ved begyndelsen af eksponeringen (se punkt 38). For forurenede vand beregnes gennemsnittet derfor for hver behandling, idet koncentrationerne typisk måles ved begyndelsen af eksponeringen i det overliggende vand i glassene for begge generationer og i krystallisationsskålene. For forurenede sediment beregnes gennemsnittet for hver behandling, idet koncentrationerne typisk måles ved begyndelsen af eksponeringen i glassene for begge generationer (det er valgfrit at måle koncentrationerne i krystallisationsskålene).
44. For at beregne et punkttestimat, dvs. en EC_x -værdi, bruges data pr. glas og pr. avlsbur som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x -værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at der kan ses bort fra den. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x -værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi (31).
45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af ANOVA-metoderne (f.eks. Williams' og Dunnetts testprocedurer). Williams' test vil være egnet, når en monoton dosisrespons teoretisk set forventes, og Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Alternativt kan mere robuste test (27) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes (31).

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor en monoton dosisrespons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indikerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (27).

Summen af levende individer (hanner og hunner) udviklet pr. glas, n_e bestemmes og deles med antallet af tilførte larver, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede levende individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas (normalt 20)

Når n_e er større end n_a (dvs. når der utilsigtet blev tilført mere end det fastsatte antal larver), skal n_a svare til n_e .

47. En alternativ fremgangsmåde, som egner sig bedst til store prøvestørrelser, når der er ekstra binomial varians, er at behandle emergensforholdet som en kontinuerlig respons og følge procedurer i overensstemmelse med disse ER-data. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).
48. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdierne først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Tukey-Freeman-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis der anvendes absolutte hyppigheder. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($\sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.
49. For emergensforhold beregnes EC_x -værdier ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. probit-, logit- eller Weibull-modeller (28)). Hvis regressionsanalysen mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), kan der anvendes andre ikkeparametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

50. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af individer (ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning). Udviklingshastigheden (enhed: 1/dag) er det reciprokke tal til udviklingstiden og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetstest, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på en normalfordeling end udviklingstiden. Testfremgangsmåder baseret på mere anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som en kontinuerlig respons kan EC_x -værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (29) (30)). En NOEC for den gennemsnitlige udviklingshastighed kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test. Da hanner udvikles tidligere end hunner, dvs. har en højere udviklingshastighed, er det nyttigt at beregne udviklingshastigheden for hvert køn for sig ud over den for det samlede antal individer.
51. I forbindelse med statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag x og $x - 1$ (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas ($\bar{x}$) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i X_i}{n_e}$$

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i : indeks for inspektionsinterval

m : maksimalt antal inspektionsintervaller

f_i : antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

n_e : det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af testen ($\sum f_i$)

x_i : udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = 1 / \text{dag}_i - \frac{l_i}{2}$$

hvor:

dag_i : kontrolldag (dage siden tilførslen af larverne)

l_i : længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Kønsfordeling

52. Kønsfordelinger er kvantale data og vurderes derfor ved hjælp af Fishers eksakte test eller andre egnede metoder. Den naturlige kønsfordeling for *C. riparius* er en, dvs. der er lige mange hanner og hunner. For begge generationer behandles kønsfordelingsdata ens. Da det maksimale antal individer pr. glas (dvs. 20) er for lavt til en meningsfuld statistisk analyse, lægges det samlede antal fuldt udviklede og levende individer for hvert køn fra alle glas i en koncentration sammen. Disse ikke-transformerede data testes i forhold til kontrollen (opløsningsmiddel) eller samlede kontrolldata i en 2×2 kontingenstabel.

Reproduktion

53. Reproduction, forstået som befrugtningsevne, beregnes som antallet af æggesnore pr. hun. Mere specifikt deles det samlede antal æggesnore frembragt i et avlsbur med det samlede antal levende og ubeskadigede hunner, der er tilført buret. En NOEC for befrugtningsevne kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test.
54. Æggesnorenes fertilitet bruges til at bestemme antallet af fertile æggesnore pr. hun kvantitativt. Det samlede antal fertile æggesnore frembragt i et avlsbur deles med det samlede antal levende og ubeskadigede hunner, der er tilført buret. En NOEC for fertilitet kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test.

Testrapport

55. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber og fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, $\log K_{ow}$, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand og sediment osv.)
- kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets

Testarter:

- anvendte testorganismer: art, videnskabeligt navn, organismernes herkomst samt dyrkningsbetingelser
- information om, hvordan ægmasse og larver blev håndteret

- information om håndtering af udviklede voksne af første generation ved hjælp af en exhauster osv. (se tillæg 5)
- testorganismernes alder på tidspunktet for første og anden generations overførsel til testglassene.

Testbetingelser:

- anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret (kunstigt) sediment
- naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sedimentet, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening, sedimentets karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)
- formuleret sediment: fremstilling, ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. målt ved begyndelsen af testen)
- fremstilling af testvand (hvis der anvendes rekonstitueret vand) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, hårdhed osv. målt ved begyndelsen af testen)
- dybde af sediment og overliggende vand for testglas og krystallisationsskåle
- volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand for testglas og krystallisationsskåle
- testglas (materiale og størrelse)
- krystallisationsskåle (materiale og størrelse)
- avlsbure (materiale og størrelse)
- metode til fremstilling af stamopløsninger og testkoncentrationer til testglas og krystallisationsskåle
- tilsætning af testkemikalie i testglas og krystallisationsskåle: testkoncentrationer, antal replikater og brug af eventuelt opløsningsmiddel
- inkubationsbetingelser for testglas: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (bobler pr. sekund)
- inkubationsbetingelser for avlsbure og krystallisationsskåle: temperatur, lysintensitet og -periodicitet
- inkubationsbetingelser for æggesnore på mikroplader (eller andre glas): temperatur, lysintensitet og -periodicitet
- detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, fremstilling, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

- nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme testkemikaliekoncentrationen i testglas og krystallisationsskåle
- kvaliteten af vandet i testglassene og krystallisationsskålene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak
- eventuel udskiftning af fordampet vand i testglassene
- antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag for første og anden generation
- kønsfordeling af udviklede og levende han- og hunindivider pr. behandling for første og anden generation
- antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas for første og anden generation
- procentvis/andel emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider) for første og anden generation
- gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede og levende individer pr. replikat og behandlingshastighed (han- og hunindivider for sig og samlet) for første og anden generation

- antal æggesnore afsat i krystallisationsskålene pr. avlsbur og pr. dag
- hver æggesnors karakteristika (størrelse, form og fertilitet)
- befrugtningsevne — samlet antal æggesnore pr. samlet antal hunner, der er tilført avlsburet
- fertilitet — samlet antal fertile æggesnore pr. samlet antal hunner, der er tilført avlsburet
- estimater for toksicitetsendepunkter, f.eks. EC_x-værdier (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og de statistiske metoder, der er anvendt til at beregningen heraf
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

- (1) Kapitel C.28 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenat vand.
- (2) N.A. Shobanov, I.I. Kiknadze og M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) R. Fleming et al. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738, august 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, fra WOSTA Workshop, som blev afholdt i Nederlandene.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, revision af den første udgave, dateret juni 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) D. Milani, K.E. Day, D.J. McLeay og R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) T.J. Norberg-King, P.K. Sibley, G.A. Burton, C.G. Ingersoll, N.E. Kemble, S. Ireland, D.R. Mount og C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) V. Taenzler, E. Bruns, M. Dorgerloh, V. Pfeifle og L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Y. Sugaya (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) K. Kawai (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenat sediment.

- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
 - (17) L. Weltje, H. Rufli, F. Heimbach, J. Wheeler, M. Vervliet-Scheebaum, og M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
 - (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
 - (19) M. Oetken, G. Nentwig, D. Löffler, T. Ternes, og J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
 - (20) B.C. Suedel, og J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
 - (21) C. Naylor og C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
 - (22) C.W. Dunnett (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
 - (23) C.W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
 - (24) D.A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (25) D.A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
 - (26) D. Jungmann, C. Bandow, T. Gildemeister, R. Nagel, T.G. Preuss, H.T. Ratte, C. Shinn, L. Weltje og H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J. Soils Sediments* 9: 94-102.
 - (27) J.N.K. Rao og A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
 - (28) E.R. Christensen (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
 - (29) R.D. Bruce og D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
 - (30) W. Slob (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
 - (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 s., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
 - (32) D.A. Benoit, P.K. Sibley, J.L. Juenemann, og G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
 - (33) C. Vogt, D. Belz, S. Galluba, C. Nowak, M. Oetken og J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
 - (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.
-

*Tillæg 1***Definitioner**

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, som bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiket vand eller forurenat vand: det vand, som testkemikaliet er tilsat.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius*

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiesलग (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).
2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f. eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkningsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

Fodring af larver

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Dette præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.
5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.
6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner og tynde krop.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Eventuelle ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.
10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 og K_2HPO_4 , idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet.

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makronæringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (l)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (l)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (l)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (l)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (l)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (l)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.

⁽²⁾ Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0 274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne

Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille en vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i te- stopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

HENVISNINGER

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, red. af M. Streloke og H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

B.P. Elendt og W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

Tillæg 3

Fremstilling af formuleret sediment

SAMMENSÆTNING AF SEDIMENT

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Egenskaber	% sediment tørvægt
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4 - 5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm	75 - 76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 ($\pm 0,5$)
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledeevne $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30-50

FREMSTILLING

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i deioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C, for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være $6,0 \pm 0,5$. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30–50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med CaCO_3 . Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

OPBEVARING

De tørre bestanddele til fremstilling af syntetisk sediment opbevares tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

HENVISNINGER

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

M. Meller, P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel og B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid slugworms (Oligochaeta) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

Tillæg 4

Kemiske egenskaber for acceptabelt vand til fortynding

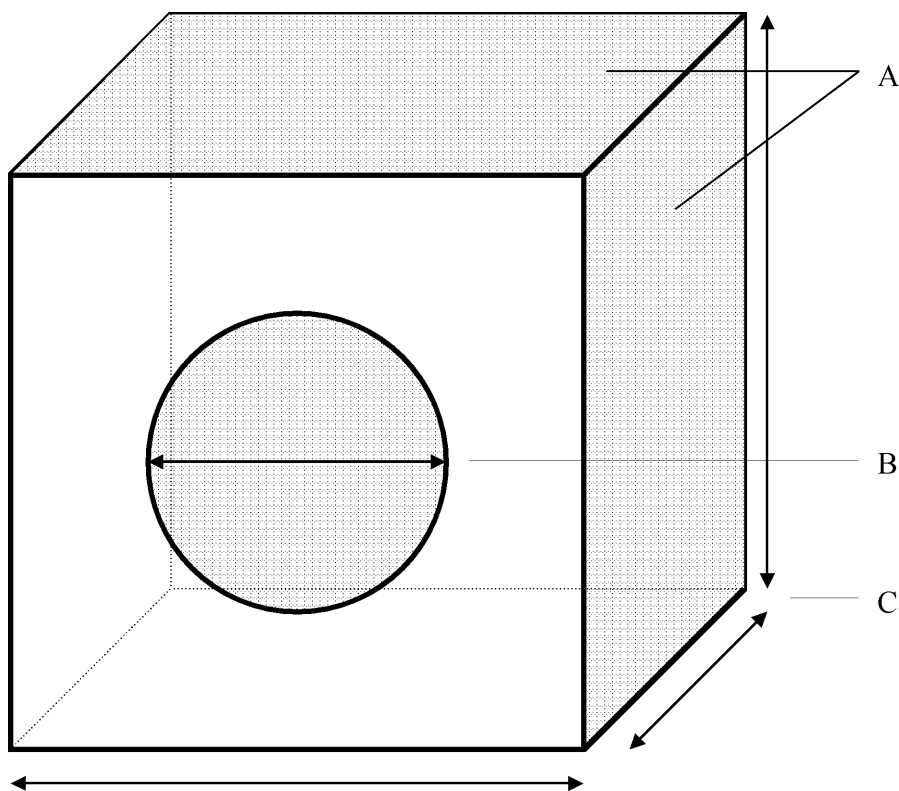
KOMPONENT	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske fosforpesticider	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og testkemikaliet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

Tillæg 5

Vejledning i udførelse af test

Eksempel på et bur

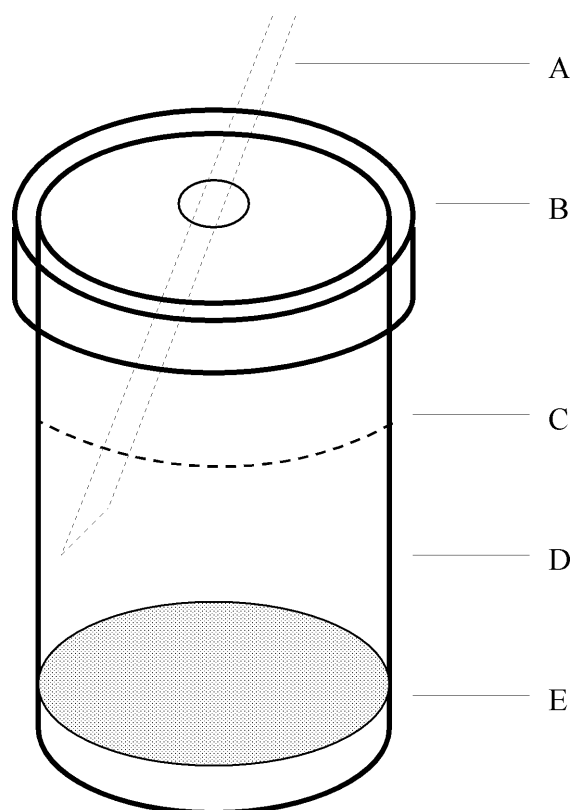


A: gaze øverst og på mindst den ene side af buret (maskestørrelse ca. 1 mm)

B: åbning til anbringelse af udviklede voksne i buret og fjernelse af de lagte æggesnore fra krystallisationsskålene (vises ikke i denne grafik)

C: burstørrelse: minimum 30 cm langt, 30 cm højt og 30 cm bredt

Eksempel på et testglas:



A: pasteurpipette til tilsætning af det overliggende vand med luft

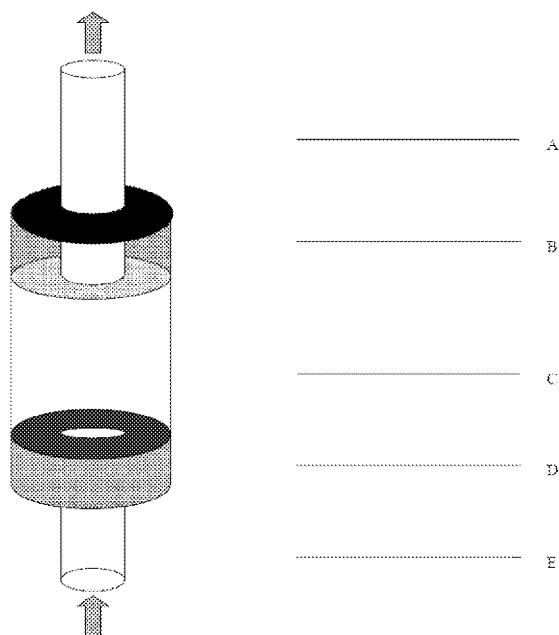
B: glaslåg for at forhindre udviklede individer i at slippe ud

C: vandoverflade

D: testglas (glasbæger, minimum 600 ml)

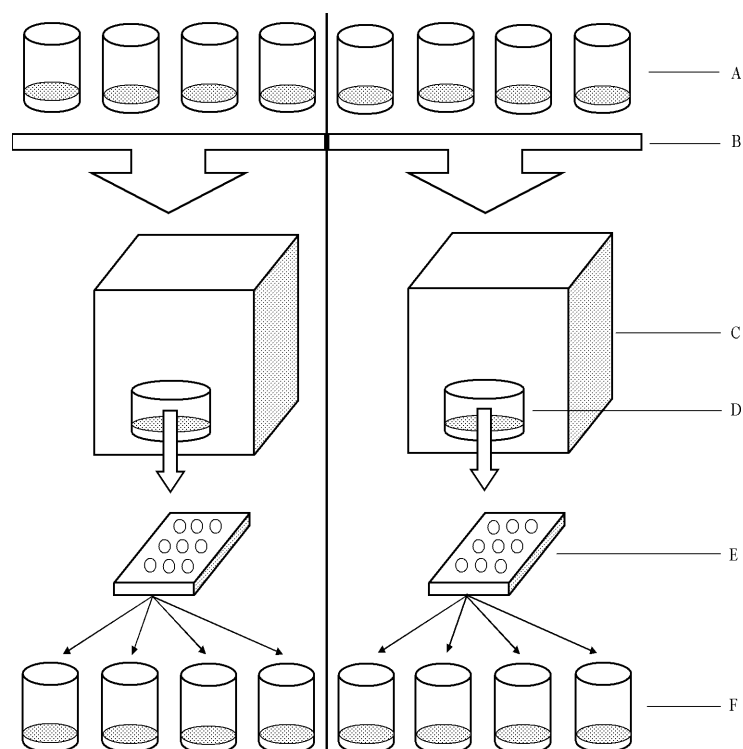
E: sedimentlag

Eksempel på en exhauster til at fange voksne individer (pilene viser luftstrømmens retning)



- A: glastrør (indvendig diameter ca. 5 mm) forbundet til en selvansugende pumpe
- B: prop af vulkaniseret gummi, perforeret med glastrør (A). På indersiden er glastrørets åbning (A) dækket med noget vat og gaze (maskestørrelse ca. 1 mm²) for at hindre beskadigelse af individerne, når de suges ind i exhausteren
- C: gennemsigtig beholder (plast eller glas, længde ca. 15 cm) til indfangede individer
- D: prop af vulkaniseret gummi, perforeret med rør (E). Når individerne skal lukkes ind i buret, frigøres prop D fra beholder C
- E: rør (plast eller glas, indvendig diameter ca. 8 mm) til at indsamle voksne individer fra glas

Skematisk fremstilling af en livscyklustest:



A: første generation — testglas indeholdende et sediment- og vandssystem, otte replikater, 20 æglarver pr. glas

B: fire testglas til hvert bur, A og B

C: bure (A og B) til sværmning, parring og æglægning

D: krystallisationsskåle til afsætning af æggesnore

E: mikropalader, en brønd til hver æggesnor

F: anden generation — testglas indeholdende et sediment- og vandssystem, otte replikater, 20 æglarver pr. glas

C.41. TEST AF FISKS KØNSUDVIKLING

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 234 (2011). Den er baseret på en beslutning fra 1998 om at udvikle nye eller opdatere eksisterende testmetoder til screening og testning af potentielle hormonforstyrrende stoffer. Testen af fisks kønsudvikling (FSDT) blev identificeret som en lovende testmetode, der dækker et følsomt livsstadium hos fisk, som reagerer på både østrogen- og androgenlignende kemikalier. Testmetoden gennemgik en validering med deltagelse af flere laboratorier fra 2006 til 2010, hvor japansk risfisk (*Oryzias latipes*), zebrafisk (*Danio rerio*) og trepigget hundestejle (*Gasterosteus aculeatus*) blev valideret, og tykhovedet elritse (*Pimephales promelas*) blev delvis valideret (41) (42) (43). Denne protokol omfatter japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk. Protokollen er i princippet en forbedring af OECD's TG 210 Fish, Early Life Stage Toxicity Test (1), hvor eksponeringen fortsættes, indtil fiskene er seksuelt differentieret, dvs. omkring 60 dage efter klækning for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk (eksponeringsperioden kan være kortere eller længere for andre arter, som valideres i fremtiden), og endokrine endepunkter tilføjes. FSDT vurderer virkninger i det tidlige livsstadium og potentielle skadelige følger af formodede hormonforstyrrende kemikalier (f.eks. østrogen, androgen og steroidgenesehæmmere) for kønsudviklingen. Med kombinationen af to centrale endokrine endepunkter, vitellogeninkoncentration (VTG) og fænotypisk kønsfordeling, kan testen vise testkemikaliets virkemåde. På grund af den populationsrelevante ændring i fænotypisk kønsfordeling kan FSDT bruges til fare- og risikovurdering. Benyttes testen til fare- eller risikovurdering, bør hundestejler dog ikke bruges, fordi de valideringsdata, som hidtil har været tilgængelige, viste, at testkemikaliernes forandringer af fænotypisk kønsfordeling hos denne art var ualmindelige.
2. Protokollen er baseret på fisk, der via vand eksponeres for kemikalier i den kønslabile periode, hvor fisken forventes at være mest følsom over for virkningerne af hormonforstyrrende kemikalier, som griber forstyrrende ind i kønsudviklingen. To centrale endepunkter måles som indikatorer for endokrine udviklingsafvigelser, nemlig VTG-koncentrationer og kønsfordeling (andele af køn), som bestemmes via histologisk undersøgelse af kønskirtlerne. Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne (vurdering og stadieinddeling af oocytter og sædceller) er valgfri. Endvidere bestemmes det genetiske køn, når det er muligt (f.eks. hos japansk risfisk og trepigget hundestejle). Tilstedeværelsen af en genetisk kønsmarkør er en stor fordel, da den øger troværdigheden af statistikken om kønsfordeling og gør det muligt at konstatere individuel fænotypisk kønsveksling. Andre slutpunkter, der skal måles, omfatter klækningshastighed, overlevelse, længde og kropsvægt. Testmetoden kan muligvis tilpasses andre arter end de ovenfor nævnte, forudsat at de øvrige arter gennemgår en validering svarende til den, som er foretaget for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, at kontrolfiskene er seksuelt differentierede ved afslutningen af testen, at VTG-niveauerne er tilstrækkeligt høje til at afdække signifikante kemikalierelaterede variationer, og at testsystemets følsomhed er fastslået ved hjælp af hormonforstyrrende referencekemikalier ((anti)østrogen, (anti)androgen, aromataseinhibitorer osv.). Endvidere skal en/alle valideringsrapport(er), der omhandler FSDT-data, hvor andre arter er anvendt, gennemgås af OECD, og valideringsresultatet skal anses for tilfredsstillende.

Indledende overvejelser og begrænsninger

3. VTG produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som reaktion på cirkulerende endogent østrogen (2). Det er en præcursor for æggeblomme proteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som er under udvikling. VTG-syntesen er meget begrænset, om end sporbar, hos umodne fisk og voksne hanfisk, fordi de mangler tilstrækkeligt cirkulerende østrogen. Dog kan leveren syntetisere og udskille VTG som reaktion på eksogen østrogenstimulation (3) (4) (5).
4. Målingen af VTG benyttes til afdække kemikalier med østrogen, antiøstrogen, androgen virkemåde og kemikalier, der forstyrrer steroidgenese, som f.eks. aromataseinhibitorer. Påvisning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af VTG-induktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer-review. VTG-induktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgen (6) (7). En reduktion af niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17 β -østradiol, forårsager et fald i vitellogeninniveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (33). Den biologiske relevans af VTG-reaktionen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og er blevet bredt dokumenteret (8) (9). Det er dog

muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikkeendokrine toksiske virkemåder.

5. Der er med succes blevet udviklet og standardiseret flere målemetoder til rutinebrug til kvantitativ bestemmelse af VTG i homogenatprøver af blod, lever, hele kroppen eller hoved/hale indsamlet fra enkeltfisk. Det er tilfældet for zebrafisk, trepigget hundestejle og japansk risfisk og også den delvis validerede art tykhovedet elritse. Artsspecifikke metoder for enzyumbundet immunadsorptionsteknik (ELISA), hvor der anvendes immunkemi til kvantitativ bestemmelse af VTG, er tilgængelige (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Hos japansk risfisk og zebrafisk er der en god sammenhæng mellem VTG målt fra blodplasma, lever og homogenatprøver, skønt homogenater normalt viser lidt lavere værdier end plasma (17) (18) (19). Tillæg 5 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til VTG-analyse.
6. Ændring i det fænotypiske kønsfordeling (andele af køn) er et endepunkt, som afspejler kønsveksling. I princippet kan østrogener, antiøstrogener, androgener, antiandrogener og steroidgenesehæmmende kemikalier påvirke kønsfordelingen mellem de fisk, der udvikles (20). Det er påvist, at denne kønsveksling er delvis reversibel hos zebrafisk (21) efter eksponering for østrogenlignende kemikalier, mens kønsveksling efter eksponering for androgenlignende kemikalier er permanent (30). Kønnen defineres som hun, han, interkønnet (både oocytter og sædceller i en kønskirtel) eller udifferentieret, hvilket bestemmes for den enkelte fisk gennem histologisk undersøgelse af kønskirtlerne. Vejledning kan fås i tillæg 7 og i OECD's Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22).
7. Genetisk køn undersøges via genetiske markører, når de findes hos en given fiskeart. Hos japansk risfisk kan hunnens XX- og hannens XY-gener påvises ved polymerasekædereaktion (PCR), eller det Y-bundne »DM domain«-gen (DMY) kan analyseres (DMY-negativ eller -positiv) som beskrevet i (23)(24). Hos trepigget hundestejle er en tilsvarende PCR-metode til genetisk kønsbestemmelse beskrevet i tillæg 10. Hvis det genetiske køn kan knyttes individuelt til det fænotypiske køn, forbedres testens styrke, og genetisk køn bestemmes derfor hos arter med dokumenterede genetiske kønsmarkører.
8. De to centrale endokrine endepunkter, VTG og kønsfordeling, kan tilsammen påvise kemikaliets endokrine virkemåde (tabel 1). Kønsfordelingen er en populationsrelevant biomarkør (25) (26), og for nogle veldefinerede virkemåder kan FSDT-resultaterne bruges til fare- og risikovurderingsformål, når tilsynsorganet finder det passende. Disse virkemåder er for tiden østrogener, androgener og steroidgenesehæmmere.

Tabel 1

Endokrine endepunkters reaktion på kemikaliers forskellige virkemåder

↑ = stigende, ↓ = faldende, — = ikke undersøgt

Virkemåde	VTG ♂	VTG ♀	Kønsfordeling	Henvisninger
Svag østrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑udiff.	(27) (40)
Stærk østrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑udiff., ingen ♂	(28) (40)
Østrogenantagonist	—	—	↓♀, ↑udiff.	(29)
Androgenagonist	↓ eller —	↓ eller —	↑♂, ingen ♀	(28) (30)
Androgenantagonist	—	—	↑♀ ↑interkønnet	(31)
Aromatasehæmmer	↓	↓	↓♀	(33)

9. FSDT dækker ikke fiskenes formeringslivsstadium, og derfor undersøges kemikalier, som formodes at påvirke formeringen ved lavere koncentrationer end kønsudvikling, i en test, der dækker formering.
10. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.
11. FSDT in vivo har til formål at påvise kemikalier med androgene og østroge egenskaber samt antiandrogene, antiøstroge og steroidgenesehæmmende egenskaber. FSDT-valideringsfaserne (1 og 2) dækkede østroge, androgene og steroidgenesehæmmende kemikalier. Virkningerne af østrogen- og androgenantagonister i FSDT kan ses i tabel 1, men disse virkemåder er mindre dokumenterede på nuværende tidspunkt.

PRINCIP FOR TESTEN

12. I testen eksponeres fisk fra nybefrugtede æg indtil afslutningen af kønsdifferentieringen for mindst tre koncentrationer af testkemikaliets opløst i vand. Testbetingelserne bør være gennemstrømning, medmindre dette ikke er muligt på grund af testkemikaliets tilgængelighed eller art (f.eks. begrænset opløselighed). Testen begynder med anbringelse af nybefrugtede æg (før blastocysten har delt sig) i testkamrene. Belastningen af kamrene er beskrevet for hver art i punkt 27. For de validerede fiskearter, japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, afsluttes testen på dag 60 efter udklækning. Ved testens afslutning aflives alle fisk på en human måde. En biologisk prøve (blodplasma, lever eller hoved-/halehomogenat) udtages til VTG-analyse fra hver fisk, og den resterende del fikseres til histologisk vurdering af kønskirtlerne for at bestemme det fænotypiske køn. Eventuelt kan der foretages en histopatologisk undersøgelse (f.eks. stadietinddeling af kønskirtler, interseksualitetens sværhedsgrad). En biologisk prøve (gat- eller rygfinnen) til bestemmelse af det genetiske køn udtages hos arter, der har de relevante markører (tillæg 9 og 10).
13. En oversigt over relevante testbetingelser for validerede arter, japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, kan ses i tillæg 2.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

14. Der bør foreligge resultater fra en akut-toksicitetstest eller anden kortvarig toksicitetsanalyse [f.eks. testmetode C.14 (34) og OECD's TG 210 (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 testkamrene med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.
15. Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, pKa, P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C.4) (35).

Godkendelseskriterier for testen

16. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:
 - koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV)
 - vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end $\pm 1,5$ °C mellem testkamrene og skal holdes inden for de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, som anvendes i testen (tillæg 2)
 - der skal foreligge en valideret metode til analyse af eksponeringskemikaliets med en detektionsgrænse et godt stykke under den laveste nominelle koncentration, og der indsamles beviser til påvisning af, at koncentrationerne af testkemikaliets i opløsningen på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier

- den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og, hvor det er relevant, i kontrollerne med opløsningsmiddel skal være større end eller lig med grænserne defineret i tillæg 2
- godkendelseskriterier vedrørende vækst og kønsandele ved afslutningen af testen er baseret på data fra kontrolgrupperne (samlet kontrol for opløsningsmiddel og vand, medmindre de er signifikant forskellige, i så fald kun opløsningsmiddel):

		Japansk risfisk	Zebrafisk	Trepigget hundestejle
Vækst	Fiskens vådvægt, duppet tør	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Længde (standardlængde)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Kønsfordeling (% hanner eller hunner)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen statistisk signifikant virkning på overlevelsen og må ikke fremkalde hormonforstyrrende virkninger eller andre negative virkninger på de tidlige livsstadier, hvilket kan afsløres ved en kontroltest med opløsningsmiddel.

Hvis der observeres en afvigelse fra testgodkendelseskriterierne, skal følgerne betragtes i forhold til pålideligheden af testdataene, og disse betragtninger inkluderes i rapporten.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testbeholderne

- Enhver type glas, rustfrit stål eller andet kemisk inaktivt materiale kan anvendes. Testbeholderne dimensioner skal være store nok til at opfylde nedenstående kriterier for belastningsgraden. Det anbefales at placere testbeholderne tilfældigt. Et randomiseret design med grupper af testbeholdere, hvor hver koncentration forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system. Testbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

Valg af fiskeart

- Anbefalede fiskearter er anført i tillæg 2. Procedurene for inddragelse af nye arter er anført i punkt 2.

Opbevaring af forældre fisk

- Oplysninger om opbevaring af forældre fisk under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210 (1). Forældre fisk fodres en eller to gange om dagen med passende foder.

Håndtering af embryoner og fiskelarver

- Indledningsvis kan embryoner og fiskelarver, mens de eksponeres for testkemikaliet, opholde sig i mindre i kar af glas eller rustfrit stål med netvægge, idet disse mindre kar er placeret i testkarret, således at testkemikaliet kan flyde igennem. Man kan skabe et ikketurbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karret op og ned, dog altid med organismene under overfladen.
- I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i testkarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes, idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke eksponeres for luft, og net må ikke bruges til at fjerne fisk fra beholderne. Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde.

Vand

22. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse, der er mindst lige så god som beskrevet i tillæg 3. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved at reagere med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af totalt organisk kulstof, ledningsevne, pH og opløst ilt foretages f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) og pesticider foretages, hvis vandkvaliteten er tvivlsom. Nærmere oplysninger om kemisk analyse og vandopsamling kan ses i punkt 34.

Testopløsninger

23. Et gennemstrømningssystem bruges, hvis det er praktisk muligt. Til gennemstrømningstest kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder kontrolleres regelmæssigt i løbet af testen og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumen af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (1). Der må udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier eller kan adsorbere testkemikaliet.
24. Stamopløsningen fremstilles fortrinsvis uden brug af opløsningsmidler, men ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Hvis testkemikaliet er vanskeligt at opløse i vandet, følges procedurerne i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36). Anvendelse af opløsningsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er anført i (36).
25. Semistatiske testbetingelser bør undgås, medmindre det godtgøres, at der er tvingende årsager hertil i forbindelse med testkemikaliet (f.eks. stabilitet, begrænset tilgængelighed, høj pris eller fare). I den semistatiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen. Enten fremstilles nye testopløsninger i rene testbeholdere, og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt ind i de nye testbeholdere, eller testorganismerne bibeholdes i testbeholderne, medens mindst to tredjedele af testvandet udskiftes dagligt.

FREM GANGSMÅDE**Eksponeringsbetingelser***Udtagning af æg og varighed*

26. For at undgå genetisk skævhed udtages æg fra mindst tre blandede og tilfældigt udvalgte ynglende par eller grupper som indledning på testen. Se beskrivelse af kunstig befrugtning for trepigget hundestejle i tillæg 11. Testen påbegyndes snarest muligt, efter at æggene er blevet befrugtet, idet embryonerne helst skal være nedsænket i testopløsningerne, før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig og senest 12 timer efter befrugtning. Testen fortsættes, indtil kønsdifferentiering i kontrolgruppen er afsluttet (60 dage efter udklækning for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk).

Belastning

27. Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal være mindst 120 pr. koncentration fordelt på mindst fire replikater (fordeling til kontrol ifølge kvadratreglen accepteres). Æggene fordeles tilfældigt (ved hjælp af statistiske tabeller for randomisering) mellem behandlingerne. Belastningsgraden (se definition i tillæg 1) bør være så lav, at koncentrationen af opløst ilt på mindst 60 % ASV kan opretholdes uden direkte beluftning af beholderne. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsgrad på højst 0,5 g/l pr. døgn og højst 5 g/l opløsning på noget tidspunkt. Senest 28 dage efter befrugtning omfordes antallet af fisk pr. replikat, så hvert replikat indeholder et så lige antal fisk som muligt. Hvis der forekommer dødelighed som følge af eksponering, reduceres antallet af replikater i overensstemmelse hermed, så fisketætheden holdes så lige som muligt mellem behandlingsniveauer.

Lys og temperatur

28. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (se forsøgsbetingelser for FSDT i tillæg 2).

Fodring

29. Foder og fodring er afgørende, og det er væsentligt, at der gives det korrekte foder til hvert stadium med passende tidsintervaller og i en tilstrækkelig mængde til at støtte normal vækst. Foder gives ad libitum, samtidig med at overskydende foder undgås. For at sikre en tilstrækkelig vækstrate fodres fiskene mindst to gange om dagen (dog accepteres en gang om dagen i weekender) med et interval på mindst tre timer mellem hver fodring. Overskydende foder og ekskrementer fjernes efter behov for at undgå akkumulering af affald. Foder og fodringshyppighed justeres til stadighed, i takt med at der indhøstes erfaringer, for at forbedre overlevelse og optimere vækst. Det bør derfor tilstræbes at bekræfte den foreslåede hyppighed med anerkendte eksperter. Der fodres ikke 24 timer før testens afslutning. Eksempler på passende fødemidler er anført i tillæg 2 (se også OECD's Fish Testing Framework (39)).

Testkoncentrationer

30. Testkemikalierne gradueres som beskrevet i tillæg 4. Der anvendes mindst tre testkoncentrationer i mindst fire replikater. Kurven fra de tilgængelige akutte toksicitetstest, som knytter LC_{50} til testperioden, bør tages i betragtning ved valg af området for testkoncentrationerne. Fem testkoncentrationer anbefales, hvis dataene skal bruges til risikovurdering.
31. Det er ikke nødvendigt at teste kemikaliekoncentrationer højere end svarende til 10 % af akutte voksne LC_{50} eller 10 mg/l, afhængigt af hvilken af disse der er lavest. Den maksimale testkoncentration bør være 10 % af LC_{50} på larve-/yngelstadiet.

Kontrol

32. Der skal ud over testkoncentrationerne være en kontrol med fortyndingsvand (≥ 4 replikater) og, hvis det er relevant, en kontrol med opløsningsmiddel (≥ 4 replikater). Kun opløsningsmidler, der er blevet undersøgt og har vist, at de ikke har nogen statistisk signifikant indflydelse på testens endepunkter, bør anvendes i testen.
33. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, må dets endelige koncentration ikke være højere end 0,1 ml/l (36), og det skal være den samme koncentration i alle testbeholdere med undtagelse af kontrollen med fortyndingsvand. Det bør dog så vidt muligt undgås at bruge sådanne opløsningsmidler, ellers holdes opløsningsmidlets koncentrationer på et minimum.

Hyppighed af analyser og målinger

34. Der udføres en kemisk analyse af testkemikaliet koncentration før indledning af testen for at kontrollere, at den opfylder godkendelseskriterierne. Alle replikater analyseres hver for sig ved påbegyndelse og afslutning af testen. Et replikat pr. testkoncentration analyseres mindst en gang om ugen under testen, idet der systematisk veksles mellem replikaterne (1,2,3,4,1,2 osv.). Opbevares prøver med henblik på analyse på et senere tidspunkt, valideres opbevaringsmetoden for prøverne på forhånd. Prøverne filtreres (f.eks. med et filter med en porøstørrelse på 0,45 μm) eller centrifugeres for at sikre, at bestemmelserne foretages på testkemikaliets opløsning.
35. Under testen måles opløst ilt, pH, samlet hårdhed, ledningsevne, saltindhold (hvis det er relevant) og temperatur i alle testbeholdere. Som minimum måles opløst ilt, saltindhold (hvis det er relevant) og temperatur en gang om ugen og pH, ledningsevne og hårdhed ved testens begyndelse og afslutning. Temperaturen overvåges fortrinsvis kontinuerligt i mindst en testbeholder.
36. Resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliet koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.

Observationer og målinger*Fosterets udviklingstrin*

37. Eksponeringen påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtning, og før blastocysten har delt sig, og senest 12 timer efter befrugtning for at sikre eksponering under den tidlige fosterudvikling.

Udklækning og overlevelse

38. Udklækning og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. Døde embryoner, larver og fiskeyngel fjernes med det samme, eftersom de hurtigt kan gå i opløsning og blive bidt i stykker af de øvrige fisk. 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 et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed
 - for larver og fiskeyngel: manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

Abnormt udseende

39. Antallet af larver eller fisk med abnorm kropsform registreres, og abnormitetens udseende og art beskrives. 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 testkamrene, når de er døde. I overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål, skal dyr, hvis abnormiteter resulterer i smerte, lidelse og angst eller varigt men, og hvis død på pålidelig vis kan forudses, bedøves og aflives ifølge beskrivelsen i punkt 44 og med henblik på dataanalyse behandles som dødelighed.

Abnorm adfærd

40. Abnorm adfærd, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning, atypisk ubevægelighed og atypisk fourageringsadfærd, noteres når det forekommer.

Vægt

41. Ved testens afslutning aflives alle overlevende fisk (bedøves, hvis der skal tages blodprøver), og individuel vådvægt (duppet tør) måles.

Længde

42. Ved testens afslutning måles de enkelte individers længde (standardlængde).
43. Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan registreres:
- kumulativ dødelighed
 - antal sunde fisk ved afslutning af testen
 - begyndelses- og sluttidspunkt for klækning
 - længde og vægt af overlevende dyr
 - antal deforme larver
 - antal fisk, der opfører sig abnormt.

Prøveudtagning af fisk

44. Prøver af fisk udtages ved testens afslutning. Fiskeprøver aflives med f.eks. MS-222 (100-500 mg pr. l med en buffer af 200 mg NaHCO_3 pr. l) eller FA-100 (4-allyl-2-methoxyphenol: eugenol) og individuelt målt og vejat som vådvægt (doppet tør) eller bedøvet, hvis der skal tages en blodprøve (se punkt 49).

Prøveudtagning til VTG-analyse og kønsbestemmelse gennem histologisk vurdering

45. Der udtages prøver af alle fisk, som klargøres med henblik på analyse af køn og VTG. Der foretages en histologisk analyse af alle fisk for at bestemme køn. Til VTG-målinger accepteres delp prøver på mindst 16 fisk fra hvert replikat. Der analyseres flere fisk med henblik på VTG, hvis resultaterne af delp prøverne viser sig at være uklare.
46. Prøveudtagningsproceduren for VTG og kønsbestemmelse afhænger af VTG-analysemetoden:

Hoved-hale-homogenatmetode til VTG-analyse

47. Fisken aflives. Hoved og hale af hver fisk skilles fra fiskens krop ved hjælp af en skalpel med snit lagt lige bag brystfinnerne og lige bag rygfinnen (se figur 1). Hoved- og haledelen fra hver fisk samles, vejes og nummereres individuelt, fryses i flydende kvælstof og opbevares ved -70°C eller derunder med henblik på VTG-analyse. Fiskens kropsdel nummereres og fikseres i et egnet fikseringsmiddel med henblik på histologisk vurdering (22). Ved hjælp af denne metode vurderes VTG og histopatologi for hvert individ, og en mulig ændring i VTG-niveau kan således knyttes til fiskens fænotypiske køn eller fiskens genetiske køn (japansk risfisk og trepigget hundestejle). Yderligere oplysninger kan ses i vejledning til homogenisering (tillæg 5) og vejledning til kvantitativ bestemmelse af VTG (tillæg 6).

Lever-homogenatmetode til VTG-analyse

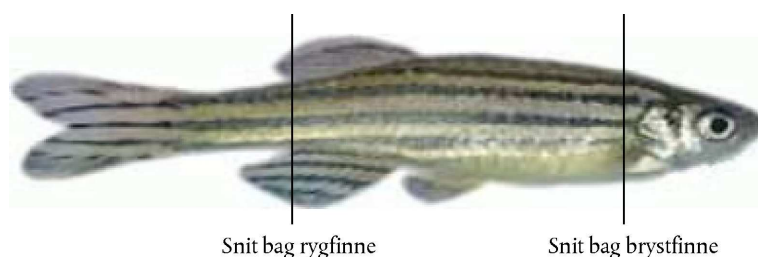
48. Fisken aflives. Leveren skæres ud og opbevares ved -70°C eller derunder. Anbefalede procedurer for udskæring af lever og forbehandling kan ses i OECD TG 229 (37) eller kapitel C.37 i dette bilag (38). Leverne homogeniseres herefter hver for sig som beskrevet i OECD TG 229 eller kapitel C.37 i dette bilag. Den udtagne supernatant bruges til at måle VTG med en homolog ELISA-teknik (se et eksempel på kvantitativ bestemmelse for zebrafisk i bilag 6 eller OECD TG 229 (37) for japansk risfisk). Ifølge denne metode er det også muligt at få individuelle fiskedata om både VTG og kønskirtelhistologi.

Blodplasmametode til VTG-analyse

49. Blod udtages fra den bedøvede fisk ved hjertepunktur, snit i halevene eller hale og centrifugeres ved 4°C med henblik på udtagning af plasma. Plasmaet opbevares ved -70°C eller herunder indtil brug. Fisken aflives og fikseres til histologisk undersøgelse. Både plasmaprøver og fisk nummereres individuelt for at sammenholde VTG-niveauer med fiskens køn.

Figur 1

Sådan udskæres en fisk med henblik på måling af VTG i hoved-/halehomogenat og histologisk vurdering af midterpartiet.



Genetisk kønsbestemmelse

50. En biologisk prøve til bestemmelse af det genetiske køn udtages fra hver enkelt fisk hos arter, der har de relevante markører. For japansk risfisk udtages gatfinne eller rygfinne. Tillæg 9 indeholder en detaljeret beskrivelse, bl.a. udtagning af vævsprøver og kønsbestemmelse ved en PCR-metode. For den trepiggede hundestejle findes der ligeledes en beskrivelse af udtagning af vævsprøver og en kønsbestemmelsesmetode ved hjælp af PCR i tillæg 10.

VTG-måling

51. Målingen af VTG baseres på en kvantitativ analytisk valideret metode. Der skal foreligge oplysninger om variabiliteten inden for testen og mellem test i den metode, som et givet laboratorium benytter. Kilden til variabilitet i og mellem laboratorier er (højest sandsynligt) baseret på fiskepopulationens forskellige udviklingsstadier. I betragtning af variabiliteten i VTG-målingen bør NOEC baseret på dette endepunkt alene behandles med stor forsigtighed. Der findes forskellige metoder til at vurdere VTG-produktion hos de fiskearter, som behandles i dette assay. En måleteknik, som både er relativt følsom og specifik, er bestemmelsen af proteinkoncentrationer via enzyumbundet immunosorbent assay (ELISA). Homologe antistoffer (fremstillet mod VTG i samme art) og de fleste vigtige homologe standarder bør anvendes.

Kønsbestemmelse

52. Afhængigt af VTG-prøveudtagningsproceduren anbringes hele fisken eller det resterende midterparti af hver fisk i en på forhånd mærket behandlingskassette og fikseres i et egnet fikseringsmiddel med henblik på histologisk bestemmelse af køn (også valgfrit for vurdering af stadietinddeling af kønskirtler). Vejledning om fiksering og indlejring kan fås i tillæg 7 og i OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22). Efter behandling indlejres fisken i paraffinblokke. Individuerne anbringes på langs i hver paraffinblok. Der udtages mindst seks længdesnit (3-5 µm i tykkelse) i et frontalplan, der indeholder kønskirtelvæv fra begge kønskirtler fra hvert individ. Intervallet mellem disse snit skal være ca. 50 µm for hanner og 250 µm for hunner. Eftersom hver blok ofte vil indeholde hanner og hunner (hvis der er indlejret mere end et individ i hver blok), skal intervallet mellem snit fra disse blokke være ca. 50 µm, indtil der er opnået mindst seks snit af kønskirtlerne fra hver han. Derefter kan intervallet mellem snit øges til ca. 250 µm for hunnerne. Snittene farves med hematoxylin and eosin og undersøges ved lysmikroskopi med fokus på køn (han, hun, interkønnet eller udifferentieret). Interkønnet defineres som tilstedeværelse af mere end en oocyt i testes pr. seks analyserede snit eller spermatogene celler (ja/nej) i ovarierne. Histopatologisk undersøgelse og stadietinddeling af ovarier er valgfri, men hvis den foretages, analyseres resultaterne statistisk og registreres. Det skal bemærkes, at nogle fiskearter naturligt mangler et fuldt udviklet par kønskirtler, og at der måske kun er en kønskirtel til stede (f.eks. japansk risfisk og undertiden zebrafisk). Alle disse observationer registreres.
53. Genetisk kønsbestemmelse hos individuelle japanske risfisk er baseret på tilstedeværelse eller fravær af risfiskens hankønsbestemmende gen, DMY, der sidder på Y-kromosomet. Risfiskens genotypiske køn kan identificeres ved at sekventere DMY-genet fra DNA ekstraheret fra f.eks. et stykke gatfinne eller rygfinne. Tilstedeværelsen af DMY viser et XY-(han)individ uanset fænotype, mens fraværet af DMY viser et XX-(hun)individ uanset fænotype (23). Vejledning i fremstilling af vævspræparater og PCR-metoden er anført i bilag 9. Den genetiske kønsbestemmelse af en trepigget hundestejle foretages også efter en PCR-metode, der er beskrevet i bilag 10.
54. Forekomsten af interkøn (se definition i tillæg 1) registreres.

Sekundære kønskarakteristika

55. Sekundære kønskarakteristika er hormonstyret hos arter som japansk risfisk. Derfor foretages observationer af fiskens fysiske udseende, hvis det er muligt, ved eksponeringens afslutning. Hos japansk risfisk er papillardannelsen på den bageste del af gatfinnen, hos hunner androgenfølsom. Kapitel C.37 i dette bilag (38) indeholder relevante fotografier af sekundære kønskarakteristika for hanner og androgene hunner.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

56. Det er vigtigt, at endepunktet bestemmes af den stærkest mulige, valide statistiske test. Replikatet er forsøgsenheden, men variabiliteten mellem replikater bør medtages i den statistiske test. Der findes et beslutningsflowdiagram i tillæg 8, som kan hjælpe med at afgøre, hvilken statistisk test som det vil være mest hensigtsmæssigt at bruge baseret på kendetegnene ved de data, der opnås fra testen. Det statistiske signifikansniveau er 0,05 for alle omfattede endepunkter.

Kønsandele og genetisk køn

57. Kønsandelene analyseres for en signifikant effekt (NOEC/LOEC-metoden) af eksponering efter Jonckheere-Terpstra (trend test), hvis der er tale om en monoton dosisrespons. Hvis der ikke påvises monoton, anvendes en parvis test: Brug Dunnett's test, hvis der kan opnås normalitet og homogen varians. Brug Tamhane-Dunnett, hvis der forekommer heterogen varians. Ellers brug en eksakt Mann-Whitney-test med Bonferroni-Holm-justering. Et flowdiagram med beskrivelse af statistikker for kønsandele er anført i tillæg 8. Kønsandelene præsenteres i tabeller som koncentrationsandele $\pm$ standardafvigelser for hanner, hunner, interkønnede og uddifferentierede. Statistisk signifikans fremhæves. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42). Genetisk køn registreres som en procentdel af fænotypisk kønsveksling for hanner, hunner, interkønnede og uddifferentierede.

VTG-koncentrationer

58. VTG-koncentrationer analyseres for signifikant effekt (NOEC-/LOEC-metode) af eksponeringen. Dunnett-testen foretrækkes frem for t-testen med Bonferroni-korrektion. Hvis der benyttes en Bonferroni-korrektion, foretrækkes Bonferroni-Holm-korrektionen. Der bør være mulighed for log-transformation af VTG for at opnå normalitet og varianshomogenitet. Såfremt koncentrationsresponsen stemmer overens med monotonien, foretrækkes Jonckheere-Terpstra-testen herefter frem for nogen af de ovennævnte. Bruges en t-test eller Dunnett's test, er en ANOVA-signifikant F-test ikke nødvendig for at gå videre. Se yderligere oplysninger i flowdiagrammet i tillæg 8. Resultater registreres i tabeller som koncentrationsgennemsnit $\pm$ standardafvigelser for hanner, hunner, interkønnede og uddifferentierede hver for sig. Statistisk signifikans for fænotypiske hunner og fænotypiske hanner fremhæves. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42).

Testkemikalie: faktiske koncentrationer

59. De faktiske koncentrationer af testkemikaliets i kamrene analyseres i frekvenser og beskrives i punkt 34. Resultaterne registreres i tabeller som gennemsnitskoncentration $\pm$ standardafvigelse på grundlag af replikat og på grundlag af koncentration med fremhævede oplysninger om antal prøver og resultater, der afviger fra den gennemsnitlige behandlingskoncentration $\pm$ 20 %. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42).

Fortolkning af resultaterne

60. Hvor den målte koncentration af testkemikaliets i testopløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtighed.

Testrapport

61. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

- Relevante fysisk-kemiske egenskaber, kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets.

Testbetingelser:

- anvendt testprocedure (f.eks. gennemstrømning semistatisk/udskiftning), testdesign, herunder testkoncentrationer, metode til fremstilling af stamopløsninger (i et bilag), udskiftningsfrekvens (hvis der bruges opløsningsmiddel og koncentrationer heraf, skal det anføres)
- de nominelle testkoncentrationer, gennemsnit af de målte værdier og standardafvigelser i testbeholderne og metoden, hvorved de er opnået (den anvendte analysemetode anføres i et bilag) samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentrationer i opløsning
- vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde, fodermængde og fodringshyppighed samt analyser for kontaminanter (f.eks. PCB'er, PAH'er og organiske chlorpesticider), hvis det er relevant.

Resultater

- Dokumentation for, at kontrollerne opfyldte validitetskriterierne: data vedrørende udklækningshastighed anføres i tabeller som en procentdel pr. replikat og pr. koncentration. Resultater, der afviger fra godkendelseskriterierne (i kontrollerne), fremhæves. Overlevelseshastigheden udtrykkes som en procentdel pr. replikat og pr. koncentration. Resultater, der afviger fra validitetskriterierne (i kontrollerne), fremhæves.
 - Tydelig angivelse af de resultater, som er opnået for de forskellige observerede endepunkter: fosteroverlevelse og -udklæknings succes, ydre abnormiteter, længde og vægt, VTG-målinger (ng/g homogenat, ng/ml plasma eller ng/mg lever), histologisk undersøgelse af kønskirtler, kønsfordeling, data om genetisk køn, forekomst af eventuelt usædvanlige reaktioner hos fiskene og eventuelt synlige virkninger af testkemikaliets.
62. Resultaterne præsenteres som gennemsnitsværdier $\pm$ standardafvigelser eller standardfejl. Statistikkerne registreres som minimum som NOEC og LOEC og konfidensintervaller. Det statistiske flowdiagram (tillæg 8) skal følges.

LITTERATUR

- (1) OECD (1992), Fish, *Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen og J.P. Sumpter, 1996, »Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, s. 194-202.
- (3) J.P. Sumpter, og S. Jobling, 1995, »Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment«, *Environmental Health Perspectives* 103, s. 173-178.
- (4) C.R. Tyler, R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix og H. Trip (1999), »An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, s. 337-347.
- (5) H. Holbech, L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen og P. Bjerregaard (2001a), »Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, s. 119-131.
- (6) L. Andersen, P. Bjerregaard og B. Korsgaard (2003), »Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors«, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, s. 319-321.
- (7) S. Orn, H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren og G.I. Petersen (2003), »Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone«, *Aquatic Toxicology* 65, s. 397-411.

- (8) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla og C.R. Tyler (2002), »Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, s. 319-326.
- (9) S.W. Sun, J.M. Zha, P.A. Spear og Z.J. Wang (2007), »Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, s. 533-541.
- (10) L.G. Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), »Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, s. 113-125.
- (11) F. Brion, B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksøyr og J.M. Porcher (2002), »Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, s. 1699-1708.
- (12) K. Nishi, M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara og E. Tamiya (2002), »Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, s. 161-169.
- (13) E. Hahlbeck, I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James og B.E. Bengtsson (2004), »The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction«, *Aquatic Toxicology* 70, s. 311-326.
- (14) N. Tatarazako, M. Koshio, H. Hori, M. Morita og T. Iguchi (2004), »Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka«, *Journal of Health Science* 50, s. 301-308.
- (15) J.K. Eidem, H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson og A. Goksøyr (2006), »Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*«, 78, s. 202-206.
- (16) K.M. Jensen og G.T. Ankley (2006), »Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)«, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, s. 101-105.
- (17) H. Holbech, G.I. Petersen, A. Norman, S. Örn, L. Norrgren og P. Bjerregaard (2001b), »Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)«, *Nordisk Ministerråd, TemaNord* 2001:597, s. 48-51.
- (18) B.M. Nilsen, K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher og A. Goksøyr (2004), »Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening«, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, s. 621-633.
- (19) S. Orn, S. Yamani og L. Norrgren (2006), »Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone«, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, s. 237-243.
- (20) S. Scholz og N. Kluver (2009), »Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3«, s. 136-151.
- (21) M. Fenske, G. Maack, C. Schafers og H. Segner (2005), »An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, s. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) T. Kobayashi, M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata og Y. Nagahama (2004), »Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*«, *Developmental Dynamics* 231, s. 518-526.

- (24) A. Shinomiya, H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi og M. Sakaizumi (2004), »Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations«, *Zoological Science* 21, s. 613-619.
- (25) K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak og R.W. Flick (2007), »Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen«, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, s. 8897-8901.
- (26) V.P. Palace, R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron og K.A. Kidd (2009), »Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake«, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, s. 1920-1935.
- (27) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno og C.R. Tyler (2006), »Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)«, *Aquatic Toxicology* 77, s. 279-290.
- (28) H. Holbech, K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren og P. Bjerregaard (2006), »Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, s. 57-66.
- (29) L. Andersen, K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2004), »Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)«, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, s. 257-266.
- (30) J.E. Morthorst, H. Holbech og P. Bjerregaard (2010), »Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations«, *Aquatic Toxicology* 98, s. 336-343.
- (31) Y. Kiparissis, T.L. Metcalfe, G.C. Balch og C.D. Metcalf (2003), »Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)«, *Aquatic Toxicology* 63, s. 391-403.
- (32) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley og C.R. Tyler (2004), »Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development«, *Aquatic Toxicology* 70, s. 11-21.
- (33) K. Kinnberg, H. Holbech, G.I. Petersen og P. Bjerregaard (2007), »Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, s. 165-170.
- (34) Kapitel C.14 i dette bilag, Væksttest på fiskeyngel.
- (35) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Kapitel C.37 i dette bilag, 21-dages assay med fisk: En korttidsscreeningstest for østrogene og androgene virkninger og aromatasehæmning.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris.
- (40) C. Schäfers, M. Teigeler, A. Wenzel, G. Maack, M. Fenske og H. Segner (2007), »Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*« *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 s. 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

-
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. EFT L 276 af 20.10.2010, s. 33.
-

Tillæg 1

Forkortelser og definitioner

Slutpunkt: skaber effekt på populationsniveau

ASV: air saturation value = luftmætning

Biomarkør: skaber effekt på individuelt niveau

Kemikalie: et stof eller en blanding

Dph: days post hatch = dage efter udklækning

DMY: Y-specifikt DM-domain-gen, der er nødvendig for udvikling af hanner hos japansk risfisk

ELISA: Enzymkoblet immunadsorptionsteknik

Fiskevægt: Fiskens vådvægt (duppet tør)

FSDT: Test af fisks kønsudvikling

HPG-aksen: Hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen

Interkønnet fisk: Fisk med mere end en oocyt i testes pr. 6 analyserede snit eller spermatogene celler i ovarierne (ja/nej)

Belastningsgrad: fiskens vådvægt pr. vandvolumen

MOA: Virkningsmekanisme

RT-PCR: revers transskriptasepolymerasekædereaktion

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode

Udifferenterede fisk: fisk, hvis kønskirtler ikke viser synlige kønsceller

VTG: Vitellogenin

Tillæg 2

Testbetingelser for FSDT (ferskvandsarter)

1. Anbefalet art	Japansk risfisk (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Trepigget hundestejle (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Testtype	Gennemstrømning eller semistatisk	Gennemstrømning eller semistatisk	Gennemstrømning eller semistatisk
3. Vandtemperatur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektret)	Fluorescerende pærer (bredspektret)	Fluorescerende pærer (bredspektret)
5. Lysintensitet	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode	12-16 t. lys, 8-12 t. mørke	12-16 t. lys, 8-12 t. mørke	16 t. lys, 8 t. mørke
7. Mindste kammerstørrelse	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l
8. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
9. Testorganismernes alder ved eksponeringens start	Nybefrugtede æg (tidligt blastulastadie)	Nybefrugtede æg (tidligt blastulastadie)	Nyligt befrugtede æg
10. Antal æg pr. behandling	minimum 120	minimum 120	minimum 120
11. Antal behandlinger	Minimum 3 (plus passende kontroller)	Minimum 3 (plus passende kontroller)	Minimum 3 (plus passende kontroller)
12. Antal replikater pr. behandling	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratsreglen)	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratsreglen)	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratsreglen)
13. Fodring	Levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.	Specialyngelfoder, levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.	Levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.

14. Beluftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % mætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % mætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 70 % mætning
15. Fortyndingsvand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand
16. Varighed af eksponering for testkemikaliet	60-dph	60-dph	60-dph
17. Biologiske endepunkter	Klækningssucces, overlevelse, makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, genetisk køn Kønsfordeling	Klækningssucces, overlevelse, makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, kønsfordeling	Klækningssucces, overlevelse, makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, kønsfordeling
18. Testgodkendelseskriterier for samlede kontrolreplikater	Klækningssucces > 80 %	Klækningssucces > 80 %	Klækningssucces > 80 %
	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %
	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tørre) > 150 mg	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tør) > 75 mg	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tør) > 120 mg
	Længde (standardlængde) > 20 mm	Længde (standardlængde) > 14 mm	Længde (standardlængde) > 20 mm
	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %

Tillæg 3

Kemiske egenskaber for acceptabelt vand til fortynding

KOMPONENT	KONCENTRATION
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/l
Total organiske chlorpesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

Tillæg 4

Fra testmetode C.14 / vejledning i testkoncentrationer

Kolonne (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 tre (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en kolonne. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i kolonne (x) findes i kolonne (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. Kolonne 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

Tillæg 5

Vejledning i homogenisering af hoved og hale fra yngel af zebrafisk, tykhovedet elritse, trepigget hundestejle og japansk risfisk

Formålet med dette afsnit er at beskrive de procedurer, der går forud for en kvantitativ bestemmelse af VTG-koncentrationen. Der kan anvendes andre procedurer, som fører til en sammenlignelig kvantitativ bestemmelse af VTG. Det er valgfrit, om man vil bestemme VTG-koncentrationen i blodplasma eller lever i stedet for hoved-/halehomogenat.

Fremgangsmåde

1. Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.
2. Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med testbeskrivelsen. **Vigtigt:** Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »VTG-forurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikkeinducerede hanner.
3. Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.
4. Når delene er vejjet, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og fryses ved — 80 °C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is, og resultatet er en homogen masse). **Vigtigt:** Rørene nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropsparti, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.
5. Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold **homogeniseringsbuffer** (*) på 4-10 gange væsvægten (bemærk fortyndingen). Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. **Vigtigt:** Der bruges nye pistiller til hver fisk.
6. Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved 4 °C ved 50 000 g i 30 min.
7. Anvend en pipette til at fordele portioner à 20-50 µl (bemærk mængden) supernatant i **mindst to** rør ved at dyppe spidsen af pipetten under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.
8. Rørene opbevares ved — 80 °C indtil brug.

(*) Homogeniseringsbuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaseinhibitorblanding (eller tilsvarende proteaseinhibitorblandinger).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv) produktnummer **P 8340**.

Bemærk: Homogeniseringsbufferen skal anvendes på fremstillingsdagen. Anbringes på is under brug.

Tillæg 6

Vejledning i kvantitativ bestemmelse af vitellogenin i hoved- og halehomogenat fra zebrafish (*danio rerio*) (ændret fra holbech et al., 2001). Der kan benyttes andre procedurer, hvor der anvendes homologe antistoffer og standarder.

1. Mikrotiterplader (certificeret Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danmark), som tidligere er coatet med 5 µg/ml IgG-antistoffer mod zebrafisk-lipovitellin, optøs og vaskes tre gange med vaskebuffer (*).
2. Vitellogeninstandard (⁽¹⁾) af rensset zebrafisk fortyndes serielt til 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 og 20 ng/ml i fortyndingsbuffer (**), og prøverne fortyndes mindst 200 gange (for at forebygge matrixeffekt) i fortyndingsbuffer og påføres pladerne. Der foretages en dobbelt assaykontrol. 150 µl tilsættes hver brønd. Standarderne anvendes in duplo og prøverne in triplo. Inkuberes natten over ved 4 °C på et rystebord.
3. Pladerne vaskes fem gange med vaskebuffer (*).
4. HRP bundet til en dextrankæde (f.eks. AMDEX A/S, Danmark) og konjugerede antistoffer fortyndes i vaskebuffer. Den faktiske fortynding afviger efter parti og alder. 150 µl tilsættes hver brønd, og pladerne inkuberes i en time ved stuetemperatur på et rystebord.
5. Pladerne vaskes fem gange med vaskebuffer (*), og bunden af pladerne renses omhyggeligt med ethanol.
6. 150 µl TMB plus (***) tilføres hver brønd. Beskyt pladen mod lys med stanniol og hold øje med farveudviklingen på et rystebord.
7. Når standardkurven er fuldt udviklet, standses enzymaktiviteten ved at tilsætte 150 µl 0,2 M H₂SO₄ til hver brønd.
8. Absorbansen måles ved 450 nm (f.eks. på en Molecular Devices Thermomax-mikropladeaf læser). Data analyseres på den tilknyttede software (f.eks. Softmax).

(*) Vaskebuffer:

PBS-stam (***)	500,0 ml
BSA	5,0 g
Tween 20	5,0 ml

Juster pH til 7,3 og fyld op til 5 l med millipore H₂O. Opbevar ved 4 °C.

(**) Fortyndingsbuffer:

PBS-stam (***)	100,0 ml
BSA	3,0 g
Tween 20	1,0 ml

Juster pH til 7,3 og fyld op til 1 l med millipore H₂O. Opbevar ved 4 °C.

(¹) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), rensset ifølge: N.D. Denslow, M.C. Chow, K.J. Kroll og L. Green (1999), Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

(***) TMB plus er et brugsklart substrat fremstillet af KemEnTec (Danmark). Det er lysfølsomt. Opbevar ved 4 °C.

(****) PBS stam

NaCl	160,0 g

KH ₂ PO ₄	4,0 g

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26,6 g

KCl	4,0 g

Juster pH til 6,8 og fyld op med millipore H₂O til 2 l. Opbevar ved stuetemperatur.

Tillæg 7

Vejledning i fremstilling af vævssnit til kønsbestemmelse og stadietinddeling af kønskirtler

Formålet med dette afsnit er at beskrive de procedurer, der går forud for vurderingen af histologiske snit. Der kan anvendes andre procedurer, som fører til en lignende kønsbestemmelse og stadietinddeling af kønskirtler.

Med nogle få undtagelser er disse procedurer de samme for japansk risfisk (JMD) og zebrafisk (ZF).

Aflivning, obduktion og fiksering af væv*Mål:*

1. at sikre en human aflivning af fisk
2. at opnå den nødvendige kropsvægt og de nødvendige mål
3. at vurdere sekundære køns karakteristika
4. at dissekere væv til VTG-analyse
5. at fikse kønskirtlerne.

Fremgangsmåder:

1. Fisk aflives umiddelbart før obduktion. Medmindre der er mange prosektorer til rådighed, bør mange fisk derfor ikke aflives samtidig.
2. Ved hjælp af en lille ketsjer fjernes en fisk fra forsøgskammeret og transporteres til obduktionsområdet i transport-beholderen.
3. Fisken anbringes i aflivningsopløsningen. Fisken fjernes fra opløsningen, når vejtrækningen er ophørt, og fisken ikke reagerer på eksterne stimuli.
4. Fisken vejes i våd tilstand.
5. Med henblik på fremstilling af væv til VTG-analyse kan fisken anbringes på en korkplade på præparatbordet i et dissektionsmikroskop.
 - a. For zebrafisk skæres hovedet lige bag brystfinnen, og halen skæres lige bag rygfinnen.
 - b. For japansk risfisk åbnes abdomen ved en omhyggelig incision, der strækker sig langs den ventrale midterlinje fra skulderåget til et punkt lige oven for gattet. Ved hjælp af små pincetter og en lille saks fjernes leveren forsigtigt.
6. Prøver til VTG-analyse anbringes i eppendorfrør og fryses straks i flydende kvælstof.
7. Kadaveret, herunder kønskirtlerne, anbringes i en på forhånd mærket vævskassette af plast, som overføres til Davidson's eller Bouin's fikseringsmiddel. Fikseringsmidlets volumen skal være mindst 10 gange den tilnærmede vævsvolumen. Fikseringsbeholderen rystes forsigtigt i fem sekunder for at fjerne luftbobler fra kassetten.
8.
 - a. Alt væv bliver liggende i Davidson's fikseringsmiddel natten over, hvorefter det den næste dag overføres til individuelle beholdere med 10 % neutralbufret formalin. Kassettebeholderne rystes forsigtigt i fem sekunder for at sikre en tilstrækkelig gennemtrængning af formalin i kassetterne.
 - b. Vævene bliver liggende i Bouin's fikseringsmiddel i 24 timer, hvorefter de overføres til 70 % ethanol.

Vævsbehandling

Mål:

1. at tørre væv med henblik på tilstrækkelig gennemtrængning af paraffin
2. at behandle vævet med paraffin for at opretholde vævets integritet og skabe en fast overflade til mikrotomi.

Fremgangsmåder:

3. Mærkede vævskassetter fjernes fra opbevaringen i formalin/ethanol, og kassetterne anbringes i behandlingskurven/-ene. Behandlingskurven indsættes i vævsbehandlingsenheden.
4. Behandlingsplanen vælges.
5. Når vævsbehandlingsenheden har afsluttet behandlingscyklussen, kan kurven/-ene overføres til den indlejrede station.

Indlejring

Formål:

at vende prøven korrekt i størknet paraffin med henblik på mikrotomi.

Fremgangsmåder:

1. Kassettekurven/-ene fjernes fra behandlingsenheden og nedsænkes i det paraffinfyldte forkammer i indlejringssstationens varmekonsol, eller kassetterne flyttes til en separat paraffinvarmer.
2. Den første kassette, der skal indlejres, fjernes fra forkammeret i varmekonsollen eller paraffinvarmeren. Kassettelåget fjernes og kasseres, og kassettemærket kontrolleres i forhold til dyrejournalerne for at løse potentielle uoverensstemmelser før indlejring.
3. Der vælges en indlejningsform i passende størrelse.
4. Formen holdes under dispenserens tud og fyldes med smeltet paraffin.
5. Prøven fjernes fra kassetten og anbringes i den smeltede paraffin i formen. Dette gentages med 4-8 prøver for hver paraffinform. Den enkelte fisks placering afmærkes ved at anbringe fisk nr. 1 i en vinkel på 180 grader i forhold til fisk nr. 2-4/8.
6. Ekstra paraffin tilsættes for at dække prøven.
7. Formen med kassettebasen anbringes på kryokonsollens køleplade.
8. Når paraffinen er størknet, fjernes blokken (dvs. den hærdede paraffin indeholdende væv og kassettebase) fra formen.

Mikrotomi

Formål:

Skær og anbring histologiske snit til farvning.

Fremgangsmåder:

1. Den første fase af mikrotomien, der kaldes »facing«, udføres som følger:
 - a. Paraffinblokken anbringes i mikrotomens kæber.
 - b. Kæberne føres frem ved at rotere mikrotomhjulet, og der skæres tykke snit af blokkens paraffinoverflade, indtil kniven når de indlejrede væv.

- c. Snittykkelsen på mikrotomen sættes til 3-5 mikron. Kæberne føres frem, og der skæres flere snit af blokken for at fjerne eventuelle artefakter, der har dannet sig på vævets snitflade under grovtrimming.
 - d. Blokken kan fjernes fra kæberne og anbringes med oversiden nedad på isen for at gennemvæde vævet.
2. Den næste fase af mikrotomien er skæring af endeligt snit og montering af vævssnit på objektglas. Disse procedurer udføres som følger:
- a. Hvis blokken er blevet sat på is, fjernes blokken fra isen og anbringes igen på mikrotomens kæber.
 - b. Mikrotomens snittykkelse sættes til 3-5 mikron, og kæberne føres frem ved at dreje mikrotomhjulet. Der skæres snit af blokken, indtil der er frembragt et »bånd« med mindst et acceptabelt snit, der indeholder kønskirtler. (Under delingen kan blokken efter behov fjernes fra kæberne, anbringes på isen for at gennemvæde vævet og sættes tilbage i kæberne igen.)
 - c. Snittene anbringes fladt flydende på vandoverfladen i vandbadet. Der gøres forsøg på at få mindst et snit, som ikke indeholder folder, og hvor der ikke er opsamlet luftbobler under det.
 - d. Et mikroskopobjektglas nedsænkes under det bedste snit, som løftes op af vandet ved hjælp af glasset. Denne proces kaldes »montering« af snittet på glasset.
 - e. Der klargøres tre snit til et sæt fisk. Det andet og tredje snit udtages med intervaller på 50 mikron efter det første snit. Hvis fiskene ikke er indlejret med deres kønskirtler i det samme snitniveau, skal der foretages flere snit for at sikre, at der fås mindst seks snit, der indeholder kønskirtler, fra hver fisk.
 - f. Med en opmærkningspen til objektglas registreres det bloknummer, glasset blev fremstillet med, på glasset.
 - g. Glasset anbringes i et farvningsstativ.
 - h. Blokken fjernes fra kæberne og anbringes med oversiden nedad med henblik på opbevaring.

Farvning, anvendelse af dækglas og glasmærkning

Mål:

- at farve snittene til histopatologisk undersøgelse
- at forsegle monterede og farvede væv permanent
- at identificere farvede snit permanent på en måde, der sikrer fuld sporbarhed.

Fremgangsmåder:

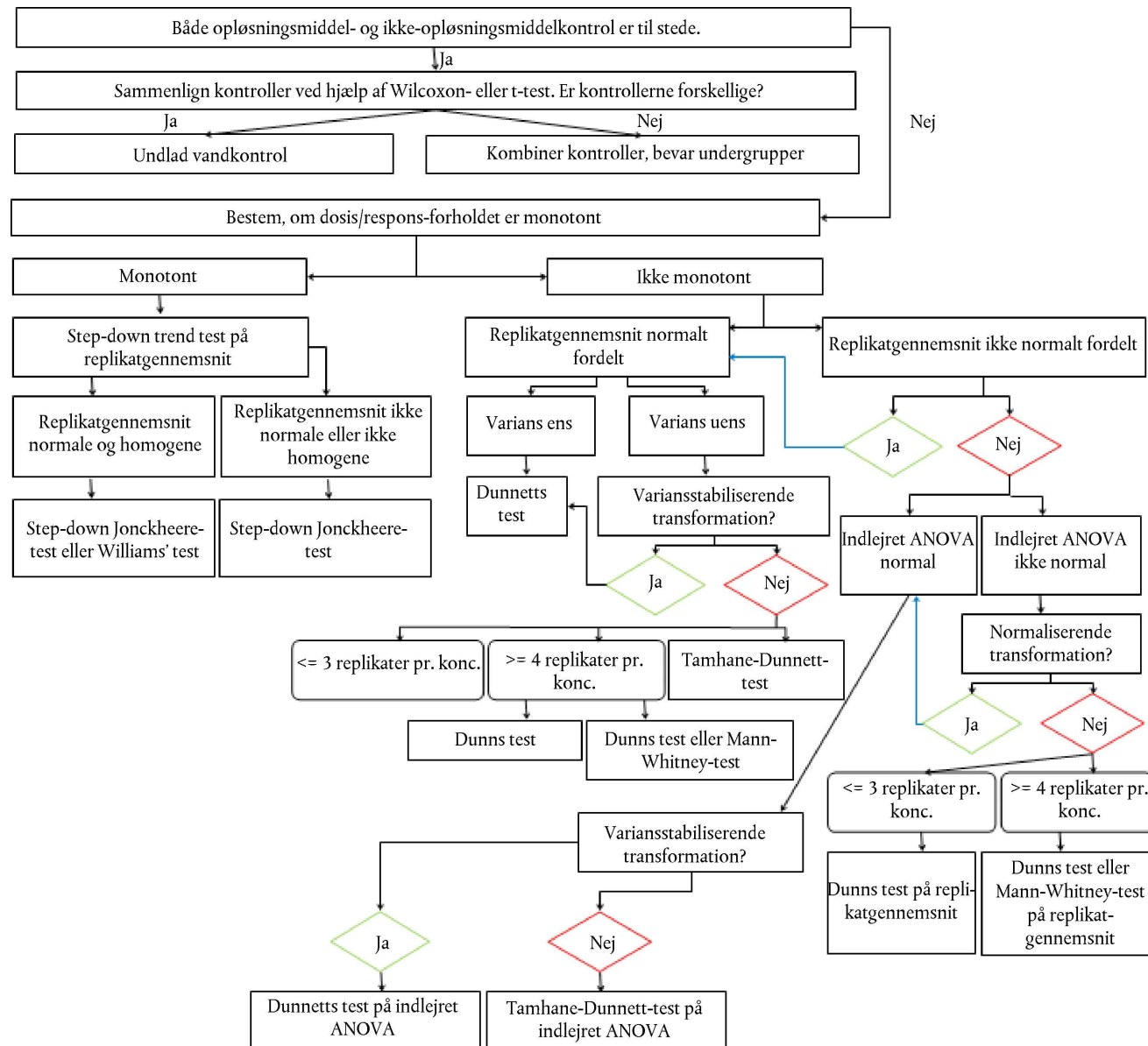
1. Farvning
 - a. Objektglas lufttørres natten over før farvning.
 - b. Snittene farves med hematoxylin-eosin.
2. Anvendelse af dækglas
 - a. Dækglas kan anvendes manuelt eller automatisk.
 - b. Et objektglas dyppes i xylen eller TissueClear, og overskydende xylen/TissueClear bankes forsigtigt af glasset.
 - c. Ca. 0,1 ml monteringsmedium påføres nær enden af objektglasset modsat den matte ende eller på dækglasset.
 - d. Dækglasset hældes i en lav vinkel, når det lægges på objektglasset.

3. Mærkning

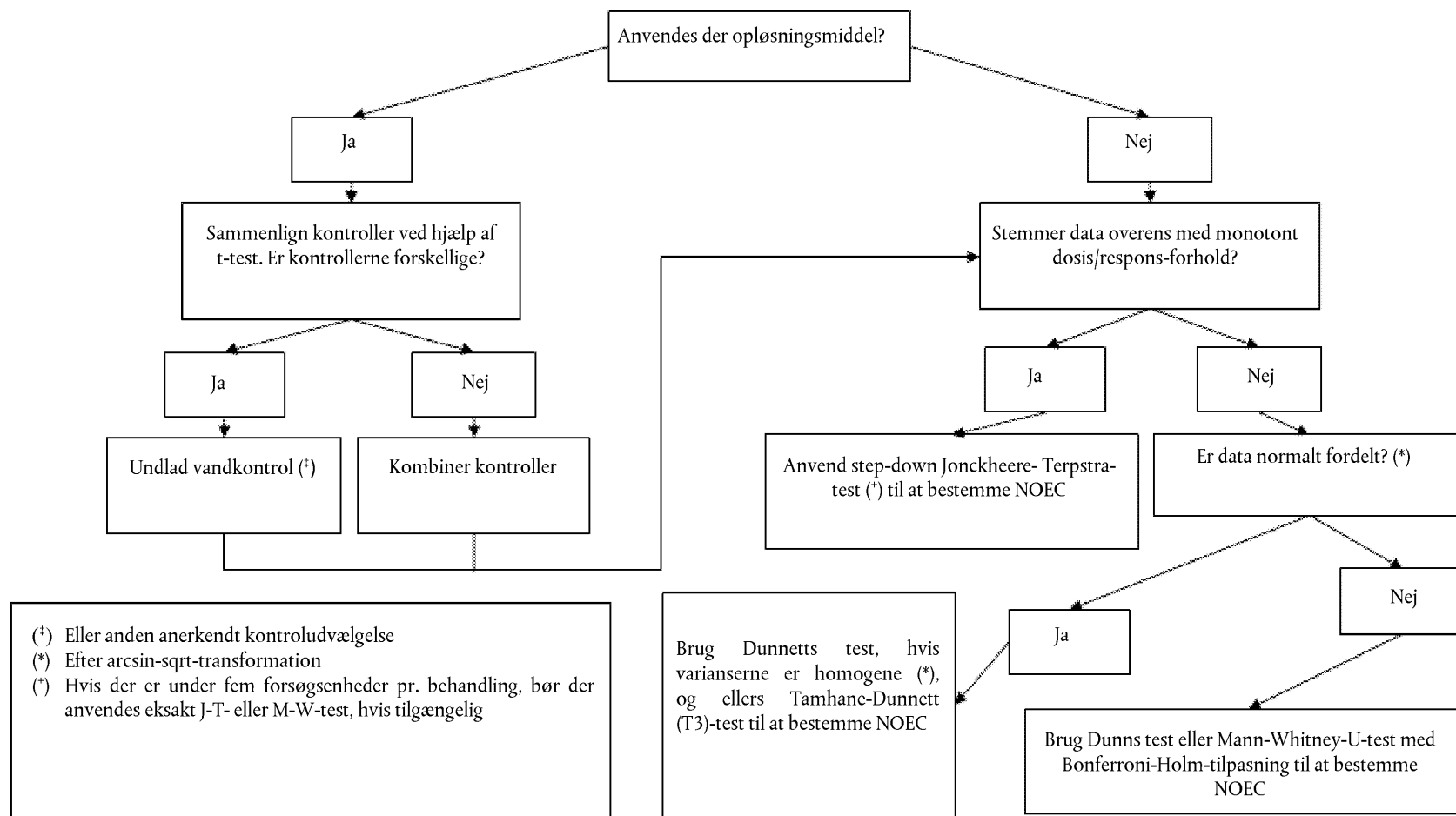
a. Hvert objektglasmærke bør indeholde følgende oplysninger.

- i. Laboratoriets navn
- ii. Art
- iii. Prøvenr./objektglasnr.
- iv. Kemikalie/behandlingsgruppe
- v. Dato:

Statistisk flowdiagram for vitellogeninanalyse



Statistisk flowdiagram for analyse af kønsfordeling



Tillæg 9

Vejledning i udtagning af vævsprøver til genetisk kønsbestemmelse og til genetisk kønsbestemmelse efter PCR-metoden**Udtagning af vævsprøver, klargøring og opbevaring før bestemmelse af genetisk køn efter PCR-metoden hos risfisk (fremstillet af Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG)**

1. Med en fin saks klippes gat- eller rygfinne af hver fisk og anbringes i et rør fyldt med 100 µl ekstraktionsbuffer 1 (se oplysninger om fremstilling af buffer nedenfor). Saksen rengøres efter hver fisk i et bæger fyldt med destilleret H₂O og tørres med en papirserviet.
2. Nu homogeniseres finnevævet i et mikrorør med teflonpistil med henblik på lysis af celler. Til hvert rør anvendes en ny pistil for at forebygge eventuel kontaminering. Pistillerne anbringes natten over i 0,5 M NaOH, skylles i fem minutter i destilleret H₂O og opbevares indtil brug i ethanol eller sterilt efter autoklavering.
3. Det er også muligt at opbevare finnevævet uden ekstraktionsbuffer 1 på tør is og siden i fryseskab ved – 80 °C for at forhindre degeneration af DNA. Men ekstraktionen forløber bedre, hvis man ekstraherer DNA samtidig (se ovenfor vedrørende håndtering. Prøver optøs på is efter opbevaring ved – 80 °C, før bufferen fyldes i rørene).
4. Efter homogenisering lægges alle rør i et vandbad og koges i 15 minutter ved 100 °C.
5. Herefter pipetteres 100 µl ekstraktionsbuffer 2 (se nærmere oplysninger om fremstilling af buffer nedenfor) i hvert rør. Prøverne opbevares ved stuetemperatur i 15 minutter, og i mellemtiden rystes de undertiden forsigtigt i hånden.
6. Efterfølgende lægges alle rør i vandbadet igen og koges i endnu 15 minutter ved 100 °C.
7. Indtil videre analyse fryses rørene ved – 20 °C.

Fremstilling af buffer:

PCR-buffer 1:

500 mg N-Lauroylsarcosin (f.eks. Merck KGaA, Darmstadt, GE)
2 ml 5M NaCl
ad 100 ml dest. H₂O
→ autoklaveres

PCR-buffer 2:

20 g Chelex (f.eks. Biorad, München, GE)
skal kvælde i 100 ml dest. H₂O
→ autoklaveres

Bestemmelse af genetisk køn (efter PCR-metoden) hos risfisk (fremstillet af Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG og Universität Würzburg Biozentrum)

De klargjorte og frosne rør (beskrevet i ovenstående afsnit) optøs på is. Herefter centrifugeres de under anvendelse af en Eppendorf-centrifuge (30 sekunder ved maksimal hastighed ved stuetemperatur). Til PCR bruges den klare supernatant separeret fra bundfaldet. Det skal absolut undgås, at eventuelle spor af Chelex (lokaliseret i bundfaldet) overføres til PCR-reaktionen, fordi dette vil forstyrre »Taq«-polymeraseaktiviteten. Supernatanten bruges direkte eller kan opbevares frosset (ved – 20 °C) og genoptøs til senere analyser over flere cyklusser uden negativ indvirkning på DNA.

1. Fremstilling af »reaktionsblandingen« (25 µl pr. prøve):

	Mængde	Slutkoncentration
DNA-template	0,5 µl-2 µl	
10 x PCR-buffer med MgCl ₂	2,5 µl	1x
Nukleotider (hver af dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Fremadrettet primer (10µM) (se nedenfor 3-5)	0,5 µl	200 nM
Bagudrettet primer (10 µM) (se nedenfor 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Vand (PCR-kvalitet)	op til 25 µl	
Taq E- Polymerase	0,3 µl	1,5U

10 x PCR-buffer med MgCl₂: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 ved 25 °C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20.

Til hver PCR (se nedenfor 3-5) er der brug for den særlige primer som en ny kombination af »reaktionsblanding« og den tilstrækkelige nødvendige mængde DNA-template til hver prøve (se ovenfor). De respektive mængder overføres til nye rør ved hjælp af pipetter. Herefter lukkes alle rør, omrøres (ca. 10 sek.) og centrifugeres (10 sek. ved stuetemperatur). Nu kan de respektive PCR-programmer startes. Der benyttes yderligere en positiv kontrol (eksemplarisk DNA-prøve med kendt aktivitet og klare resultater) og en negativ kontrol (1 µl dest. H₂O) i hvert PCR-program.

2. Fremstilling af agarosegel (1 %) — Under igangværende PCR-programmer:

- Opløs 3 g agarose i 300 ml 1 × TAE-buffer (1 % agarosegel).
- Denne opløsning koges i en mikrobølgeovn (ca. 2-3 min.).
- Overfør den varme opløsning til en særlig støbningsboks, der ligger på is.
- Efter ca. 20 min. er agarosegelen klar til brug.
- Opbevar agarosegelen i 1 × TAE-buffer indtil afslutningen af PCR-programmerne.

3. Aktin-PCR-programmet:

Denne PCR-reaktion har til formål at påvise, at DNA'et i prøven ikke er beskadiget.

— Særlig primer:

»Mact1(øvre/fremadrettet)« → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

»Mact2(nedre/bagudrettet)« → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (35-gange):

Denaturering → 45 sek. ved 95 °C

Annealing → 45 sek. ved 56 °C

Forlængelse → 1 min. ved 68 °C

15 min. 68 °C

4. X- og Y-gen-PCR-programmet:

Prøverne med intakt DNA bruges i dette PCR-program til at påvise X- og Y-gener. Hanners DNA bør vise et dobbeltbånd, mens hunners DNA bør vise et enkelt bånd (efter farvning og gelelektroforese). Til denne programafvikling inkluderes en positiv kontrol for hanner (XY-prøver) og en for hunner (XX-prøver).

— Særlig primer:

»PG 17,5« (øvre/fremadrettet) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

»PG 17,6« (nedre/bagudrettet) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (40-gange):

Denaturering → 45 sek. ved 95 °C

Annealing → 45 sek. ved 55 °C

Forlængelse → 1 min. 30 sek. ved 68 °C

15 min. 68 °C

5. Y-gen-PCR-program som »kontrol« for X- og Y-gen-PCR-programmet:

Dette PCR-program kontrollerer resultaterne af »X- og Y-gen-PCR-programmet«. »Hanprøver« bør vise et bånd, mens »hunprøver« bør ikke vise noget bånd (efter farvning og gelelektroforese).

— Særlig primer:

»DMTYa (øvre/fremadrettet)« → GGC CGG GTC CCC GGG TG

»DMTYd (nedre/bagudrettet)« → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (40-gange):

Denaturering → 45 sek. ved 95 °C

Annealing → 45 sek. ved 56 °C

Forlængelse → 1 min. ved 68 °C

15 min. 68 °C

6. Farvning af PCR-prøver:

Farvningsopløsning:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % bromphenolblå

0,25 % xylencyanol

Tilsæt 1 µl farvningsopløsning i hvert enkelt rør ved hjælp af en pipette

7. Påbegyndelse af gelelektroforesen:

— Den fremstillede 1 % agarosegel overføres i et gelelektroforesekammer fyldt med 1 × TAE-buffer

— 10-15 µl af hver farvet PCR-prøve pipetteres i en fordybning i agarosegelen.

- Der pipetteres også 5-15 µl 1kb-»Ladder« (Invitrogen) i en separat fordybning
- Start elektroforesen ved 200 V
- Stop efter 30-45 min.

8. *Bestemmelse af båndene:*

- Rens agarosegelen i destilleret H₂O.
 - Overfør nu agarosegelen i ethidiumbromid i 15-30 min.
 - Tag herefter et billede af agarosegelen i en UV-lysboks.
 - Endelig analyseres prøverne sammenlignet med det/de positive kontrolbånd og ladder.
-

Tillæg 10

Vejledning i udtagning af vævsprøver til genetisk kønsbestemmelse efter PCR-metoden hos trepigget hundestejle**Udtagning af vævsprøver og DNA-ekstraktion**

DNA kan ekstraheres ved hjælp af en række forskellige reagenser, som er tilgængelige i handlen, og både manuelle og automatiske ekstraktionssystemer. Den protokol, der benyttes ved Cefas Weymouth-laboratoriet, skitseres nedenfor, og de alternative metoder er tilføjet, hvor det er relevant.

1. Med en fin saks fjernes et lille stykke væv (10-20 mg) fra det dorsolaterale område fra hver enkelt fisk (efter at hoved og hale er fjernet til VTG-analyse). Vævet sættes i et rør og placeres enten direkte i flydende kvælstof (til opbevaring ved -80°C) eller fyldes med 70 % ethanol (til transport og efterfølgende opbevaring ved 4°C). Saksen renses efter hver fisk i 70 % ethanol, herefter i destilleret vand og tørres med en papirserviet.
2. Eventuelt ethanol fjernes ved bortsugning, og vævet udrådnes natten over med proteinase K i 400 μl ATL buffer (Qiagen). En delprøve (200 μl) af spaltningsproduktet overføres til en S-blok med 96 brønde (Qiagen), og DNA'et ekstraheres i et format med 96 brønde ved hjælp af Qiagen Universal BioRobot og Qlamp Investigator BioRobot kit. DNA'et elueres i 50 μl DNase- og RNasefrit vand. Hvis der anvendes hårdt væv til at ekstrahere DNA (såsom en hvirvelsøjle eller en brystfinne), kan det være nødvendigt at homogenisere prøven i lysisbufferen ved hjælp af en FastPrep® tissue lyser eller tilsvarende vævsnedbrydningssystem.

Alternativt

- a) Vævet udrådnes natten over med proteinase K i 400 μl G2-lysisbuffer (Qiagen), og DNA'et ekstraheres fra 200 μl af spaltningsproduktet ved hjælp af enten EZ-1 DNA easy tissue kit og EZ-1 biorobot eller DNA easy tissue mini kit. DNA'et elueres i en 50 μl volumen.
 - b) Vævene behandles med DNAzol reagens. Vævsprøverne lyseres i 1 ml DNAzol i 10 minutter i et 1,5 ml mikrocentrifugerør og centrifugeres herefter ved 13 000 rpm i 5 minutter for at fjerne eventuelle partikler. Den lyserede prøve overføres herefter til et nyt 1,5 ml mikrocentrifugerør indeholdende 500 μl 100 % ethanol af molekylærbiologisk kvalitet og centrifugeres ved 13 000 rpm i 10 minutter for at udfælde DNA'et. Ethanolen fjernes og erstattes med 400 μl 70 % ethanol af molekylærbiologisk kvalitet, centrifugeres ved 13 000 rpm i 5 minutter, og DNA-pelletten opløses i 50 μl molekylær DNase- og RNasefrit vand. Hvis der anvendes hårdt væv (brystfinne), kan det være nødvendigt at homogenisere prøven i lysisbufferen ved hjælp af en FastPrep® tissue lyser eller tilsvarende vævsnedbrydningssystem forud for ekstraheringen af DNA.
3. DNA'et opbevares ved -20°C , indtil det skal bruges.

Vigtigt: der skal bæres handsker under procedurerne.

Analyse af polymerasekædereaktion (PCR)

Der blev udført amplificeringer ved hjælp af 2,5 μl DNA-ekstrakt i et 50 μl reaktionsvolumen under anvendelse af Idh locus-primere (som beskrevet af Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Fremadrettet primer 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Bagudrettet primer 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Der findes mange leverandører af egnede PCR-reagenser. Den nedenfor skitserede metode er den, som i øjeblikket bruges på Cefas Weymouth-laboratoriet.

1. Fremstilling af »reaktionsblandingen« (50 µl pr. prøve):

En masterblanding fremstilles på følgende måde: Den kan fremstilles på forhånd og opbevares frossen ved – 20 °C, indtil den skal bruges. Der laves tilstrækkelig masterblanding til en negativ kontrol (kun vand af molekylærbiologisk kvalitet).

	Volumen (stamkonc.)/prøve	Slutkoncentration
5xGoTaq® Reaction Buffer	10 µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotider (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM hver)	250 µM hver
Fremadrettet primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Bagudrettet primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Vand af molekylærbiologisk kvalitet	30,75 l	
GoTaq polymerase	0,25 µl	1,25U

- Hæld 47,5 µl i et mærket 0,5 ml tyndvægget PCR-rør.
- Tilsæt 2,5 µl oprenset DNA til det korrekt mærkede rør. Gentag for alle prøver og den negative kontrol.
- Dryp to dråber mineralolie i overfladen. Brug alternativt en thermocycler med et opvarmet låg.
- Luk lågene.
- Prøverne blev denatureret i en Peltier PTC-225 thermocycler ved 94 ± 2 °C i 5 minutter efterfulgt af 39 cyklusser ved 94 ± 2 °C i 1 minut, 55 ± 2 °C i 1 minut, 72 ± 2 °C i 1 minut og en endelig forlængelse på 72 ± 2 °C i 10 minutter.

2. Fremstilling af agarosegel (2 %):

Traditionelt opløses PCR-produkter på en 20 % agarosegel indeholdende ethidiumbromid.

Kapillarbaserede elektroforesesystemer kan også bruges.

- Afvej 2 g agarose i 100 ml 1 × TAE-buffer.
- Opvarm agarosen i en mikroovn (ca. 2-3 min.), så den opløses.
- Tilsæt 2 dråber ethidiumbromid slutkoncentration 0,5 µg/ml.
- Overfør den varme opløsning til gelstøbningsapparatet.
- Lad gelen hærde.

3. Gelelektroforese:

- Overfør agarosegelen til elektroforeseapparatet og nedsenk i 1 × TAE-buffer.
- Hæld 20 µl af hver prøve i en separat brønd og tilsæt en molekylvægtmarkør (100bp DNA ladder, Promega) til en overskydende brønd.
- Elektroforese udføres ved 120 V i 30-45 minutter.

4. Visualisering af amplificeringsprodukter

Hvis ethidiumbromidet blev inkorporeret i agarosegelen som beskrevet ovenfor, visualiseres DNA-produkterne under en UV-kilde. Alternativt farves agarosegelen ved at dække gelen i en fortyndet ethidiumbromidopløsning (0,5 µg/ml i vand) i 30 minutter før visualisering.

Tillæg 11

Vejledning i kunstig befrugtning for trepigget hundestejle

Formålet med dette afsnit er at beskrive, ved hvilke fremgangsmåder der kan opnås befrugtede æg fra den trepiggede hundestejle med henblik på at bruge dem i FSDT.

Fremgangsmåder*Udtagning af sperm fra hannerne*

1. En han med en god farve fra den ønskede population aflives.
2. Testiklerne fridissekeres fra hver side af fisken. *Testiklerne er normalt stærkt pigmenterede, stavformede strukturer, som let kan ses ved kroppens laterale midterlinje.* Benyt en af følgende metoder:
3. Begynd ved gattet og læg med en fin saks en 1-1,5 cm incision med et enkelt klip i en vinkel på omkring 45 grader.
4. Brug en skalpel til at foretage en lille incision i fiskens side lidt bag pelvis og lige ventralt for de laterale plader.
5. Testiklerne fjernes ved hjælp af en fin pincet og anbringes i en petriskål.
6. Hver testikel dækkes med 100 µl frisklavet **Hank's final solution** (*).
7. Testiklerne skæres i fine terninger med et barberblad eller en skalpel. Dette vil frigøre spermen og give Hank's solution et mælkeagtigt udseende.
8. Væsken, som indeholder sperm, hældes i et rør, idet det tilstræbes ikke at medtage stykker af testikelvæv ved pipetteringen.
9. 800 µl Hank's final solution tilsættes til røret og blandes godt.
10. Om nødvendigt kan hannen præserveres ved fiksering i 100 % ethanol eller andet ønsket fikseringsmiddel. Dette er særligt vigtigt, hvis undersøgelsen udpeger afkommets ophav.

Vigtigt: Skønt de fleste nødvendige stamopløsninger kan fremstilles i forvejen, skal **stamopløsning 5** og den efterfølgende **slutopløsning** være **frisklavet** på brugsdagen.

Stamopløsning 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilleret vand (DV)	100 ml

Stamopløsning 2

Na ₂ HPO ₄ (vandfrit)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DV	100 ml

Stamopløsning 3

CaCl ₂	0,72 g
DV	50 ml

(*) Hank's Buffered Salt Solution (HBSS):

HBSS er nødvendig for at præservere spermen, mens befrugtningen forberedes.

Stamopløsning 4

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23 g
DV	50 ml

Stamopløsning 5 (frisklavet)

NaHCO ₃	0,35 g
DV	10 ml

Bemærk: Hvis man allerede har nogle af ovennævnte salte, men med et andet vandindhold (dvs. 2H₂O i stedet for vandfrit), kan man stadig bruge det, men først justeres vægten baseret på molekylvægt).

Til Hank's final solution kombineres i følgende rækkefølge:

Stamopløsning 1	1,0 ml
Stamopløsning 2	0,1 ml
Stamopløsning 3	0,1 ml
DV	8,6 ml
Stamopløsning 4	0,1 ml
Stamopløsning 5	0,1 ml

Bland godt inden brug.

Befrugtning

1. Store hunner med æg udtages fra den ønskede population. Hunner er først klar til udpresning, når man kan se æg stå frem fra afløbskanalen. Hunner, der er klar, har den karakteristiske holdning med hovedet op.
2. Lad forsigtigt en finger eller tommelfinger løbe langs siden af fisken ned mod halen for at fremme udstødelsen af en ægsæk i en frisk petriskål. Gentag på den anden side og læg fisken tilbage til dens kar.
3. Æggene kan spredes ud (så de danner et lag) ved hjælp af en fin malerpensel. Det er vigtigt at prøve at eksponere så mange æg som muligt for spermen, så det hjælper at gøre overfladearealet så stort som muligt. Vigtigt: Hold æggene fugtige ved at lægge en fugtig serviet omkring dem (det er vigtigt, at æggene ikke rører vand direkte, da dette kan hærde fosterhinden for tidligt og forhindre befrugtning). Der er stor variation i antallet af æg, hver hun kan producere, men i gennemsnit bør der let kunne fås omkring 150 æg fra en enkelt hun med æg.
4. 25 µl sperm i Hank's blanding fordeles jævnt over hele overfladen af æg ved hjælp af en malerpensel. Æggene vil hurtigt hærde og ændre farve (inden for et minut), når befrugtningen er begyndt. Hvis det anslåede antal æg er over 150, gentages proceduren. Tilsvarende tilsættes lidt mere sperm, hvis æggene ikke hærdet inden for et minut. Vigtigt: Det forbedrer ikke nødvendigvis befrugtningshastigheden at tilsætte mere sperm.
5. Æggene og spermopløsningen lades »interagere« i mindst 15 minutter, og de befrugtede æg anbringes i eksponeringsakvariet inden for 1,5 time efter befrugtningen.
6. Proceduren gentages med en anden hun, indtil det ønskede antal æg er udtaget.
7. Gem nogle få æg fra det sidste parti og fikser dem i 10 % eddikesyre.

Optælling og fordeling af æg i testakvarier

1. Æggene fordeles jævnt mellem hvert behandlingsniveau for at undgå genetisk skævhed. Hvert parti befrugtede æg deles i lige store grupper (så mange, som der er behandlingsniveauer) ved hjælp af et stumt instrument (dvs. en bredbladet insektpincet eller en inokuleringsløkke). Hvis man sigter efter fire replikater pr. behandling med 20 æg hver, skal der fordeles 80 æg pr. eksponeringsakvarium. Vigtigt: Det anbefales at tilsætte yderligere 20 % (dvs. 96 æg pr. behandlingsniveau), indtil man er sikker på at få 100 % befrugtning.
 2. Hundestejleæg er meget modtagelige for svampeinfektioner uden for den rede, faderen bevogter. I den forbindelse er behandling af alle æg med methylenblåt i testens første fem dage helt afgørende. En stamopløsning af methylenblåt fremstilles med 1 mg/ml og tilsættes eksponeringsakvariet for at give en maksimal slutkoncentration på 2,125 mg/l. Vigtigt: Hundestejler må ikke eksponeres for methylenblåt, når de er klækket, så systemet skal derfor være uden methylenblåt senest på dag 6.
 3. Æggene inspiceres dagligt, og eventuelt døde eller ubefrugtede æg registreres som sådanne. Vigtigt: Æggene må aldrig være uden for vand, før de klækkes, selv ikke i korte perioder.
-

C.42 BIONEDBRYDELIGHED I HAVVAND**GENEREL INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 306 (1992). Da de oprindelige testmetoder blev udviklet, vidste man ikke, i hvilken grad resultater fra screeningtest for let bionedbrydelighed under anvendelse af ferskvand og spildevand eller aktiveret slam som inokulum kunne anvendes på havmiljøet. Der er registreret forskellige resultater på dette punkt (f.eks. 1)).
2. Meget industrispildevand, som indeholder forskellige kemikalier, når enten havet ved direkte udledning eller via flodmundinger og floder, hvor opholdstiderne er lave sammenlignet med den periode, som er nødvendig for en fuldstændig bionedbrydning af mange af de tilstedeværende kemikalier. På grund af den voksende bevidsthed om behovet for at beskytte havmiljøet mod stigende mængder af kemikalier og behovet for at anslå den sandsynlige kemikaliekoncentration i havet er der udviklet testmetoder for bionedbrydelighed i havvand.
3. De her beskrevne metoder benytter naturligt havvand både som den vandige fase og som kilde til mikroorganismer. I et forsøg på at leve op til metoderne for let bionedbrydelighed i ferskvand blev brugen af ultrafiltreret og centrifugeret havvand undersøgt ligesom brugen af marine sedimenter som inokula. Disse undersøgelser lykkedes ikke. Testmediet er derfor naturligt havvand, som er forbehandlet for at fjerne grove partikler.
4. Med henblik på at vurdere fuldstændig bionedbrydelighed efter rystekolbemetoden skal der anvendes relativt høje koncentrationer af teststoffet, fordi analysemetoden med opløst organisk kulstof (DOC) har en ringe følsomhed. Dette kræver tilsætning af uorganiske næringsstoffer (N og P) til havvandet, idet vandets lave koncentrationer ellers ville begrænse fjernelsen af DOC. Det er også nødvendigt at tilsætte næringsstoffer efter Closed Bottle-metoden på grund af det tilsatte teststofs koncentration.
5. Derfor er metoderne ikke test for let bionedbrydelighed, eftersom der ikke tilsættes inokulum ud over de mikroorganismer, der allerede er til stede i havvandet. Testene simulerer heller ikke havmiljøet, eftersom der tilsættes næringsstoffer, og teststoffets koncentration er langt højere, end man ville finde i havet. Af disse årsager foreslås metoderne under en ny underafdeling »Bionedbrydelighed i havvand«.

ANVENDELSE

6. Testresultaterne, som skulle anvendes, fordi brugsmønstret for og bortskaffelsen af det pågældende stof viste en vej til havet, giver et første indtryk af bionedbrydeligheden i havvand. Hvis resultatet er positivt (> 70 % DOC-fjernelse, > 60 % ThOD — teoretisk iltforbrug), kan det konkluderes, at der er et potentiale for bionedbrydning i havmiljøet. Et negativt resultat udelukker dog ikke et sådant potentiale, men viser, at yderligere undersøgelser er nødvendig, f.eks. ved at bruge en så lav koncentration af teststoffet som muligt.
7. Hvis der kræves en mere definitiv værdi for hastigheden eller graden af bionedbrydning i havvand et bestemt sted, vil der i hvert tilfælde skulle anvendes mere komplekse og avancerede og dermed dyrere metoder. F.eks. kunne der anvendes en simuleringstest med en koncentration af teststoffet, som ligger tættere på den sandsynlige koncentration i miljøet. Der kunne også bruges ikkeberiget og ikkeforbehandlet havvand fra det interessante sted, og primær bionedbrydning kunne følges op af en specifik kemisk analyse. For fuldstændig bionedbrydelighed ville ^{14}C -mærkede stoffer være nødvendige, for at forsvindingshastigheden for opløselig organisk ^{14}C og produktionen af $^{14}\text{CO}_2$ ved miljømæssigt realistiske koncentrationer kunne måles.

VALG AF METODER

8. Hvilke metoder der skal bruges, afhænger af en række faktorer. Følgende tabel giver hjælp til at vælge. Selv om stoffer med en vandopløselighed under det, der svarer til omkring 5 mg C/l, ikke kan testes efter rystekolbemetoden, kan tungt opløselige stoffer — i hvert fald i princippet — testes efter Closed Bottle-metoden.

Tabel

Fordele og ulemper ved rystekolbetest og closed bottle-test

METODE	FORDELE	ULEMPER
RYSTEKOLBE	— enkelt apparat undtagen kulstofanalysator — 60 dages varighed er ikke noget problem — ingen forstyrrende nitrifikation — kan tilpasses flygtige stoffer	— kræver kulstofanalysator — bruger 5-40 mg DOC/l, kunne være hæmmende — DOC-bestemmelse er vanskelig ved lave koncentrationer i havvand (chlorideffekt) — DOC er undertiden høj i havvand
CLOSED BOTTLE	— enkelt apparat — enkel slutbestemmelse — bruger lav koncentration af teststof (2 mg/l) og således mindre sandsynlighed for inhibering — kan let tilpasses flygtige stoffer	— kunne være vanskeligt at opretholde flaskernes lufttæthed — bakterievækst på væggen kan føre til falske værdier — rene O₂-optagelsesværdier kan være høje, især efter 28 dage; kan løses ved ældning af havvandet — mulig forstyrrelse fra O₂-optagelse ved nitrifikation

RYSTEKOLBEMETODEN

INDLEDNING

1. Denne metode er en havvandsvariant af den modificerede OECD-screeningtest, der er beskrevet i kapitel C.4B i dette bilag (2). Den blev færdiggjort som resultat af en ringtest afholdt for Europa-Kommissionen af Vandkvalitetsinstituttet (3).
2. I lighed med den tilhørende marine closed bottle-metode skal resultaterne fra denne test ikke opfattes som indikatorer for let bionedbrydelighed, men skal bruges specifikt til at opnå information om stoffers bionedbrydelighed i havmiljøer.

METODENS PRINCIP

3. En på forhånd fastsat mængde teststof opløses i testmediet for at få en koncentration på 5-40 mg opløst organisk kulstof (DOC)/l. Hvis organiske kulstofanalysers følsomhedsgrænser forbedres, kan brugen af lavere koncentrationer af teststof være en fordel, især for inhibitoriske stoffer. Opløsningen af teststoffet i testmediet inkuberes under omrøring i mørke eller i diffus belysning under aerobe betingelser ved en fast temperatur (kontrolleret til ± 2 °C), som normalt ligger inden for intervallet 15-20 °C. I tilfælde, hvor undersøgelsens formål er at simulere situationer i miljøet, kan testene udføres over dette normale temperaturområde. Den anbefalede maksimale testvarighed er ca. 60 dage. Nedbrydning efterfølges af DOC-målinger (fuldstændig nedbrydning) og — i nogle tilfælde — af specifik analyse (primær nedbrydning).

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

4. For at vide, om testen kan anvendes på et bestemt stof, skal nogle af dets egenskaber være kendt. Stoffets organiske kulstofindhold skal fastslås, dets flygtighed skal være således, at der ikke opstår betydelige tab i løbet af testen, og dets vandopløselighed bør være større, end hvad der svarer til 25-40 mg C/l. Teststoffet må heller ikke i væsentlig grad adsorbere til glasoverflader. Oplysninger om teststoffets renhed eller forholdet mellem dets hovedbestanddele er nødvendige for, at de fundne resultater kan fortolkes, især hvis de ligger tæt på tærskelværdien.

5. Oplysninger om teststoffets toksicitet over for bakterier, f.eks. som målt i kortvarige respirationshastighedstest (4), kan være nyttige ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning. Sådanne oplysninger er dog ikke altid tilstrækkelige til at fortolke de resultater, der fås i bionedbrydningstesten, og proceduren, som er beskrevet i punkt 18, er mere egnet.

REFERENCESTOFFER

6. Egnede referencestoffer skal bruges til at kontrollere den mikrobielle aktivitet i havvandsprøven. Natriumbenzoat, natriumacetat og anilin er eksempler på stoffer, der kan bruges til dette formål. Referencestofferne skal nedbrydes inden for et rimeligt kort tidsrum, ellers anbefales det, at testen gentages under anvendelse af en anden havvandsprøve.
7. I Europa-Kommissionens ringtest, hvor der blev udtaget havvandsprøver forskellige steder og på forskellige tidspunkter på året (3), var lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % nedbrydning (t_{50}), eksklusive lag-fasen, henholdsvis 1-4 dage og 1-7 dage for natriumbenzoat. For anilin varede t_L fra 0 til 10 dage, mens t_{50} varede fra 1 til 10 dage.

METODENS REPRODUCERBARHED OG FØLSOMHED

8. Metodens reproducerbarhed blev fastslået i ringtesten (3). Den laveste teststofkoncentration, for hvilken denne metode kan bruges med DOC-analyse, bestemmes i vid udstrækning af detektionsgrænsen for den organiske kulstofanalyse (omkring 0,5 mg C/l) og den anvendte koncentration af opløst organisk kulstof i havvandet (normalt i størrelsesordenen 3-5 mg/l for vand fra åbent hav). Baggrundskoncentrationen for DOC må ikke overstige omkring 20 % af den samlede DOC-koncentration efter tilsætning af teststoffet. Hvis dette ikke kan lade sig gøre, kan baggrundskoncentrationen undertiden reduceres ved at ælde havvandet før testning. Bruges metoden kun med en specifik kemisk analyse (hvorved der måles primær nedbrydning), skal forsøgslederen ved at fremlægge yderligere oplysninger dokumentere, om fuldstændig nedbrydelighed kan forventes. Disse supplerende oplysninger kan bestå af resultater fra andre test for let eller naturlig bionedbrydelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparater

9. Sædvanligt laboratorieudstyr og:
 - a. rysteapparat beregnet til 0,5-2 liter Erlenmeyerkolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller brugt i et rum med konstant temperatur ved 15-20 °C kontrolleret til ± 2 °C
 - b. Erlenmeyerkolber med smal hals, 0,5-2 liter
 - c. apparatur til membranfiltrering eller centrifuge
 - d. membranfiltre, 0,2-0,45 μm ;
 - e. kulstofanalysator
 - f. udstyr til specifik analyse (valgfrit).

Havvand

10. Opsaml en prøve af havvand i en grundigt rengjort beholder, og transporter den til laboratoriet, helst inden for 1-2 dage efter opsamlingen. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end forsøgstemperaturen. Identificer prøvetagningsstedet nøjagtigt og beskriv det med hensyn til forurenings- og næringsmæssig status. Især for kystvand medtages i denne karakterisering et heterotroft kimtal og bestemmelse af koncentrationerne af opløst nitrat, ammonium og fosfat.

11. Oplys følgende om selve havvandet:
- prøvetagningsdato
 - prøvetagningsdybde
 - prøvens udseende — uklar osv.
 - temperatur på opsamlingsstidspunktet
 - saltindhold
 - DOC
 - frist mellem prøvetagning og brug i testen.
12. Hvis det konstateres, at DOC-indholdet i havvandsprøven er højt (punkt 8), anbefales det, at havvandet ældes i ca. en uge før brug. Æld ved opbevaring under aerobe betingelser ved testtemperatur og i mørke eller diffus belysning. Oprethold om nødvendigt aerobe betingelser ved forsigtig beluftning. Under ældning reduceres indholdet af let nedbrydeligt organisk materiale. I ringtesten (3) blev der ikke påvist forskel mellem ældede og frisk opsamlede havvandsprøvers nedbrydningspotentiale. Inden brug forbehandles havvandet for at fjerne grove partikler, f.eks. ved filtrering gennem et nylonfilter eller groft papirfilter (ikke membran- eller GF-C-filtre) eller ved sedimentering og dekantering. Den anvendte fremgangsmåde skal registreres. Foretag forbehandling efter eventuel ældning.

Stamopløsninger til uorganiske næringsstoffer

13. Fremstil følgende stamopløsninger ud fra reagenser af analysekvalitet:

a)	Kaliumdihydrogenorthosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumdihydrogenorthosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumhydrogenorthosphatdihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
b)	Calciumchlorid, CaCl_2	27,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
c)	Magnesiumsulfatheptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
d)	Jern(III)chloridhexahydrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	

Udfældning i opløsning d) kan forebygges ved at tilsætte en dråbe koncentreret HCl eller 0,4 g ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA, dinatriumsalt) pr. liter. Hvis der dannes bundfald i en stamopløsning, udskiftes den med en frisklavet opløsning.

Fremstilling af testmedium

14. Tilsæt 1 ml af hver af de ovennævnte stamopløsninger pr. liter forbehandlet havvand.

Inokulum

15. Tilsæt ikke et specifikt inokulum ud over de mikroorganismer, som allerede er til stede i havvandet. Bestem (valgfrit) antallet af kolonidannende heterotrofer i havvandstestmediet (og helst også i de oprindelige havvandsprøver), f.eks. ved pladetælling ved hjælp af marin agar. Dette er specielt ønskeligt for prøver fra kystområder eller forurenede steder. Kontroller den heterotrofe mikrobielle aktivitet i havvandet ved at foretage en test med referencestoffet.

Klargøring af kolber

16. Sørg for, at alt glasudstyr er pinligt rent, ikke nødvendigvis sterilt (f.eks. ved at bruge alkoholisk saltsyre), skyllet og tørret før brug for at undgå forurening med restprodukter fra tidligere test. Kolberne skal også rengøres før første brug.
17. Vurder teststoffer i to kolber samtidig sammen med en enkelt kolbe til referencestoffet. Foretag en dobbelt blindtest uden hverken test- eller referencestof for at bestemme analytiske blindheder. Opløs teststofferne i testmediet — de kan med fordel tilsættes via en koncentreret stamopløsning — for at give de ønskede startkoncentrationer på normalt 5-40 mg DOC/l. Test referencestoffet på normal vis ved en startkoncentration svarende til 20 mg DOC/l. Hvis der anvendes stamopløsninger af test- og/eller referencestoffer, skal det sikres, at saltindholdet af havvandsmediet ikke ændres væsentligt.
18. Hvis der kan forventes toksiske virkninger, eller hvis de ikke kan udelukkes, kan det være tilrådeligt at inkludere et dobbelt inhiberingsforsøg i testdesignet. Tilsæt test- og referencestoffer i den samme beholder, idet referencestoffets koncentration normalt skal være den samme som i kontroltesten (dvs. 20 mg DOC/l) med henblik på sammenligning.
19. Fordel passende mængder testopløsninger i Erlenmeyerkolber (op til omkring halvdelen af kolbens volumen er en passende mængde), og dæk hver kolbe løst (med f.eks. aluminiumsfolie), som muliggør gasudveksling mellem kolben og den omgivende luft. (Vatpropper er uegnede, hvis der benyttes DOC-analyse). Anbring beholderne på rysteapparatet og ryst kontinuerligt ved en forsigtig hastighed (f.eks. 100 rpm) under testen. Kontroller temperaturen (15-20 °C og inden for ± 2 °C), og beskyt beholderne mod lys for at undgå algevækst. Sørg for, at luften er fri for toksiske materialer.

Fysisk-kemisk kontroltest (valgfri)

20. Hvis der er mistanke om abiotisk nedbrydning eller tabsmekanismer, såsom hydrolyse (kun et problem med specifik analyse), fordampning eller adsorption, anbefales det at foretage et fysisk-kemisk kontrollforsøg. Dette kan gøres ved at tilsætte kviksølv(II)chlorid (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) til beholdere med teststof for at standse mikrobiel aktivitet. Et signifikant fald i DOC eller specifik stofkoncentration i den fysisk-kemiske kontroltest viser abiotiske fjernelsesmekanismer. (Hvis der bruges kviksølvchlorid, bør der fokuseres på indvirkninger eller katalysatorforgiftning i DOC-analysen.)

Antal kolber

21. I en typisk testrække anvendes følgende kolber:

Kolbe 1 og 2 indeholder teststof (testsuspension)

Kolbe 3 og 4 indeholder kun havvand (blind)

Kolbe 5 indeholder referencestof (procedurekontrol)

Kolbe 6 indeholder test- og referencestof (toksicitetskontrol) — valgfri

Kolbe 7 indeholder teststof og steriliserende stof (abiotisk steril kontrol) — valgfri

DOC-analyse

22. Udtag prøver til DOC-analyse med passende intervaller i løbet af testen (tillæg 1). Udtag altid prøver ved testens begyndelse (dag 0) og på dag 60. Mindst fem prøver i alt er nødvendige for at beskrive nedbrydningens tidsforløb. En fast tidsplan for prøvetagningen kan ikke angives, da bionedbrydningshastigheden varierer. Udfør dobbeltbestemmelse af DOC på hver prøve.

⁽¹⁾ Kviksølv(II)chlorid (HgCl_2) er et meget giftigt stof, som skal håndteres efter passende sikkerhedsforholdsregler. Væskeformigt affald, der indeholder dette kemikalie, skal bortskaffes på behørig vis og må ikke udledes i spildevandssystemet.

Prøveudtagning

23. Den nødvendige mængde prøver afhænger af analysemetoden (specifik analyse), af den anvendte kulstofanalysator og af fremgangsmåden (membranfiltrering eller centrifugering), der er valgt til prøvebehandling før kulstofbestemmelsen (punkt 25 og 26). Før prøveudtagningen sikres det, at testmediet er blandet godt, og at materiale, der eventuelt sidder fast på kolbens sider, er opløst eller opslæmmet.
24. Membranfiltrer eller centrifuger umiddelbart efter prøveudtagningen. Opbevar om nødvendigt de filtrerede eller centrifugerede prøver ved 2-4 °C i op til 48 timer eller ved under – 18 °C i længere perioder (hvis det er kendt, at stoffet forbliver upåvirket, foretages forsuring til pH 2 før opbevaring).
25. Membranfiltre (0,2-0,45 µm) er egnede, hvis det sikres, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen, f.eks. polycarbonatmembranfiltre. Nogle membranfiltre er behandlet med overfladeaktive stoffer, så de bliver mere hydrofile og kan udlede betydelige mængder opløst kulstof. Klargør disse filtre ved at koge dem i deioniseret vand i tre på hinanden følgende perioder à en time. Efter kogning opbevares filtrene i deioniseret vand. De første 20 ml af filtratet kasseres.
26. Centrifugering af prøverne kan vælges som alternativ til membranfiltrering. Centrifuger ved 40 000 m.s⁻² (~ 4 000 g) i 15 minutter, helst i en afkølet centrifuge.

Bemærk: Differentiering af det totale organiske kulstofindhold (TOC) i forhold til DOC (TOC/DOC) ved centrifugering ser ikke ud til at fungere ved meget lave koncentrationer, da enten ikke alle bakterier fjernes, eller noget af kulstoffet i bakteriernes cytoplasma genopløses. Ved højere testkoncentrationer (> 10 mg C pr. liter) ser centrifugeringsfejlen ud til at være forholdsvis lille.

Prøveudtagningsfrekvens

27. Hvis der foretages analyser umiddelbart efter prøveudtagning, vurderes det næste prøveudtagningstidspunkt ved at se på resultatet af den analytiske bestemmelse.
28. Hvis der opbevares prøver (punkt 24) til analyse på et senere tidspunkt, udtages flere prøver end det krævede minimumsantal på fem. Analyser de sidste prøver først, og gennem et trinvist »bagudrettet« valg af egnede prøver til analyse er det muligt at få en god beskrivelse af bionedbrydningskurven med et relativt lavt antal analytiske bestemmelser. Har der ikke fundet nogen nedbrydning sted ved testens afslutning, behøver der ikke blive analyseret yderligere prøver, og i denne situation kan den »bagudrettede« strategi spare betydelige omkostninger til analyse.
29. Hvis der observeres et plateau på nedbrydningskurven før dag 60, afsluttes testen. Hvis nedbrydningen tydeligvis er startet senest på dag 60, men ikke har nået et plateau, udvides forsøget i en periode mere.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

30. Registrer analyseresultaterne på det vedføjede resultatskema (tillæg 2) og beregn bionedbrydningsværdierne for både test- og referencestoffer ud fra ligningen:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

hvor:

D_t = nedbrydning i procent DOC eller specifik stoffjernelse på tidspunkt t ,

C_0 = startkoncentration af DOC eller specifikt stof i testmediet

C_t = koncentration af DOC eller specifikt stof i testmediet på tidspunkt t

$C_{bl(0)}$ = startkoncentration af DOC eller specifikt stof i blindtesten

$C_{bl(t)}$ = koncentration af DOC eller specifikt stof i blindtesten på tidspunkt t .

31. Angiv nedbrydning som procent DOC-fjernelse (fuldstændig nedbrydning) eller specifik stoffjernelse (primær nedbrydning) på tidspunkt t . Beregn DOC-koncentrationer til nærmeste 0,1 mg pr. liter, og rund gennemsnit af D_t -værdier op til nærmeste hele procent.
32. Illustrer nedbrydningsforløbet grafisk i et diagram som vist i figuren i »Validitet og fortolkning af resultater«. Hvis der er tilstrækkelige data, beregnes lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % fjernelse fra afslutningen af lag-fasen (t_{50}) på grundlag af kurven.

Testrapport

33. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

- fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata.

Testbetingelser:

- beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet, herunder forurenings- og næringsmæssig status (kimal, nitrat, ammonium og eventuelt fosfat)
- prøvens karakteristika (dato for prøvetagning, dybde, udseende, temperatur, saltindhold, DOC (valgfrit), frist mellem opsamling og brug i testen)
- (eventuelt) anvendt metode til ældning af havvandet
- anvendt metode til forbehandling (filtrering/sedimentering) af havvandet
- angivelse af den anvendte metode til DOC-bestemmelse
- anvendt metode til specifik analyse (valgfrit)
- anvendt metode til bestemmelse af antallet af heterotrofer i havvandet (pladetællingsmetode eller alternativ fremgangsmåde) (valgfrit)
- andre anvendte metoder (valgfrit) til at karakterisere havvandet (ATP-målinger osv.).

Resultater:

- analysedata registreret på et resultatskema (tillæg 2)
- forløbet af nedbrydningstesten grafisk fremstillet i et diagram, som viser lag-fase (t_L), hældning og tid (med start fra afslutningen af lag-fasen) til at nå 50 % fjernelse (t_{50}). Lag-fasen kan anslås grafisk som vist i figuren i afsnittet »Validitet og fortolkning af resultater« eller kan med fordel tages som den tid, det kræver at nå 10 % nedbrydning
- procent nedbrydning målt efter 60 dage eller ved testens afslutning.

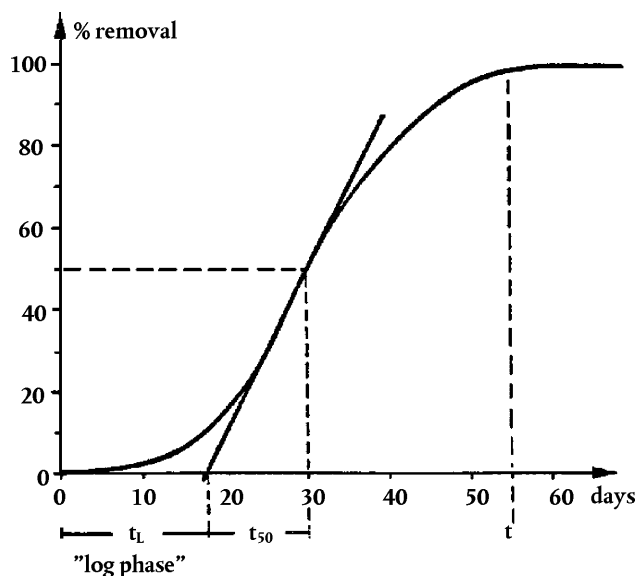
Diskussion af resultaterne

Validitet og fortolkning af resultater

34. De resultater, der opnås med referencestoffer, f.eks. natriumbenzoat, natriumacetat and anilin, bør være sammenlignelige med resultater opnået i ringtesten (3) (se afsnittet »Referencestoffer«, punkt 7). Hvis de resultater, som opnås med referencestoffer, er atypiske, gentages testen med en anden havvandsprøve. Skønt det måske ikke altid er lige enkelt at fortolke resultaterne af inhiberingstest på grund af teststoffets DOC-bidrag, er en væsentlig reduktion af den samlede DOC-fjerneshastighed sammenlignet med kontrollen et positivt tegn på toksiske virkninger.

35. På grund af de relativt høje testkoncentrationer, der anvendes sammenlignet med de fleste naturlige systemer (og som følge heraf et ugunstigt forhold mellem koncentrationer af teststoffer og andre kulstofkilder), skal metoden betragtes som en foreløbig test, der kan bruges til at vise, om et stof er let bionedbrydeligt eller ej. I overensstemmelse hermed betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt i havmiljøer, men viser, at det kræver mere arbejde, hvis det skal fastslås.

Et eksempel på et teoretisk nedbrydningsforsøg, som illustrerer en gennemførlig måde, hvorpå man kan anslå de værdier for t_L (»lag-fasens« længde) og t_{50} (tidsinterval, der starter ved t_L), som er nødvendige for at nå 50 % fjernelse, er anført i nedenstående figur.



CLOSED BOTTLE-METODEN

INDLEDNING

1. Denne metode er en havvandsvariant af closed bottle-testen (5) og blev afsluttet som resultat af en ringtest afholdt for Europa-Kommissionen af Vandkvalitetsinstituttet (3).
2. I lighed med den tilknyttede marine rystekolbemetode skal resultaterne af denne test ikke opfattes som tegn på let bionedbrydelighed, men skal bruges specifikt til at opnå information om stoffers bionedbrydelighed i havmiljøer.

METODENS PRINCIP

3. En forud fastsat mængde teststof opløses i testmediet i en koncentration på normalt 2-10 mg af teststoffet pr. liter (en eller flere koncentrationer kan bruges). Opløsningen opbevares i en fyldt lukket kolbe i mørke i et konstant temperaturløb eller -kammer, som holdes på $\pm 1^\circ\text{C}$ inden for et interval på 15-20 $^\circ\text{C}$. I de tilfælde, hvor undersøgelsens formål er at simulere situationer i miljøet, kan testene udføres over dette normale temperaturområde, forudsat at der foretages passende justeringer af temperaturstyringen. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved iltanalyse.
4. Ringtesten viste, at hvis testen blev forlænget ud over 28 dage, kunne der i de fleste tilfælde ikke indsamles nyttig information på grund af alvorlige forstyrrelser. Blindværdierne for biologisk iltforbrug (BOD) var særdeles høje, formentlig på grund af vægvækst forårsaget af manglende omrøring og nitrifikation. Den anbefalede varighed er således 28 dage, men hvis blindværdien for BOD forbliver inden for 30 %-grænsen (punkt 15 og 40), kan testen forlænges.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

5. For at vide, om testen kan anvendes på et bestemt stof, skal nogle af dets egenskaber være kendt. Den empiriske formel er nødvendig, således at det teoretiske iltforbrug (ThOD) kan beregnes (se tillæg 3), ellers skal stoffets kemiske iltforbrug (COD) bestemmes, så det kan bruges som referenceværdi. Brugen af COD er mindre tilfredsstillende, eftersom nogle af stofferne ikke iltes fuldstændigt i COD-testen.
6. Stoffets opløselighed bør være mindst 2 mg/l, om end mindre opløselige stoffer og også flygtige stoffer i princippet kunne testes (f.eks. ved hjælp af ultralydbehandling). Oplysninger om teststoffets renhed eller forholdet mellem dets hovedbestanddele er nødvendige for, at de fundne resultater kan fortolkes, især hvis de ligger tæt på tærskelværdien.
7. Oplysninger om stoffets toksicitet over for bakterier, f.eks. som målt i kortvarige respirationshastighedstest (4), kan være til nytte ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for en korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning. Sådanne oplysninger er dog ikke altid tilstrækkelige til at fortolke de resultater, der fås i bionedbrydningstesten, og fremgangsmåden, som er beskrevet i punkt 27, er mere egnet.

REFERENCESTOFFER

8. Egnede referencestoffer skal bruges til at kontrollere den mikrobielle aktivitet i havvandsprøven. F.eks. kan anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat bruges til dette formål. Disse stoffer på mindst 60 % (af deres ThOD) skal nedbrydes inden for et rimeligt kort tidsrum, ellers anbefales det, at testen gentages under anvendelse af en anden havvandsprøve.
9. I Europa-Kommissionens ringtest, hvor der blev udtaget havvandsprøver forskellige steder og på forskellige tidspunkter på året, var lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % nedbrydning (t_{50}) eksklusive lag-fasen, henholdsvis 0-2 dage og 1-4 dage for natriumbenzoat. For anilin var t_L - og t_{50} -værdierne henholdsvis 0-7 og 2-12 dage.

REPRODUCERBARHED

10. Metodernes reproducerbarhed blev fastslået i Europa-Kommissionens ringtest (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparater

11. Sædvanligt laboratorieudstyr og:
 - a) 250-300 ml BOD-kolber med glasprop eller 250 ml kolbe med smal hals og glaslåg kan anvendes
 - b) flere kolber (2-3-4 l) med litermærker til forberedelse af forsøget og til opfyldning af BOD-kolberne
 - c) vandbad eller kammer med konstant temperatur til opbevaring af kolberne ved konstant temperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$) i mørke
 - d) udstyr til analyse af opløst ilt
 - e) membranfiltre, 0,2-0,45 μm (valgfrit)
 - f) udstyr til specifik analyse (valgfrit).

Havvand

12. Opsaml en prøve af havvand i en grundigt rengjort beholder, og transporter den til laboratoriet, helst inden for 1-2 dage efter opsamlingen. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end testtemperaturen.
13. Identificer prøvetagningsstedet nøjagtigt, og beskriv det med hensyn til forurenings- og næringsstatus. Især for kystvand og forurenet farvand medtages i denne karakterisering et heterotroft kimal og bestemmelse af koncentrationer af opløst nitrat, ammonium og fosfat.
14. Oplys følgende om selve havvandet:
 - prøvetagningsdato
 - prøvetagningsdybde
 - prøvens udseende — uklarhed osv.
 - temperatur på opsamlingstidspunktet
 - saltindhold
 - opløst organisk kulstof (DOC)
 - frist mellem prøvetagning og brug i testen.
15. Såfremt det konstateres, at prøvens DOC-indhold er højt, eller hvis man mener, at blindværdien for BOD efter 28 dage vil være højere end 30 % af referencekemikaliernes, anbefales det, at havvandet ældes i ca. en uge før brug.
16. Æld prøven ved opbevaring under aerobe betingelser ved testtemperatur og i mørke eller diffus belysning. Oprethold om nødvendigt aerobe betingelser ved forsigtig beluftning. Under ældning reduceres indholdet af let nedbrydeligt organisk materiale. I ringtesten (3) blev der ikke påvist forskel mellem ældede og frisk opsamlede havvandsprøvers nedbrydningspotentialer.
17. Inden brug forbehandles havvandet for at fjerne grove partikler, f.eks. ved filtrering gennem et nylonfilter eller groft papirfilter (ikke membran- eller GF-C-filtre) eller ved sedimentering og dekantering. Registrer den anvendte fremgangsmåde. Forbehandle eventuelt efter ældning.

Stamopløsninger til uorganiske næringsstoffer

18. Fremstil følgende stamopløsninger ud fra reagenser af analysekvalitet:

a)	Kaliumdihydrogenorthosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumhydrogenorthosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumhydrogenorthosphatdihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
b)	Calciumchlorid, CaCl_2	27,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	

- c) Magnesiumsulfatheptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g

Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter

- d) Jern(III)chloridhexahydrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g

Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter

Udfældning i opløsning d) kan forebygges ved at tilsætte en dråbe koncentreret HCl eller 0,4 g ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA, dinatriumsalt) pr. liter. Hvis der dannes bundfald i en stamopløsning, udskiftes den med en frisklavet opløsning.

Fremstilling af testmedium

19. Tilsæt 1 ml af hver af de ovennævnte stamopløsninger pr. liter forbehandlet havvand. Mæt testmediet med luft ved testtemperaturen ved at belufte med ren komprimeret luft i omkring 20 minutter. Som kontrol bestemmes koncentrationen af opløst ilt. Denne mættede koncentration af opløst ilt som funktion af saltindhold og temperatur kan aflæses af det nomogram, der er vedføjet denne testmetode (tillæg 4).

Inokulum

20. Tilsæt ikke et specifikt inokulum ud over de mikroorganismer, som allerede er til stede i havvandet. Bestem (valgfrit) antallet af kolonidannende heterotrofer i havvandstestmediet (og helst også i den oprindelige havvandsprøve), f.eks. ved pladetælling ved hjælp af en marin agar. Dette er specielt ønskeligt for prøver fra kystområder eller forurenede steder. Kontroller den heterotrofe mikrobielle aktivitet i havvandet ved at foretage en test med referencestoffet.

Klargøring af testkolber

21. Udfør alle nødvendige modifikationer, bl.a. ældning og forbehandling af havvandet ved den valgte testtemperatur på 15-20 °C, idet alt glasudstyr skal være rengjort, men ikke steril.
22. Klargør parallelle grupper af BOD-kolber til samtidige forsøg med bestemmelse af BOD i test- og referencestoffer. Foretag alle analyser på to kolber (blind-, reference- og teststoffer), dvs. klargør to kolber til hver bestemmelse. Foretag som minimum analyser på dag 0, 5, 15 og 28 (fire bestemmelser). Til iltanalyser kræver fire bestemmelser i alt $3 \times 2 \times 4 = 24$ kolber (blind-, reference- og teststof) og således omkring 8 liter testmedium (til en koncentration af teststoffet).
23. Fremstil separate opløsninger af test- og referencestoffer i store kolber med tilstrækkeligt volumen (punkt 11) ved først at tilsætte test- og referencestoffer enten direkte eller ved at benytte en koncentreret stamopløsning til delvist fyldte store kolber. Tilsæt yderligere testmedium for at opnå de ønskede slutkoncentrationer. Hvis der anvendes stamopløsninger af test- og/eller referencestoffer, skal det sikres, at saltindholdet af havvandsmediet ikke ændres væsentligt.
24. Vælg koncentrationer af test- og referencestoffer ved at tage følgende i betragtning:
- a) opløseligheden af opløst ilt i havvand ved den givne testtemperatur og det givne saltindhold (se vedføjede nomogram — tillæg 4)
 - b) blindværdien af BOD i havvandet og
 - c) teststoffets forventede bionedbrydelighed.
25. Ved 15 °C og 20 °C og et saltindhold på 32 promille (havvand) ligger opløseligheden af opløst ilt på omkring henholdsvis 8,1 og 7,4 mg/l. Selve havvandets iltforbrug (respiration i en blindkontrol) kan være 2 mg O_2 /l eller derover, hvis havvandet ikke er ældet. For at sikre, at der er en signifikant iltkoncentration tilbage efter iltning af teststoffet, bruges der derfor en startkoncentration af teststoffet på omkring 2-3 mg/l (afhængigt af ThOD) for de stoffer, som forventes at blive helt nedbrudt under testbetingelserne (såsom referencestoffer). Test mindre nedbrydelige stoffer ved højere koncentrationer, op til ca. 10 mg/l, forudsat at der ikke forekommer toksiske virkninger. Det kan være en fordel at foretage parallelle test med en lav (ca. 2 mg/l) og en høj (ca. 10 mg/l) koncentration af teststoffet.

26. Der skal sideløbende bestemmes en ren værdi for ilt i kolber, som hverken indeholder test- eller referencestof.
27. Hvis der skal bestemmes inhibitoriske virkninger, klargøres følgende serie opløsninger i separate store kolber (punkt 13):
- a) 2 mg pr. liter af et letnedbrydeligt stof, f.eks. et af de nævnte referencestoffer
 - b) x mg pr. liter teststof (x er normalt 2)
 - c) 2 mg pr. liter af det letnedbrydelige stof plus x mg pr. liter teststof

Fysisk-kemisk kontroltest (valgfri)

28. Hvis muligheden for at bruge specifikke analyser benyttes, kan der foretages en fysisk-kemisk test for at kontrollere, om teststoffet fjernes ved abiotiske mekanismer, såsom hydrolyse eller adsorption. En fysisk-kemisk kontroltest kan foretages ved at tilsætte kviksølv(II)chlorid (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) til to kolber med teststof med henblik på at standse mikrobiel aktivitet. Et signifikant fald i specifik stofkoncentration i løbet af testen viser abiotiske fjernelsesmekanismer.

Antal BOD-kolber i en typisk testrække

29. I en typisk testrække anvendes følgende antal kolber:
- mindst 8, som indeholder teststof
 - mindst 8, som kun indeholder næringsberiget havvand
 - mindst 8, som indeholder referencestof, og når det er nødvendigt
 - 6 kolber, som indeholder test- og referencestoffer (toksicitetskontrol).

FREMGANGSMÅDE

30. Efter klargøringen opsuges straks hver opløsning fra den nederste fjerdedel (ikke fra bunden) af den relevante store kolbe for at fylde den respektive gruppe af BOD-kolber. Analyser straks nulkontrollerne (tid nul) for opløst ilt (punkt 33) eller opbevar dem til senere kemisk analyse ved udfældning med MnCl_2 (mangan(II)chlorid) og NaOH (natriumhydroxid).
31. Inkuber de resterende parallelle BOD-kolber ved testtemperatur (15-20 °C), opbevar i mørke og fjern fra inkubationsområdet med passende tidsintervaller (f.eks. efter 5, 15 og 28 dage som minimum) og analyser for opløst ilt (punkt 33).
32. Membranfiltrer (0,2-0,45 µm) eller centrifuger prøverne i 15 minutter til specifikke analyser (valgfrit). Opbevar i op til 48 timer ved 2-4 °C eller i længere perioder ved -18 °C, hvis de ikke analyseres straks (hvis det vides, at teststoffet vil forblive upåvirket, foretages forsuring til pH 2 før opbevaring).

Bestemmelse af opløst ilt

33. Bestem koncentrationen af opløst ilt ved hjælp af et kemikalie eller en elektrokemisk metode, der er nationalt eller internationalt anerkendt.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

34. Registrer analyseresultater på de vedføjede resultatskemaer (tillæg 5).

⁽¹⁾ Kviksølv(II)chlorid (HgCl_2) er et meget giftigt stof, som skal håndteres efter passende sikkerhedsforholdsregler. Væskeformigt affald, der indeholder dette kemikalie, skal bortskaffes på behørig vis og må ikke udledes direkte i spildevandssystemet.

35. Beregn BOD som forskellen i ilttab mellem en ren prøve og en opløsning af teststoffet under testbetingelserne. Divider netto-ilttabet med koncentrationen (vægtprocent) af stoffet for at udtrykke BOD som mg BOD/mg teststof. Nedbrydningen defineres som forholdet mellem det biokemiske iltforbrug og enten, fortrinsvis, det teoretiske iltforbrug (ThOD) eller det kemiske iltforbrug (COD) og udtrykkes i procent (se punkt 36).
36. Beregn bionedbrydningsværdierne for hvert prøvetagningstidspunkt for både test- og referencestoffer under anvendelse af en af følgende to ligninger:

$$\% \text{ bionedbrydelighed} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg testet stof}}{\text{mg ThOD}/\text{mg testet stof}} \times 100$$

$$\% \text{ bionedbrydelighed} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg testet stof}}{\text{mg COD}/\text{mg testet stof}} \times 100$$

hvor:

ThOD = teoretisk iltforbrug (beregning, tillæg 3)

COD = kemisk iltforbrug, bestemt ved forsøg.

Bemærk: Undertiden giver de to beregningsmåder (procent af ThOD eller procent af COD) ikke de samme resultater, men man skal helst bruge ThOD, da nogle stoffer ikke iltes fuldstændigt i COD-testen.

37. Illustrer forløbet af nedbrydningstesten grafisk i et diagram (se eksempel i afsnittet om »Validitet og fortolkning af resultater«). Hvis der er tilstrækkelige data, beregnes lag-fasen (t_l) og tiden til at nå 50 % fjernelse fra afslutningen af lag-fasen (t_{50}) ud fra bionedbrydningskurven.
38. Såfremt der benyttes specifik analyse (valgfrit), anføres procentdelen af primær nedbrydning som en procentdel specifik stoffjernelse inden for testperioden (korrigeret for resultater af analyse af rene kontroller).

Testrapport

39. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

- fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata.

Testbetingelser:

- beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet: forurenings- og næringsstatus (kimal, nitrat, ammonium og eventuelt fosfat)
- prøvens karakteristika (dato for prøvetagning, dybde, udseende, temperatur, saltindhold, DOC (valgfrit), frist mellem opsamling og brug i testen)
- (eventuelt) anvendt metode til ældning af havvandet
- anvendt metode til forbehandling (filtrering/sedimentering) af havvandet
- anvendt metode til COD-bestemmelse (hvis den foretages)
- anvendt metode til iltmålinger
- dispersionsprocedure for stoffer, som er tungt opløselige under testbetingelserne
- anvendt metode til bestemmelse af antallet af heterotrofer i havvandet (pladetællingsmetode eller alternativ fremgangsmåde)

- anvendt metode til bestemmelse af DOC i havvand (valgfrit)
- anvendt metode til specifik analyse (valgfrit)
- andre valgfrie metoder anvendt til at karakterisere havvandet (ATP-målinger osv.).

Resultater:

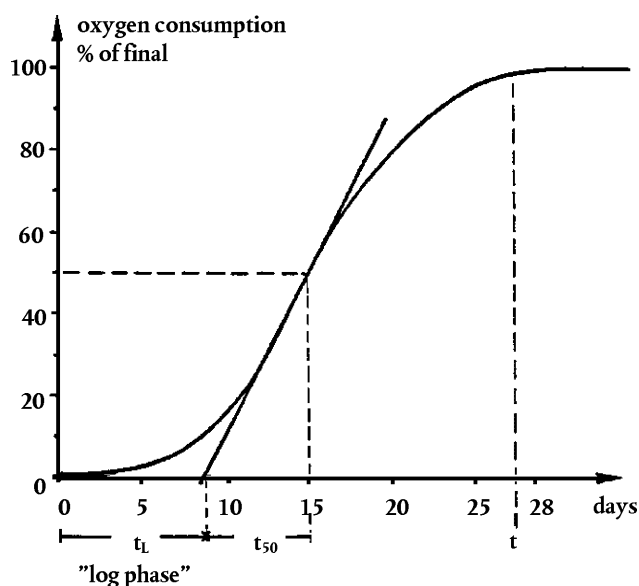
- analysedata registreret på et resultatskema (vedføjede tillæg 5)
- forløbet af nedbrydningstesten grafisk fremstillet i et diagram, som viser lag-fase, (t_L), hældning og tid (med start fra afslutningen af lag-fasen) til at nå 50 % af den endelige iltoptagelse forårsaget af iltning af teststoffet (t_{50}). Lag-fasen kan anslås grafisk som vist i vedføjede figur eller kan med fordel tages som den tid, det kræver at nå 10 % nedbrydning
- procent nedbrydning målt efter 28 dage.

Diskussion af resultaterne

Validitet og fortolkning af resultater

40. Respirationen i en ren kontrol må ikke overstige 30 % af ilten i testkolben. Hvis det ikke er muligt at opfylde dette kriterium med frisk opsamlet havvand, skal havvandet ældes (stabiliseres) før brug.
41. Muligheden for, at kvælstofholdige stoffer kan påvirke resultaterne, bør overvejes.
42. De resultater, der fås med referencestofferne natriumbenzoat og anilin, bør være sammenlignelige med de resultater, der blev opnået i ringtesten (3) (punkt 9). Hvis de resultater, som opnås med referencestoffer, er atypiske, gentages testen med en anden havvandsprøve.
43. Teststoffet kan betragtes som hæmmende for bakterier (ved den anvendte koncentration), hvis BOD for referenceblandingen og teststofferne ligger under summen af BOD i de separate opløsninger af de to stoffer.
44. På grund af de relativt høje testkoncentrationer sammenlignet med de fleste naturlige systemer og et deraf følgende ugunstigt forhold mellem koncentrationerne af teststof og andre kulstofkilder skal metoden betragtes som en foreløbig test, som kan bruges til at vise, om et stof er let bionedbrydeligt eller ej. I overensstemmelse hermed betyder et lavt resultat derfor ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt i havmiljøer, men viser, at det kræver mere arbejde, hvis det skal fastslås.

Et eksempel på et teoretisk nedbrydningsforsøg, som illustrerer en gennemførlig måde, hvorpå man kan anslå de værdier for t_L («lag-fasens» længde) og t_{50} tidsintervallet (der starter ved t_L), som er nødvendige for at nå 50 % af den endelige iltoptagelse forårsaget af iltning af teststoffet, er anført i nedenstående figur:



LITTERATUR

- (1) J.F. de Kreuk og A.O. Hanstveit (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
 - (2) Kapitel C.4-B i dette bilag: Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed, del III, modificeret OECD-screeningtest
 - (3) N. Nyholm og P. Kristensen (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, marts 1987, Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber.
 - (4) Kapitel C.11 i dette bilag: Biologisk nedbrydning — Aktiveret slam — respirationshæmningstest.
 - (5) Kapitel C.4-E i dette bilag: Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed del VI. Closed Bottle Test.
-

Tillæg 1

Bestemmelse af organisk kulstof i havvand

RYSTEKOLBEMETODEN

Til bestemmelse af organisk kulstofindhold i en vandprøve iltes de organiske forbindelser i prøven til kuldioxid normalt ved hjælp af en af følgende tre teknikker:

- vådoxidering med persulfat/UV-bestråling
- vådoxidering med persulfat/forhøjet temperatur (116-130 °C);
- forbrænding.

Der foretages en kvantitativ bestemmelse af den udviklede CO₂ under anvendelse af infrarød spektrometri eller titrimetri. Alternativt reduceres CO₂ til methan, som bestemmes kvantitativt på en infrarød flammeiondetektor (FID-analysator).

Persulfat-/UV-metoden benyttes normalt til analyse af »rent« vand med lavt partikelindhold. Sidstnævnte to metoder kan anvendes på de fleste former for vandprøver, idet iltning med persulfat-/forhøjet temperatur er mest egnede til prøver med lavt niveau, og forbrændingsteknikken anvendes til prøver med et ikkeflygtigt organisk kulstofindhold (NVOC) noget over 1 mg C/l.

Indvirkninger

Alle tre metoder afhænger af, at det uorganiske kulstof (IC) i prøven fjernes, eller at der kompenseres for det. Udskilning af CO₂ fra den forsurede prøve er den oftest anvendte metode til at fjerne IC, skønt dette også resulterer i et tab af flygtige organiske forbindelser (1). Den fuldstændige fjernelse af eller kompensation for IC skal sikres for hver enkelt prøvematrix, og flygtigt organisk kulstof (VOC) skal bestemmes ud over NVOC afhængigt af prøvetype.

Høje chloridkoncentrationer resulterer i lavere iltningseffektivitet ved hjælp af persulfat-/UV-metoden (2). Anvendelse af en ilttingsreagens modificeret ved tilsætning af kviksølv(II)nitrat kan dog fjerne denne indvirkning. Det anbefales, at det maksimalt tolererede prøvevolumen benyttes til at vurdere hver enkelt type chloridholdige prøve. Høje saltkoncentrationer i prøver, som analyseres ved hjælp af forbrændingsmetoden, kan forårsage saltbelægning af katalysatoren og for stor ætsning af forbrændingsrøret. Der skal tages forholdsregler ifølge producentens manual.

Stærkt uklare prøver samt partikelholdige prøver kan være ufuldstændigt iltede, når persulfat-/UV-metoden anvendes.

Et eksempel på en egnet metode

Ikkeflygtigt organisk kulstof bestemmes ved iltning med persulfat og UV-bestråling og efterfølgende kvantitativ bestemmelse af den udviklede CO₂ under anvendelse af ikkedispersiv infrarød spektrometri.

Ilttingsreagensen modificeres i overensstemmelse med forslagene i (2) som beskrevet i producentens manual:

- a) 8,2 g HgCl₂ og 9,6 g Hg(NO₃)₂ · H₂O opløses i flere hundrede milliliter reagensvand med lav kulstofkoncentration
- b) 20 g K₂S₂O₈ opløses i kviksølvsaltopløsningen
- c) 5 ml HNO₃ (konc.) tilsættes blandingen
- d) reagensen fortyndes til 1 000 ml.

Indvirkningen fra chlorid fjernes ved hjælp af et 40 µl prøvevolumen til 10 % chlorid og 200 µl prøvemængde til 1,9 % chlorid. Prøver på høje chloridkoncentrationer og/eller større prøvevoluminer kan analyseres ifølge denne metode, forudsat at chloridopbygning i iltningsskålen forhindres. Flygtigt organisk kulstof kan efterfølgende bestemmes for den pågældende prøve, hvis det er relevant.

LITTERATUR

- (1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16. januar 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Også af interesse (giver en beskrivelse af et automatiseret analysesystem):

- (3) W. Schreurs (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

Tillæg 2

Bionedbrydning i havvand

RYSTEKOLBEMETODEN

RESULTATSKEMA

1. **LABORATORIUM:**
2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE:**
3. **TESTSTOF:**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: mg/l som stof

Startkoncentration i mediet, t_0 : mg/l som stof

: mg DOC/l

4. **HAVVAND:**

Kilde:

Opsamlingsdato:

Prøvetagningsdybde:

Udseende på prøvetagningstidspunktet (f.eks. uklar osv.):

Saltindhold ved prøvetagningen: ‰

Temperatur ved prøvetagningen: °C

DOC »x« timer efter prøvetagningen: mg/l

Forbehandling forud for testning (f.eks. filtrering, sedimentering, ældning osv.):

Kimtal — oprindelig prøve: kolonier/ml

— ved testens begyndelse: kolonier/ml

Andre karakteristika:

5. KULSTOFBESTEMMELSER:

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Test: næringsberiget havvand med teststof	1	a ₁					
		a ₂					
		middel, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		middel, C _{b(t)}					
Blindprøve: næringsberiget havvand uden teststof	1	c ₁					
		c ₂					
		middel, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		middel, C _{d(t)}					
	middel, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VURDERING AF RÅDATA:

Kolbe nr.	Beregning af resultaterne	% nedbrydning efter n dage				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Middel (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Der beregnes ikke gennemsnit af D₁ og D₂, hvis der er en betydelig forskel.

Bemærk: Der kan benyttes lignende opstillinger, når nedbrydning efterfølges af specifik analyse, og til referencestof og toksicitetskontroller.

7. **ABIOTISK NEDBRYDNING (valgfri)**

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

Tillæg 3

Beregning af teoretisk biokemisk iltforbrug

CLOSED BOTTLE-METODEN

ThOD for stoffet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvægten MW beregnes ifølge:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Denne beregning indebærer, at C mineraliseres til CO_2 , H til H_2O , P til P_2O_5 og Na til Na_2O . Halogen fjernes som hydrogenhalid og kvælstof som ammoniak.

Eksempel:

Glukose $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glukose}$$

Molekylvægt af andre salte end alkalimetallere beregnes ud fra antagelsen om, at saltene er blevet hydrolyseret.

Svovl antages at blive iltet til + 6.

Eksempel:

Natrium n-dodecylbenzensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg stof}$$

I tilfælde af kvælstofholdige stoffer kan kvælstoffet fjernes som ammoniak, nitrit eller nitrat svarende til forskelligt teoretisk biokemisk iltforbrug.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

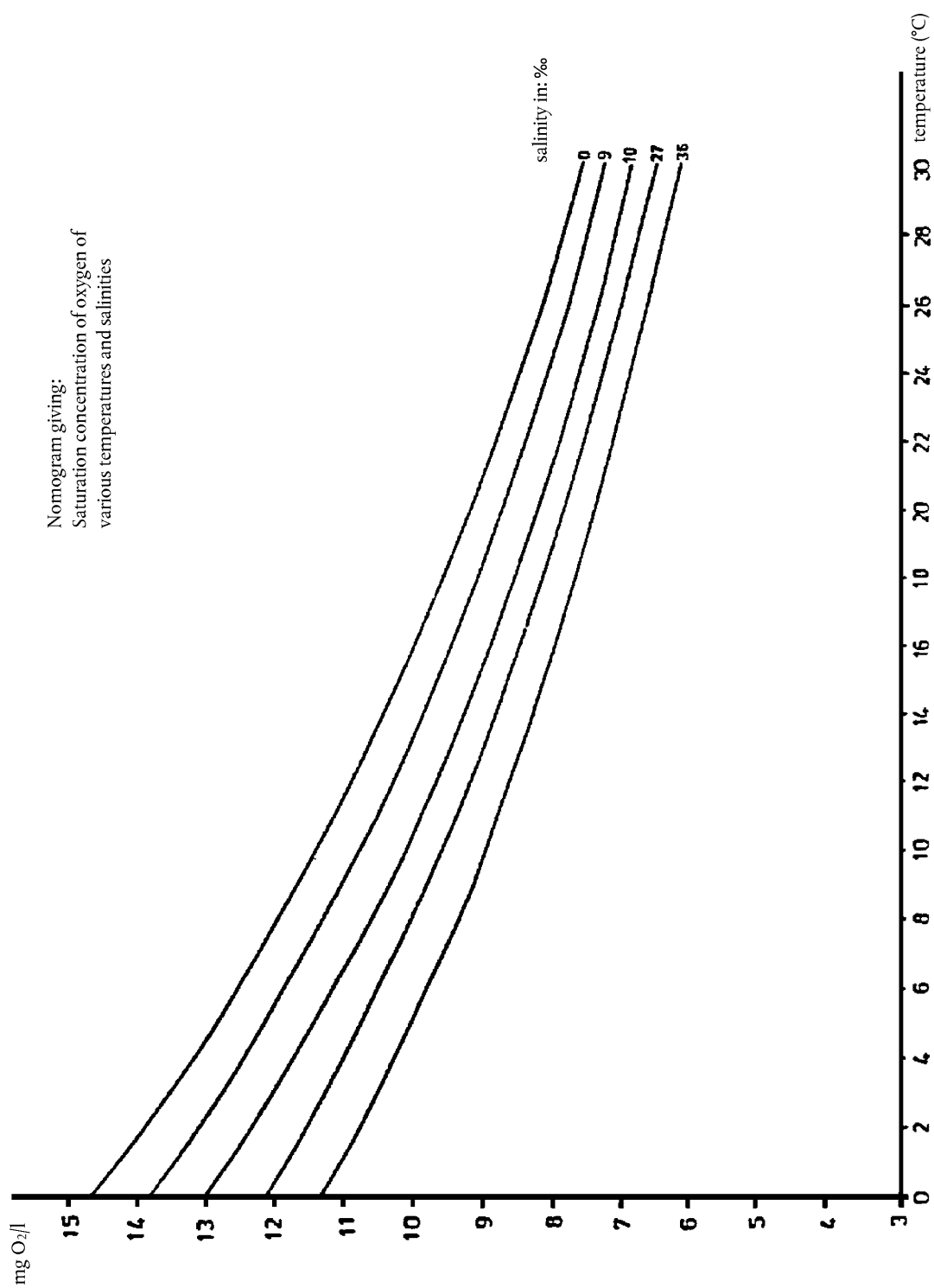
$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Hvis en fuldstændig nitratdannelse var observeret ved analyse i tilfælde af et sekundært amin:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg stof}$$

Tillæg 4



Tillæg 5

Bionedbrydning i havvand

CLOSED BOTTLE-METODEN

RESULTATSKEMA

1. **LABORATORIUM:**
2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE:**
3. **TESTSTOF:**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: mg/l
 Startkoncentration i havvandsmedium: mg/l
 ThOD eller COD: mg O₂/mg teststof

4. **HAVVAND:**

Kilde:

Opsamlingsdato:

Prøvetagningsdybde:

Udseende på prøvetagningstidspunktet (f.eks. uklar osv.):

Saltindhold ved prøvetagningen: ‰
 Temperatur ved prøvetagningen: °C
 DOC »x« timer efter prøvetagningen: mg/l

Forbehandling forud for testning (f.eks. filtrering, sedimentering, ældning osv.):

Kimtal — oprindelig prøve: kolonier/ml
 — ved testens begyndelse: kolonier/ml

Andre karakteristika:

5. **TESTMEDI:**

Temperatur efter beluftning: °C
 O₂-koncentration efter beluftning og henstand før påbegyndelse af testen: mg O₂/l

6. **DO-BESTEMMELSE:**

Metode: Winkler/elektrode

	Kolbe nr.		mg O ₂ /l efter n dage			
			0	5	15	28
Test: næringsberiget havvand med teststof	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Gennemsnit test-værdi	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Kolbe nr.		mg O ₂ /l efter n dage			
			0	5	15	28
Blindprøve: næringsberiget havvand, men uden teststof	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Gennemsnit blind-værdi	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Bemærk: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencestoffet og toksicitetskontrollerne.

7. **TAB AF DO: % NEDBRYDNING (% D):**

	Tab af DO efter n dage		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ ⁽¹⁾			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) \text{ (l)}}{\text{teststof (mg /l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

⁽¹⁾ Dette forudsætter, at $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, hvor

$m_{b(0)}$ = blindværdi på dag 0

$m_{t(0)}$ = teststofværdi på dag 0.

Hvis $m_{b(0)}$ ikke er lig med $m_{t(0)}$, benyttes $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, hvor

$m_{b(x)}$ = blindværdi på dag x

$m_{t(0)}$ = teststofværdi på dag x.

C.43. ORGANISKE STOFFERS ANAEROBE BIONEDBRYDELIGHED I UDRÅDNET SLAM: VED MÅLING AF GASPRODUKTION**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 311 (2006). Der findes en række screeningtest til vurdering af organiske stoffers aerobe bionedbrydelighed (testmetode C.4, C.9, C.10 og C.11 (1) og OECD TG 302C (2)), og resultaterne af at anvende disse er blevet brugt med succes til at forudsige stoffers skæbne i aerobt miljø, især i de aerobe stadier af spildevandsrensningen. Forskellige mængder af vandopløselige stoffer samt stoffer, der adsorberer til fast affald, behandles også aerobt, eftersom de er til stede i bundfældet spildevand. De større fraktioner af disse stoffer bindes dog til primært bundfældet slam, der skilles fra ubearbejdet spildevand i bundfældningstanke, før det bundfældede spildevand, eller supernatanten, behandles aerobt. Slammet, som indeholder nogle af de opløselige stoffer i den interstitielle væske, føres herefter til opvarmede rådnetanke med henblik på anaerob behandling. Indtil nu findes der ingen test i denne række til vurdering af anaerob bionedbrydelighed i anaerobe rådnetanke, og denne test har til formål at fylde dette tomrum. Den kan ikke nødvendigvis anvendes på andre anoxiske delmiljøer.
2. Respirometriske metoder til at måle mængderne af produceret gas, især (CH_4) og kuldioxid (CO_2), under anaerobe betingelser er blevet brugt med succes til at vurdere anaerob bionedbrydelighed. Birch et al. (3) gennemgik disse fremgangsmåder og konkluderede, at Shelton og Tiedjes (4) arbejde baseret på tidligere undersøgelser (5)(6)(7) var det mest omfattende. Metoden (4), som blev videreudviklet af andre (8) og er blevet amerikanske standarder (9)(10), løste ikke problemerne med CO_2 's og CH_4 's forskellige opløselighed i testmediet og beregningen af et teststofs teoretiske gasproduktion. I ECETOC-rapporten (3) anbefaledes den supplerende måling af opløst uorganisk kulstofindhold (DIC) i den ovenstående væske, hvilket gjorde teknikken mere bredt anvendelig. ECETOC-metoden blev underkastet en international kalibrering (eller ringtest) og blev ISO-standard, ISO 11734 (11).
3. Denne testmetode, som er baseret på ISO 11734 (11), beskriver en screeningsmetode til vurdering af organiske stoffers potentielle anaerobe bionedbrydelighed under en bestemt betingelse (dvs. i en anaerob rådnetank på et givet tidspunkt og ved en given koncentration af mikroorganismer). Fordi der anvendes fortyndet slam med en relativt høj teststofkoncentration, og testen typisk varer længere end retentionstiden i anaerobe rådnetanke, svarer testbetingelserne ikke nødvendigvis til betingelserne i anaerobe rådnetanke, og testen kan heller ikke anvendes til vurdering af organiske stoffers anaerobe bionedbrydelighed under forskellige miljøbetingelser. Slam eksponeres for teststoffet i op til 60 dage, hvilket er længere end den normale slamretentionstid (25-30 dage) i anaerobe rådnetanke, selv om retentionstiderne kan være meget længere på industriområder. Der kan ikke forudsiges noget på grundlag af resultaterne af denne test med samme vægt, som det er tilfældet med aerob bionedbrydning, eftersom den eksisterende dokumentation om teststoffernes egenskaber i »let« aerobe test og i simulationstest og det aerobe miljø er tilstrækkelig til at have tiltro til, at der er en forbindelse. Der findes kun lidt tilsvarende dokumentation for det anaerobe miljø. En fuldstændig anaerob bionedbrydelighed kan antages at forekomme, hvis der opnås 75-80 % teoretisk gasproduktion. De høje forhold mellem stof og biomasse, der er brugt i disse test, betyder, at et stof, der går igennem, har højere sandsynlighed for at blive nedbrudt i en anaerob rådnetank. Endvidere forefindes de stoffer, som ikke omdannes til gas i testen, måske ikke nødvendigvis ved mere miljømæssigt realistiske forhold mellem stof og biomasse. Andre anaerobe reaktioner forekommer også, hvorved stoffer kan blive i hvert fald delvist nedbrudt, f.eks. ved afchlorering, men denne test påviser ikke sådanne reaktioner. Ved at anvende specifikke analysemetoder til at bestemme teststoffet kan dets forsvinden dog overvåges (se punkt 6, 30, 44 og 53).

PRINCIP FOR TESTEN

4. Vasket udrådnet slam ⁽¹⁾, som indeholder lave (< 10 mg/l) koncentrationer af uorganisk kulstof (IC), fortyndes omkring ti gange til en samlet koncentration af faste stoffer på 1 g/l til 3 g/l og inkuberes ved 35 °C ± 2 °C

⁽¹⁾ Udrådnet slam er en blanding af de bundfældede faser af spildevandsslam og aktiveret slam, der er blevet inkuberet i en anaerob rådnetank ved omkring 35 °C for at reducere biomasse- og lugtproblemer og forbedre slammets afvandingsevne. Det består af en sammensætning af anaerobe fermentative og methandannende bakterier, som producerer kuldioxid og methan (11).

i lukkede beholdere med teststoffet ved 20-100 mg C/l i op til 60 dage. Der er mulighed for at måle slamaktiviteten ved at foretage parallelle blindkontroller med inokulum af slam i mediet, men uden teststof.

5. Stigningen i headspace trykket i beholderne som følge af produktionen af kuldioxid og methan måles. Meget af den producerede CO_2 vil blive opløst i væskefasen eller omdannet til carbonat eller hydrogencarbonat under testbetingelserne. Dette uorganiske kulstof måles ved afslutningen af testen.
6. Mængden af kulstof (uorganisk plus methan) fra bionedbrydningen af teststoffet beregnes ud fra nettogasproduktionen og nettodannelsen af IC i væskefasen ud over blindkontrolværdierne. Bionedbrydningens omfang beregnes ud fra den samlede mængde IC og methan-C, som produceres, i procent af den målte eller beregnede mængde kulstof, der tilsættes som teststof. Forløbet af bionedbrydningen kan følges ved kun at foretage mellemliggende målinger af gasproduktionen. Yderligere kan den primære bionedbrydning bestemmes ved specifikke analyser ved testens begyndelse og afslutning.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

7. Testkemikaliet's renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Teststoffets organiske kulstofindhold (vægtprocent) skal være kendt enten fra sin kemiske struktur eller ved måling. For flygtige teststoffer kan en målt eller beregnet Henrys lovkonstant bruges til at afgøre, om testen kan anvendes. Information om teststoffets toksicitet over for anaerobe bakterier kan bruges til at vælge en passende testkoncentration og fortolke resultater, der påviser lav bionedbrydelighed. Kontrol for hæmning bør medtages, medmindre det er påvist, at teststoffet ikke hæmmer anaerobe mikrobielle aktiviteter (se punkt 21 og ISO 13641-1 (12)).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

8. Testmetoden kan anvendes på vandopløselige stoffer og kan også anvendes på tungtopløselige og uopløselige stoffer, forudsat at der benyttes en metode med nøjagtig dosering, se f.eks. ISO 10634 (13). Generelt skal der for flygtige stoffer træffes en beslutning for hvert enkelt stof. Der skal måske træffes særlige foranstaltninger for f.eks. ikke at frigive gas under testen.

REFERENCESTOFFER

9. For at kontrollere fremgangsmåden testes et referencestof ved at opstille egnede beholdere parallelt som led i de almindelige testforløb. Phenol, natriumbenzoat og polyethylenglycol 400 er eksempler og forventes at nedbrydes med over 60 % teoretisk gasproduktion (dvs. methan og uorganisk kulstof) inden for 60 dage (3)(14).

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. I en international ringtest (14) var der god reproducerbarhed i gaskoncentrationer mellem tre beholdere. Den relative standardafvigelse (variationskoefficient, CV) var hovedsagelig under 20 %, skønt denne værdi ofte steg til > 20 % i nærværelse af toksiske stoffer eller hen imod slutningen af den 60 dages inkubationsperiode. Højere afvigelser blev også påvist i beholdere med et volumen på < 150 ml. Endelige pH-værdier for testmediet lå i området 6,5-7,0.

11. Følgende resultater blev opnået i ringtesten:

Teststof	Samlede data n_1	Gennemsnitlig nedbrydning (af samlede data) (%)	Relativ standard-afvigelse (af samlede data) (%)	Valide data n_2	Gennemsnitlig nedbrydning (af valide data) (%)	Relativ standard-afvigelse (af valide data) (%)	Data > 60 % Nedbrydning i valide test n_3
Palmitinsyre	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyethylen Glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Andel af n_2

12. Variationskoefficienterne af gennemsnittet for alle værdier opnået med palmitinsyre og polyethylenglycol 400 var helt oppe på henholdsvis 45 % ($n = 36$) og 35 % ($n = 38$). Når værdier på < 40 % og > 100 % blev udeladt (den førstnævnte antages at skyldes suboptimale betingelser, sidstnævnte har ukendte årsager), blev CV'erne reduceret til henholdsvis 26 % og 23 %. Andelen af »valide« værdier, der nåede mindst 60 % nedbrydning, var 70 % for palmitinsyre og 83 % for polyethylenglycol 400. Andelene af den procentvise bionedbrydning, der stammer fra DIC-målinger, var relativt lave, men variable. For palmitinsyre var området 0-35 %, gennemsnittet 12 %, med CV på 92 % og for polyethylenglycol 400 0-40 %, gennemsnit 24 %, med CV på 54 %.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparater

13. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:

- inkubator — gnistsikker og styret til $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- trykmodstandsdygtige testbeholdere af glas med en passende nominel størrelse ⁽¹⁾, hver udstyret med et gastæt låg, som kan modstå ca. 2 bar. Headspacevolumen bør være omkring 10-30 % af det samlede volumen. Hvis der jævnlige udledes biogas, er omkring 10 % headspacevolumen passende, men hvis der kun udledes gas ved afslutningen af testen, er 30 % passende. Serumflasker af glas med et nominelt volumen på 125 ml, og et samlet volumen på ca. 160 ml, forseglet med serumflaskesepta ⁽²⁾ og crimplåg (aluminiumsringe) anbefales, når trykket udløses på hvert prøvetagningstidspunkt
- trykmåler ⁽³⁾, der er tilpasset til at kunne måle og udlufte den producerede gas, f.eks. en håndholdt præcisionstrykmåler, som er forbundet med en passende kanyler; en gastæt trevejsventil letter frigivelsen af overtryk (tillæg 1). Det er nødvendigt at holde det indre volumen i tryktransducerrør og -ventil så lavt som muligt, således at fejl, der opstår, hvis der ikke tages hensyn til udstyrets volumen, bliver ubetydelige

⁽¹⁾ Den anbefalede størrelse er 0,1-1,0 liter.

⁽²⁾ Det anbefales at bruge gastætte silikonesepta. Det anbefales desuden, at lågenes gastæthed, navnlig septa af butylgummi, testes, da flere kommercielt tilgængelige septa ikke er tilstrækkeligt gastætte mod methan, og visse septa ikke forbliver tætte, når de gennembøres med en nål under testbetingelserne.

⁽³⁾ Måleren bør bruges og kalibreres med regelmæssige mellemrum i henhold til producentens anvisninger. Hvis der bruges en trykmåler af den foreskrevne kvalitet, f.eks. indkapslet med en stålmembran, er det ikke nødvendigt med kalibrering i laboratoriet. Kalibreringens nøjagtighed kan kontrolleres i laboratoriet med en etpunktsmåling ved 1×10^5 Pa i forhold til en trykmåler med mekanisk display. Når dette punkt måles korrekt, vil lineariteten også være uændret. Hvis der bruges andet måleudstyr (uden certificeret kalibrering hos producenten), anbefales kalibrering i hele området med regelmæssige mellemrum.

Bemærk — Trykflæsningerne bruges direkte til at beregne mængden af kulstof produceret i headspacet (punkt 42-44). Alternativt kan trykflæsningerne omregnes til volumener (ved 35 °C atmosfærisk tryk) produceret gas ved hjælp af en omregningskurve. Denne kurve konstrueres på grundlag af data, som fremkommer ved at indsprøjte et kendt volumen kvælstofgas ind i en række testbeholdere (f.eks. serumflasker) med en temperatur på 35 ° +/- 2 °C, og registrere de deraf følgende stabiliserede trykflæsninger (se tillæg 2). Beregningen vises i bemærkningen i punkt 44.

Advarsel — Pas på nålestikskader ved brug af mikrosprøjter.

- d. kulstofanalysator egnet til direkte bestemmelse af uorganisk kulstof i området 1 mg/l til 200 mg/l
- e. sprøjter med høj præcision til gasformige og flydende prøver
- f. magnetomrørere og stangmagneter (valgfrit)
- g. handskekasse (anbefales).

Reagenser

14. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen.

Vand

15. Brug destilleret eller deioniseret vand (afiltet ved at gennemoble med kvælstofgas indeholdende under 5 µl/l ilt), som indeholder under 2 mg/l opløst organisk kulstof (DOC).

Testmedium

16. Fortyndingsmediet fremstilles således, at det indeholder følgende bestanddele i de angivne mængder:

Vandfrit kaliumdihydrogenfosfat, (KH ₂ PO ₄)	0,27 g
Dinatriumhydrogenfosfatdodecahydrat (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O))	1,12 g
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	0,53 g
Calciumchloriddihydrat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0,075g
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0,10 g
Jern(II)chloridtetrahydrat (FeCl ₂ · 4H ₂ O)	0,02 g
Resazurin (iltindikator)	0,001 g
Natriumsulfidnonahydrat (Na ₂ S · 9H ₂ O)	0,10 g
Stamopløsning af sporstoffer (valgfrit, punkt 18)	10 ml
Tilsæt afiltet vand (punkt 15)	til 1 liter

Bemærk: Brug frisk natriumsulfid, eller vask og tør det før brug for at sikre, at det har tilstrækkelig reducerende kapacitet. Testen kan udføres uden brug af handskekasse (se punkt 26). I så fald øges slutkoncentrationen af natriumsulfid i mediet til 0,20 g Na₂S · 9H₂O pr. liter. Natriumsulfid kan også tilsættes fra en passende anaerob stamopløsning gennem septum på de lukkede testbeholdere, eftersom denne fremgangsmåde vil mindske risikoen for iltning. Natriumsulfid kan erstattes af titanium(III)citrat, som tilsættes gennem septum af de lukkede testbeholdere ved en slutkoncentration på 0,8-1,0 mmol/l. Titanium(III)citrat er et meget effektivt

reduktionsmiddel med lav toksicitet, der fremstilles som følger: Opløs 2,94 g trinatriumcitratdihydrat i 50 ml afiltet vand (hvilket giver en opløsning på 200 mmol/l), og tilsæt 5 ml 15 % (vægtprocent) titanium(III)chloridopløsning. Neutraliser til pH $7 \pm 0,2$ med mineralsk alkali, og hæld i en passende beholder med en strøm af kvælstof. Koncentrationen af titanium(III)citrat i denne stamopløsning er på 164 mmol/l.

17. Bland bestanddelene i testmediet undtagen reduktionsmidlet (natriumsulfid titaniumcitrat) og sprøjt opløsningen med kvælstofgas i ca. 20 min. umiddelbart før brug for at fjerne ilten. Tilsæt herefter en passende mængde frisk fremstillet opløsning af reduktionsmidlet (fremstillet af afiltet vand), lige før mediet skal bruges. Tilpas eventuelt mediets pH med fortyndet uorganisk syre eller alkali til $7 \pm 0,2$.

Stamopløsning af sporstoffer (valgfrit)

18. Testmediet bør indeholde følgende sporstoffer for at øge anaerobe nedbrydningsprocesser, især hvis der benyttes lave koncentrationer (f.eks. 1 g/l) af inokulum (11).

Manganchloridtetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Borsyre (H_3BO_3)	5 mg
Zinkchlorid (ZnCl_2)	5 mg
Kobber(II)chlorid (CuCl_2)	3 mg
Dinatriummolybdatdihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Cobaltchloridhexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Nikkelchloridhexahydrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Tilsæt afiltet vand (punkt 15)	til 1 liter

Teststof

19. Tilsæt teststoffet som en stamopløsning, suspension, emulsion eller direkte som fast eller flydende stof eller absorberet på et glasfiberfilter for at få en koncentration på højst 100 mg/l organisk kulstof. Hvis der anvendes stamopløsninger, fremstilles en egnet opløsning med vand (punkt 15) (tidligere afiltet ved at besprøjtning med kvælstofgas) af en sådan styrke, at det tilsatte volumen er mindre end 5 % af den samlede mængde reaktionsblanding. Tilpas eventuelt stamopløsningens pH til pH $7 \pm 0,2$. Er der tale om teststoffer, som ikke er tilstrækkeligt opløselige i vand, henvises til ISO 10634 (13). Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, klargøres en supplerende kontrol, hvor der kun tilsættes opløsningsmiddel til det inokulerede medium. Organiske opløsningsmidler, som er kendt for at hæmme methanproduktionen, såsom chloroform og carbontetrachlorid, bør undgås.

Advarsel — Toksiske teststoffer og stoffer, hvis egenskaber er ukendte, skal håndteres forsigtigt.

Referencestoffer

20. Referencestoffer, såsom natriumbenzoat, phenol og polyethylenglycol 400 er blevet brugt med held til at kontrollere fremgangsmåden, idet de nedbrydes over 60 % inden for 60 dage. Fremstil en stamopløsning (i afiltet vand) af det valgte referencestof på samme måde som for teststoffet og tilpas eventuelt til pH $7 \pm 0,2$.

Kontrol for hæmning (betinget)

21. For at få information om teststoffets toksicitet over for anaerobe mikroorganismer for at finde den mest egnede testkoncentration tilsættes teststof og referencestof til en beholder, der indeholder testmediet (se punkt 16), hver især med de samme koncentrationer, som blev tilsat (se punkt 19-20 og se endvidere ISO 13641-1 (12)).

Udrådnets slam

22. Udtag udrådnets slam fra en rådneta tank på et rensningsanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Slammet skal være fuldstændig karakteriseret, og baggrundsoplysningerne om det registreres (se punkt 54). Hvis det er meningen, at der skal bruges et tilpasset inokulum, kan det overvejes at bruge udrådnets slam fra et industrielt rensningsanlæg. Brug kolber med bred hals fremstillet af polyethylen med høj densitet eller et tilsvarende materiale, som kan udvides, til opsamling af udrådnets slam. Tilsæt slam til omkring 1 cm fra toppen af kolberne og luk dem tæt, helst med en sikkerhedsventil. Efter transport til laboratoriet kan den opsamlede slam bruges direkte eller anbringes i en rådneta tank i laboratoriestørrelse. Frigiv overskydende biogas ved forsigtigt at åbne kolberne med slam. Alternativt kan laboratoriedyrket anaerobt slam bruges som kilde til inokulum, men dets aktivitetsspektrum kan være blevet hæmmet.

Advarsel — Udrådnets slam producerer brandfarlige gasser, som indebærer brand- og eksplosionsrisici: Det indeholder også potentielt patogene organismer, og der skal derfor træffes passende forholdsregler i forbindelse med håndtering af slam. Af sikkerhedsmæssige årsager må der ikke bruges glasbeholdere til opsamling af slam.

23. For at reducere produktionen af baggrundsgas og mindske indflydelsen fra blindkontrollerne, kan det overvejes at udrådne slammet på forhånd. Er der brug for udrådning på forhånd, bør slammet rådne uden tilsætning af næringsstoffer eller substrater ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i op til 7 dage. Det er påvist, at udrådning på forhånd i omkring fem dage normalt giver et optimalt fald i blindprøvens gasproduktion uden uacceptable stigninger i hverken lag- eller inkubationsperioder i testfasen eller tab af aktivitet hen imod et lille antal testede stoffer.
24. For teststoffer, som er eller forventes at være svært bionedbrydelige, overvejes præeksponering af slammet for teststoffet for at få et bedre tilpasset inokulum. I så fald tilsættes teststoffet med en organisk kulstofkoncentration på 5 mg/l til 20 mg/l til den udrådede slam og inkuberes i op til to uger. Vask den præeksponerede slam grundigt før brug (se punkt 25) og anfør præeksponeringsbetingelserne i testrapporten.

Inokulum

25. Vask slammet (se punkt 22-24) lige før brug for at reducere IC-koncentrationen til under 10 mg/l i den endelige testsuspension. Centrifuger slammet i lukkede rør (f.eks. 3 000 g i 5 minutter), og udled supernatanten. Suspendér den resulterende pellet i afiltet medium (punkt 16-17), centrifuger suspensionen igen og udled supernatantvæsken. Hvis IC ikke er blevet sænket tilstrækkeligt, kan vaskningen af slammet gentages højst to gange. Dette ser ikke ud til at påvirke mikroorganismene negativt. Suspendér endelig pelleten i den nødvendige mængde testmedium og bestem koncentrationen af den samlede mængde tørstof [e.g. ISO 11923 (15)]. Slutkoncentration af den samlede mængde tørstof i testbeholderne bør ligge mellem 1 g/l og 3 g/l (eller omkring 10 % af mængden i ufortyndet udrådnets slam). Udfør ovennævnte operationer på en sådan måde, at slammet har minimal kontakt med ilt (brug f.eks. en nitrogenatmosfære).

TESTPROCEDURE

26. Udfør følgende indledende procedurer under anvendelse af teknikker, der holder kontakten mellem udrådnets slam og ilt så lav som praktisk muligt, f.eks. kan det være nødvendigt at arbejde i en handskekasse i en nitrogenatmosfære og/eller rense kolberne med kvælstof (4).

Forberedelse af test og kontrolassays

27. Klargør mindst tre testbeholdere (se punkt 13 b)) til teststoffet, blindkontroller, referencestof, kontroller for hæmning (betinget) og trykkontrolkamre (valgfri fremgangsmåde) (se punkt 7 og 19-21). Der kan også klargøres supplerende beholdere med det formål at vurdere primær bionedbrydning ved hjælp af teststofspecifikke analyser. Den samme række blindkontroller kan bruges til flere teststoffer i den samme test, så længe headspacevolumen er konsistent.

28. Fremstil det fortyndede inokulum, før det tilsættes til beholderne, f.eks. ved hjælp af en pipette med stor åbning. Tilsæt aliquoter af velblandet inokulum (punkt 25), således at koncentrationen af samlet tørstof er den samme i alle beholdere (mellem 1 g/l og 3 g/l). Tilsæt eventuelt stamopløsninger af test- og referencestof efter eventuel tilpasning til $\text{pH } 7 \pm 0,2$. Teststoffet og referencestoffet tilsættes under anvendelse af den mest hensigtsmæssige administrationsvej (punkt 19).
29. Testkoncentrationen af organisk kulstof bør normalt ligge på 20-100 mg/l (punkt 4). Hvis teststoffet er toksisk, reduceres testkoncentrationen til 20 mg C/l eller endnu mindre, hvis blot den primære bionedbrydning skal måles med specifikke analyser. Det skal bemærkes, at variabiliteten af testresultaterne stiger ved lavere testkoncentrationer.
30. For blindprøver tilsættes en tilsvarende mængde af det bærestof, der anvendes til at dosere teststoffet, i stedet for en stamopløsning, suspension eller emulsion. Hvis teststoffet blev administreret ved hjælp af glasfiberfiltre eller organiske opløsningsmidler, tilsættes blindprøverne et filter eller en tilsvarende mængde opløsningsmiddel, som er fordampet. Fremstil et ekstra replikat med teststof til måling af pH-værdi. Tilpas eventuelt pH til $7 \pm 0,2$ med små mængder fortyndet uorganisk syre eller alkali. De samme mængder neutraliseringsmidler tilsættes til alle testbeholdere. Disse tilsætninger bør ikke være nødvendige, eftersom pH-værdien af stamopløsningerne af teststof og referencestof allerede er blevet tilpasset (se punkt 19-20). Hvis der skal måles primær bionedbrydning, udtages en passende prøve fra pH-kontrolbeholderen eller fra en supplerende testbeholder, og teststofkoncentrationen måles ved hjælp af særlige analyser. Overtrukne magneter kan tilsættes til alle beholdere, hvis reaktionsblandingerne skal omrøres (valgfrit).
31. Sørg for, at det samlede volumen af væske V_1 og headspacevolumen V_h er det samme i alle beholdere, og noter og registrer værdierne af V_1 og V_h . Hver beholder forsegles med et gastæt septum og overføres fra handskekassen (se punkt 26) til inkubatoren (se punkt 13 a)).

Uopløselige teststoffer

32. Tilsæt afvejede mængder af stoffer, som er tungt opløselige i vand, direkte i de klargjorte beholdere. Når det er nødvendigt at bruge et opløsningsmiddel (se punkt 19), overføres teststofopløsningen eller -suspensionen til de tomme beholdere. Fordamp opløsningsmidlet, hvor det er muligt, ved at lede kvælstofgas gennem beholderne og derefter tilsæt de øvrige ingredienser, dvs. fortyndet slam (punkt 25) og afiltet vand efter behov. Der klargøres også en supplerende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 19). Med hensyn til andre metoder til tilsætning af uopløselige stoffer henvises til ISO 10634 (13). Flydende teststoffer kan doseres med en sprøjte ind i de fuldstændigt klargjorte forseglede beholdere, hvis det forventes, at den initiale pH ikke vil blive overskredet 7 ± 1 , ellers doser som beskrevet ovenfor (se punkt 19).

Inkubation og gastrykmålinger

33. Inkuber de klargjorte beholdere ved $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ i omkring 1 time for at give mulighed for ækvilibrering og frigivelse af overskydende gas til atmosfæren, f.eks. ved successivt at ryste hver beholder, føre trykmålerens nål (punkt 13 c)) gennem låget og åbne ventilen, indtil trykmåleren viser nul. Hvis headspacetrykket på dette tidspunkt, eller når der foretages mellemmålinger, ligger under det atmosfæriske tryk, føres kvælstofgas ind for at genoprette atmosfærisk tryk. Luk ventilen (se punkt 13 c)), og fortsæt inkubationen i mørke, idet det sikres, at alle dele af beholderne holdes på udrådningstemperaturen. Observer beholderne efter inkubation i 24-48 timer. Kasser beholdere, hvis indholdet af beholderne viser en tydelig lyserødfarvning i supernatantvæsken, dvs. hvis Resazurin (se punkt 16) har ændret farve, hvilket viser tilstedeværelsen af ilt (se punkt 50). Mens systemet måske kan tåle små mængder ilt, kan højere koncentrationer i alvorlig grad hæmme det anaerobe bionedbrydningsforløb. Det kan accepteres, at en enkelt beholder i et sæt på tre af og til kasseres, men forekomsten af flere fejl end det skal give anledning til en undersøgelse af forsøgsprocedurerne samt en gentagelse af testen.

34. Bland indholdet i hver beholder grundigt ved at røre eller ryste den et par minutter mindst 2-3 gange om ugen og kort tid før hver trykmåling. Rystning resuspenderer inokulummet og sikrer gasbalance. Alle trykmålinger foretages hurtigt, eftersom temperaturen i testbeholderne kan falde, hvilket fører til falske aflæsninger. Under trykmåling bevares hele testbeholderen, inklusive headspace, på udrådningstemperaturen. Mål gastrykket ved f. eks. at indføre kanylen (punkt 13 c)), der er forbundet til trykmåleren, gennem septummet. Der må ikke komme vand ind i kanylen, hvis det sker, skal de våde dele tørres, og en ny nål påsættes. Trykket måles i millibar (se punkt 42). Gastrykket i beholderne kan måles jævnlige, f.eks. ugentligt, og overskydende gas kan eventuelt frigives til atmosfæren. Alternativt måles trykket kun ved testens afslutning for at bestemme, hvor meget biogas der er produceret.
35. Det anbefales at foretage mellemliggende aflæsninger af gastrykket, da trykstigning giver et fingerpeg om, hvornår testen kan afsluttes, og giver mulighed for at følge kinetikken (se punkt 6).
36. Testen afsluttes normalt efter en inkubationsperiode på 60 dage, medmindre den bionedbrydningskurve, trykmålingerne har givet, forinden er nået plateau-fasen, dvs. den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig. Hvis plateau-værdien er under 60 %, bliver fortolkningen problematisk, fordi det betyder, at kun en del af molekylet er blevet mineraliseret, eller at der er begået en fejl. Hvis der produceres gas i slutningen af den normale inkubationsperiode, men plateau-fasen tydeligvis ikke er nået, bør det overvejes at forlænge testen for at kontrollere, om plateauet (> 60 %) vil blive nået.

Måling af uorganisk kulstof

37. Ved afslutningen af testen efter den sidste gastrykmåling lader man slammet bundfælde sig. Åbn successivt hver beholder, og udtag straks en prøve til bestemmelse af koncentrationen (mg/l) af uorganisk kulstof (IC) i supernatantvæsken. Supernatantvæsken må hverken centrifugeres eller filtreres, da dette medfører et uacceptabelt tab af opløst kuldioxid. Hvis væsken ikke kan analyseres ved at udtage prøver, opbevares den i et forseglet glas uden headspace og nedkølet til omkring 4 °C i op til 2 dage. Efter IC-målingen måles og registreres pH-værdien.
38. Alternativt kan IC i supernatanten bestemmes indirekte ved at frigive den opløste IC som kuldioxid, der kan måles i headspace. Efter den sidste måling af gastryk, justeres trykket i hver af testbeholderne til atmosfærisk tryk. Forsur indholdet af hver beholder til omtrent pH 1 ved at tilsætte koncentreret uorganisk syre (f.eks. H₂SO₄) gennem de forseglede beholderes septum. Inkuber de rystede beholdere ved 35 °C ± 2 °C i ca. 24 timer, og mål det gastryk, der skabes af den udviklede kuldioxid, ved hjælp af en trykmåler.
39. Foretag lignende aflæsninger for den tilsvarende blindprøve, referencestof og eventuelle beholdere til hæmningskontrol (se punkt 21).
40. I nogle tilfælde, især hvis de samme kontrolbeholdere bruges til flere teststoffer, bør det overvejes at foretage målinger af IC-middelkoncentrationer i test- og kontrolbeholdere. I så fald klargøres et tilstrækkeligt antal beholdere til alle de mellemliggende målinger. Denne fremgangsmåde foretrækkes frem for at udtage alle prøver fra en beholder. Det sidste kan kun gøres, hvis det nødvendige volumen til DIC-analyse ikke anses for at være for høj. DIC-målingen foretages efter måling af gastrykket uden frigivelse af overskydende gas som beskrevet i det følgende:
- udtag et så lille volumen af supernatantprøver som muligt med en kanylen gennem septum uden at åbne beholderne, og bestem IC i prøven
 - når prøven er udtaget, udledes den overskydende gas eventuelt

- det tages i betragtning, at selv et lille fald i supernatantvolumen (f.eks. omkring 1 %) kan give en betydelig stigning i gasvolumen i headspace (V_h)
- ligningerne (se punkt 44) korrigeres ved om nødvendigt at øge V_h i ligning 3.

Specifikke analyser

41. Hvis der skal bestemmes primær anaerob nedbrydning (se punkt 30), udtages et passende prøvolumen til specifikke analyser fra beholdere, som indeholder teststoffet, ved testens begyndelse og afslutning. Bemærk, hvis dette gøres, at volumener af headspace (V_h) og væske (V_l) ændres, og tag højde for det ved beregning af resultaterne af gasproduktion. Alternativt kan der udtages prøver til specifikke analyser fra supplerende blandinger, som tidligere er fremstillet til det formål (punkt 30).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Af praktiske grunde måles gastrykket i millibar ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^2 \text{ Pa}$, $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), volumen i liter og temperatur i grader Celsius.

Kulstof i headspace

43. Da 1 mol methan og 1 mol kuldioxid hver indeholder 12 g kulstof, kan kulstofmassen i en given mængde udviklet gas udtrykkes som:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ligning [1]}$$

hvor:

m = kulstofmasse (mg) i en given mængde udviklet gas

12 = relativ atommasse af kulstof

n = antal mol gas i et givet volumen.

Hvis der genereres andre gasser i betydelige mængder end methan eller kuldioxid (f.eks. N_2O), ændres formlen [1] med henblik på at beskrive muligheden for effekter af de genererede gasser.

44. Fra gaslovene kan n udtrykkes som:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ligning [2]}$$

hvor:

p = gastryk (pascal)

V = gasvolumen (m^3)

R = gaskonstant [8.314]/(mol K)]

T = inkubationstemperatur (kelvin)

Ved kombination af ligning [1] og [2] og rationalisering for at give mulighed for produktion af gas i en blindkontrol:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ligning [3]}$$

hvor:

m_h = masse af nettokulstof produceret som gas i headspace (mg)

Δp = middelværdien af forskellen mellem start- og sluttryk i testbeholderne og den tilsvarende middelværdi i blindbeholderne (millibar)

V_h = headspacevolumen i beholderen (l)

0,1 = omregning af både newton/ m^2 til millibar og m^3 til liter.

Ligning [4] bruges til den normale inkubationstemperatur på 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Ligning [4]}$$

Bemærk: Alternativ volumenberegning. Trykmåleraflæsninger omregnes til ml produceret gas ved hjælp af standardkurven, som genereres ved at optegne indsprøjtet volumen (ml) i forhold til måleraflæsning (tillæg 2). Antallet af mol (n) gas i hver beholders headspace beregnes ved at dividere den akkumulerede gasproduktion (ml) med 25 286 ml/mol, som er det volumen, en mol gas optager ved 35 °C og atmosfærisk standardtryk. Da 1 mol CH₄ og 1 mol CO₂ hver indeholder 12 g kulstof, fremkommer mængden af kulstof (mg) i headspace (m_h) ved ligning [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ligning [5]}$$

Rationalisering for at give mulighed for produktion af gas i en blindkontrol:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad \text{Ligning [6]}$$

hvor:

m_h = masse af nettokulstof produceret som gas i headspace (mg)

ΔV = gennemsnit af forskellen mellem volumen gas produceret i headspace i testbeholderne og blindkontrolbeholderne

25 286 = volumen optaget af 1 mol gas ved 35 °C, 1 atmosfære.

45. Bionedbrydningsforløbet kan følges ved at optegne den akkumulerede trykstigning Δp (millibar) i forhold til tid, hvis det er relevant. Identificer og registrer lag-fasen (dage) fra denne kurve. Lag-fasen er tiden fra testens start, til der indtræffer signifikant nedbrydning (se et eksempel i tillæg 3). Hvis der blev taget og analyseret mellemliggende supernatantprøver (se punkt 40, 46 og 47), kan det samlede producerede C (i gas plus i væsken) optegnes i stedet for kun det akkumulerede tryk.

Kulstof i væsken

46. Der ses bort fra mængden af methan i væsken, eftersom dens vandopløselighed er kendt for at være meget lav. Beregn massen af uorganisk kulstof i væsken i testbeholderne ved hjælp af ligning [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Ligning [7]}$$

hvor:

m_l = massen af uorganisk kulstof i væsken (mg)

C_{net} = middelværdien af forskellen mellem koncentrationen af uorganisk kulstof i testbeholderne og den i kontrolbeholderne ved testens afslutning (mg/l)

V_l = væskevolumen i beholderen (l)

Samlet forgasset kulstof

47. Beregn den samlede masse af forgasset kulstof i beholderen ved hjælp af ligning [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Ligning [8]}$$

hvor:

m_t = samlet masse af forgasset kulstof (mg)

m_h og m_l er som defineret ovenfor.

Teststoffets kulstofindhold

48. Beregn massen af kulstof i testbeholderne udledt af det tilsatte teststof ved hjælp af ligning [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Ligning [9]}$$

hvor:

m_v = teststoffets kulstofmasse (mg)

C_c = teststoffets kulstofkoncentration i testbeholderen (mg/l)

V_l = væskevolumen i testbeholderen (l).

Bionedbrydningens omfang

49. Beregn den procentvise bionedbrydning som følge af gas i headspace ved hjælp af ligning [10] og den samlede procentvise bionedbrydning ved hjælp af ligning [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Ligning [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Ligning [11]}$$

hvor:

D_h = bionedbrydning som følge af gas i headspace (%)

D_t = samlet bionedbrydning (%)

m_h , m_v og m_t er som defineret ovenfor.

Graden af primær bionedbrydning beregnes ud fra de (valgfrie) målinger af teststoffets koncentration ved begyndelsen og afslutningen af inkubationen ved hjælp af ligning [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Ligning [12]}$$

hvor:

D_p = primær nedbrydning af teststoffet (%)

S_i = teststoffets startkoncentration (mg/l)

S_e = teststofkoncentration ved afslutning (mg/l).

Viser analysemetoden signifikante teststofkoncentrationer i det uændrede anaerobe inokulum af slam, benyttes ligning [13]:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ligning [13]}$$

hvor:

D_p^1 = korrigeret primær nedbrydning af teststoffet (%)

S_{ib} = »tilsyneladende« startkoncentration i teststof i blindkontroller (mg/l)

S_{eb} = »tilsyneladende« koncentration i teststof i blindkontroller ved afslutningen (mg/l).

Resultaternes validitet

50. Trykaflæsninger må kun bruges fra beholdere, som ikke viser lyserødfarvning (se punkt 33). Forurening med ilt minimeres gennem korrekt anaerob håndtering.
51. Det skal bemærkes, at testen er valid, hvis referencestoffet når et plateau, som repræsenterer over 60 % bionedbrydning ⁽¹⁾.
52. Hvis pH-værdien ved testens afslutning ligger over området 7 ± 1 , og der har fundet en utilstrækkelig bionedbrydning sted, gentages testen med øget bufferkapacitet i mediet.

⁽¹⁾ Dette bør genvurderes, hvis der er inkluderet adsorptive og uopløselige referencekemikalier.

Hæmning af bionedbrydning

53. Gasproduktionen i beholdere, som indeholder både teststof og referencestof, skal som minimum være den samme som i beholdere, der kun indeholder referencestof. Ellers er det tegn på hæmning af gasproduktionen. I nogle tilfælde vil gasproduktionen i beholdere, der indeholder teststof uden referencestof, være lavere end i blindkontrollerne, hvilket er tegn på, at teststoffet er hæmmende.

Testrapport

54. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

- generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- renhed (urenheder) i teststoffet.

Testbetingelser:

- volumen af den fortyndede opløsning i rådnetanken (V_l) og headspace (V_h) i beholderen
- beskrivelse af testbeholderne, primære karakteristika for biogasmålingen (f.eks. type trykmåler) og kulstofanalysatoren
- anvendelse af teststof og referencestof på testsystemet: anvendt testkoncentration og eventuel anvendelse af opløsningsmidler
- oplysninger om anvendt inokulum: rensningsanlæggets navn, beskrivelse af kilden til det behandlede spildevand (f.eks. driftstemperatur, slamretentionstid, overvejende husholdningsspildevand osv.), koncentration, eventuelt nødvendige oplysninger til dokumentation af dette og oplysninger om eventuel forbehandling af inokulummet (f.eks. udrådning på forhånd, præeksposering)
- inkubationstemperatur
- antal replikater.

Resultater:

- pH- og IC-værdier ved testens afslutning
- teststoffets koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen, hvis der er foretaget en særlig måling
- alle målte data indsamlet under testen, blindprøve, referencestof og beholdere til hæmningskontrol, alt efter hvad der er relevant (f.eks. tryk i millibar, uorganisk kulstofkoncentration (mg/l)), i tabelform (målte data for headspace og væske registreres separat)
- statistisk databehandling, testvarighed og et diagram over bionedbrydningen af teststof og referencestof samt hæmningskontrol
- procentvis nedbrydning af teststof og referencestof
- årsager til eventuel afvisning af testresultaterne
- diskussion af resultater.

LITTERATUR

- (1) Følgende kapitler i dette bilag:

C.4, Bestemmelse af let bionedbrydelighed

C.9, Biologisk nedbrydning — Zahn-Wellens Test

C.10, Simuleringsforsøg vedrørende aerob spildevandsrensning:

A: Aktiverede slamenheder, B: Biofilm

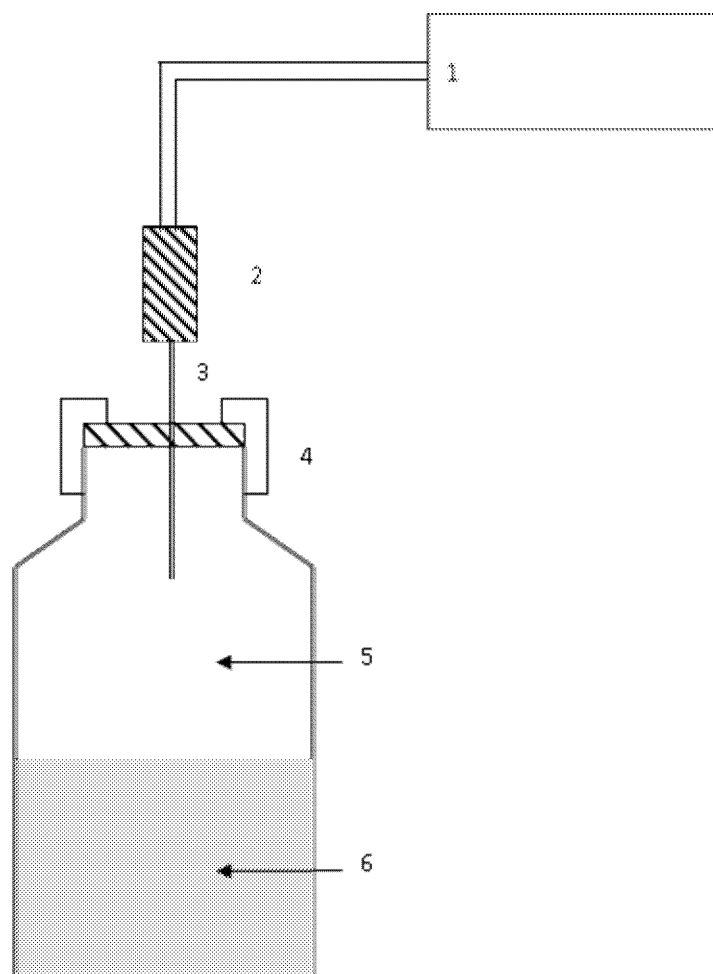
C.11, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest

- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

- (3) R.R. Birch, C. Biver, R. Campagna, W.E. Gledhill, U. Pagga, J. Steber, H. Reust og W.J. Bontinck, (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Også offentliggjort som ECETOC Technical Report No. 28, juni 1988).
 - (4) D.R. Shelton og J.M. Tiedje (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - (5) W.F. Owen, D.C. Stuckey, J.B. Healy Jr., L.Y. Young og P.L. McCarty (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) J.B. Healy Jr. og L.Y. Young (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - (7) W.E. Gledhill (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Arbejdsdokument. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - (8) N. S. Battersby og V. Wilson (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
 - (12) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
 - (13) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (14) U. Pagga og D.B. Beimbom (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1997) ISO 11 923, Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Tillæg 1

Eksempel på et apparat til måling af biogasproduktion ved gastryk



Signaturforklaring:

- 1 — Trykmåler
- 2 — 3-Gastæt trevejsventil
- 3 — Kanyle
- 4 — Gastæt forsegling (crimplåg og septum)
- 5 — Headspace (V_h)
- 6 — Inokulum af udrådnetslam (V_l)

Testbeholdere i et miljø på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Tillæg 2

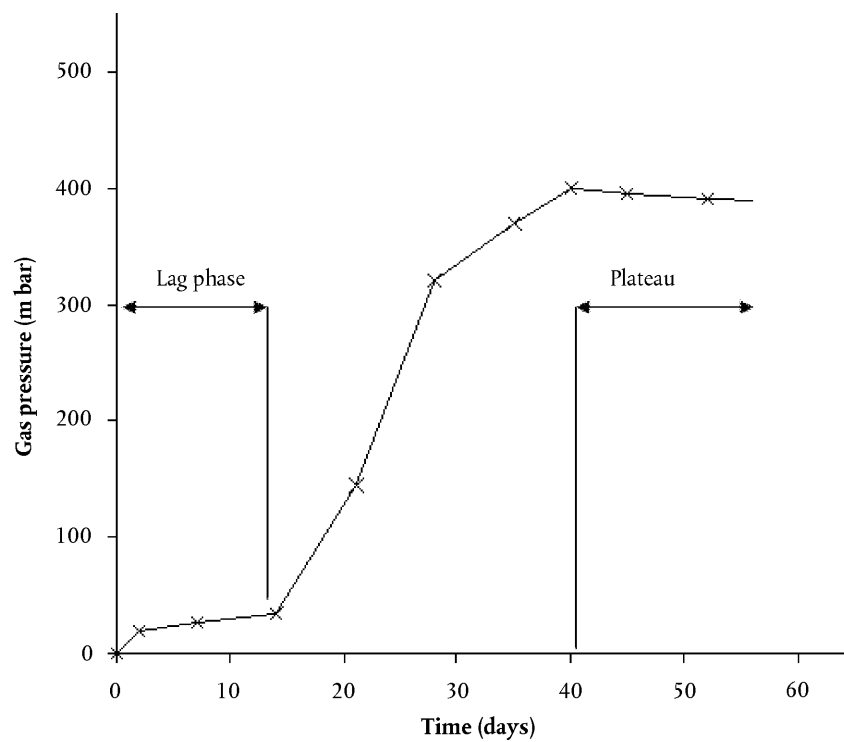
Omstilling af trykmåleren

Trykmåleraflæsningerne kan sættes i forhold til gasvolumen ved hjælp af en standardkurve, som frembringes ved at indsprøjte en kendt mængde luft ved $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i serumflasker, der indeholder en mængde vand, som svarer til reaktionsblandings, V_R :

- Fordel V_R ml aliquoter vand, holdt ved en temperatur på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, i fem serumflasker. Forsegl flaskerne, og anbring dem i et vandbad ved 35 °C i en time med henblik på ækvilibrering.
- Tænd trykmåleren, lad den stabilisere sig, og indstil til nul.
- Indfør kanylen gennem låget på hver af flaskerne, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.
- Gentag denne procedure med de resterende flasker.
- Indsprøjt 1 ml luft med en temperatur på $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i hver flaske. Indfør nålen (på trykmåleren) gennem låget på en af flaskerne, og aflæs trykket, når det stabiliserer sig. Registrer trykket, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.
- Gentag denne procedure med de resterende flasker.
- Gentag hele proceduren med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml og 50 ml luft.
- Optegn en omregningskurve for tryk (Pa) mod indsprøjtet volumen gas, V_b (ml). Instrumentets respons er lineært i intervallet 0-70 000 Pa, og 0-50 ml gasproduktion.

Tillæg 3

Eksempel på en nedbrydningskurve (stigning i akkumuleret nettotryk)



Tillæg 4

Eksempel på resultatskemaer for anaerob bionedbrydningstest — resultatskema for teststoffet

Laboratorium:

Teststoffet:

Testnr.:

Testtemperatur: (°C)

Headspacevolumen (V_h): (l)

Væskevolumen (V_l): (l)

Kulstof i teststoffet $C_{C,v}$: (mg/l)

m_v ⁽¹⁾: (mg)

Dag	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) middel- værdi (mbar)	p_4 (blind- prøve) (mbar)	p_5 (blind- prøve) (mbar)	p_6 (blind- prøve) (mbar)	p (blind- prøve) middel- værdi (mbar)	p (netto) test – blindprøve middel- værdi (mbar)	Δp (netto) Kumuleret (mbar)	m_h headspace C ⁽²⁾ (mg)	D_h Bioned-bry- delighed ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC, 1}$ Test (mg)	$C_{IC, 2}$ Test (mg)	$C_{IC, 3}$ Test (mg)	C_{IC} test middel (mg)	$C_{IC, 4}$ blindprøve (mg)	$C_{IC, 5}$ blindprøve (mg)	$C_{IC, 6}$ blindprøve (mg)	C_{IC} blindprøve middel (mg)	$C_{IC, netto}$ test – blindprøve middel- værdi (mg)	m_l væske C ⁽⁴⁾ (mg)	m_t C i alt ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Bioned-bry- delighed ⁽⁶⁾ (%)
IC (slut)												
pH (slut)												

⁽¹⁾ Kulstofindhold i testbeholderen, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

⁽²⁾ Kulstofindhold i headspace, m_h (mg) ved normal inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Bionedbrydning beregnet ud fra headspace-gas, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

⁽⁴⁾ Kulstof i væske, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

⁽⁵⁾ Samlet forgasset kulstof, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Samlet bionedbrydning, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

Laboratorium:

Referencestof:

Testnr.:

Testtemperatur:(°C):

Headspacevolumen (V_h): (l)

Væskevolumen (V_l) (liter):

Kulstof i referencestof C_{c,v} (mg/l):

m_v ⁽¹⁾ (mg):

Dag	p ₁ (ref.) (mbar)	p ₂ (ref.) (mbar)	p ₃ (ref.) (mbar)	p (ref.) middel- værdi (mbar)	p ₄ (hæmn.) (mbar)	p ₅ (hæmn.) (mbar)	p ₆ (hæmn.) (mbar)	p (hæmn.) middel- værdi (mbar)	p (ref.) ref. — blindprøve (mbar)	Δp (ref.) kumuleret (mbar)	m _h headspace C ⁽²⁾ (mg)	D _h Bioned-bry- delighed ⁽³⁾ (%)
	C _{IC, 1} ref. (mg)	C _{IC, 2} ref. (mg)	C _{IC, 3} ref. (mg)	C _{IC} ref. middel (mg)	C _{IC, 4} hæmn. (mg)	C _{IC, 5} hæmn. (mg)	C _{IC, 6} hæmn. (mg)	C _{IC} hæmn. middel (mg)	C _{IC, netto} ref. — hæmn. (mg)	m _l væske C ⁽⁴⁾ (mg)	m _t C i alt ⁽⁵⁾ (mg)	D _t Bioned-bry- delighed ⁽⁶⁾ (%)
IC (slut)												
pH (slut)												

⁽¹⁾ Kulstofindhold i testbeholderen, m_v (mg): m_v = C_{c,v} × V_l

⁽²⁾ Kulstofindhold i headspace, m_h (mg) ved normal inkubationstemperatur (35 °C): m_h = 0,468 Δp × V_h

⁽³⁾ Bionedbrydning beregnet ud fra headspace-gas, D_h (%): D_h = (m_h × 100) / m_v

⁽⁴⁾ Kulstof i væske, m_l (mg): m_l = C_{IC,net} × V_l

⁽⁵⁾ Samlet forgasset kulstof, m_t (mg): m_t = m_h + m_l

⁽⁶⁾ Samlet bionedbrydning, D_t (%): D_t = (m_t × 100) / m_v

C.44. Udvaskning i jordsøjler

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 312 (2004). Menneskeskabte kemikalier kan nå jorden direkte via bevidst anvendelse (f.eks. agrokemikalier) eller indirekte (f.eks. via spildevand → kloakslam → jord eller luft → våd-/tørdeposition). Ved risikovurdering af disse kemikalier er det vigtigt at anslå deres potentiale for omdannelse i jord og for bevægelse (udvaskning) til dybere jordlag og med tiden til grundvandet.
2. Der findes flere metoder til at måle kemikaliers potentiale for udvaskning i jord under kontrollerede laboratoriebetingelser, dvs. tyndtlagskromatografi i jord, tyktlagskromatografi i jord, jordsøjlekromatografi samt adsorptions-/desorptionsmålinger (1)(2). For ikkeioniserede kemikalier giver n-octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{ow}) mulighed for et tidligt skøn over deres adsorptions- og udvaskningspotentiale (3)(4)(5).
3. Den metode, som beskrives i denne testmetode, er baseret på jordsøjlekromatografi i forstyrret jord (se definition i tillæg 1). Der udføres to typer eksperimenter for at bestemme (i) testkemikaliet's udvaskningspotentiale og (ii) omdannelsesprodukternes udvaskningspotentiale (undersøgelse med ældede restprodukter) i jord under kontrollerede laboratoriebetingelser ⁽¹⁾. Testmetoden er baseret på eksisterende metoder (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate, Italien, i 1995 (12), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test. Der blev også fremsat anbefalinger for prøvetagning samt håndtering og opbevaring af jordprøver til udvaskningsforsøg.

TESTMETODENS PRINCIP

5. Søjler fremstillet af passende inaktivt materiale (f.eks. glas, rustfrit stål, aluminium, teflon, PVC osv.) pakkes med jord og mættes og ækvilibreres efterfølgende med en »kunstig regn«-opløsning (se definition i tillæg 1) og lades dræne. Herefter behandles overfladen af hver jordsøjle med testkemikaliet og/eller med ældede restprodukter af testkemikaliet. Kunstig regn tilsættes jordsøjlerne, og perkolatet udtages. Efter udvaskningsprocessen fjernes jorden fra søjlerne og udskæres i et passende antal segmenter, alt efter hvilke oplysninger der ønskes fra undersøgelsen. Hvert jordsegment og perkolatet analyseres herefter for testkemikalie og eventuelt for omdannelsesprodukter eller andre kemikalier af interesse.

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

6. Testmetoden finder anvendelse på testkemikalier (umærkede eller radioaktivt mærkede: f.eks. ^{14}C), for hvilke der foreligger en tilstrækkeligt nøjagtig og følsom analysemetode. Testmetoden må ikke anvendes på kemikalier, som er flygtige fra jord og vand og således ikke forbliver i jord og/eller perkolat under denne testmetodes forsøgsbetingelser.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Umærkede eller radioaktivt mærkede testkemikalier kan bruges til at måle udvaskningsegenskaberne i jordsøjler. Der kræves radioaktivt mærket materiale til at undersøge udvaskning af omdannelsesprodukter (ældede restprodukter af testkemikaliet) og til bestemmelser af massebalance. ^{14}C -mærkning anbefales, men andre isotoper, såsom ^{13}C , ^{15}N , ^3H og ^{32}P , kan ligeledes være nyttige. Mærket bør så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e). Testkemikaliet's renhed skal være mindst 95 %.
8. De fleste kemikalier bør anvendes som enkeltstof. I forbindelse med aktive stoffer i plantebeskyttelsesmidler kan formulerede produkter dog anvendes til at undersøge udvaskning af det oprindelige teststof, men testningen af dem er især påkrævet, når blandingen kan påvirke frigivelseshastigheden (f.eks. granulerede formuleringer eller formuleringer med kontrolleret frigivelse). Med hensyn til blandingsspecifikke krav til testdesign kan det være hensigtsmæssigt at rådføre sig med tilsynsmyndigheden forud for gennemførelse af testen. I forbindelse med undersøgelser af ældede restkoncentrationer efter udvaskning bruges det rene oprindelige teststof.

⁽¹⁾ Søjleudvaskningsundersøgelser med plantebeskyttelsesmidler kan give mobilitetsoplysninger om et testkemikalie og omdannelsesprodukterne heraf og kan supplere sorptionsundersøgelser for et parti.

9. Før udførelse af udvaskningstest i jordsøjler skal følgende oplysninger om testkemikaliets helst foreligge:

- (1) vandopløselighed [testmetode A.6] (13)
- (2) opløselighed i organiske opløsningsmidler
- (3) damptryk [testmetode A.4] (13) og Henrys konstant
- (4) n-octanol/vand-fordelingskoefficient [testmetode A.8 og A.24] (13)
- (5) adsorptionskoefficient (K_d , K_f eller K_{oc}) [testmetode C.18 og/eller C.19] (13)
- (6) hydrolyse [testmetode C.7] (13)
- (7) dissociationskonstant (pK_a) [OECD TG 112] (25)
- (8) aerob og anaerob omdannelse i jord [testmetode C.23] (13).

Bemærk: Den temperatur, hvorved disse målinger foretages, registreres i de respektive testrapporter.

10. Mængden af det testkemikalie, der er tilsat jordsøjlerne, skal være tilstrækkelig til, at der kan påvises mindst 0,5 % af den tilsatte dosis i et enkelt segment. For aktive kemikalier i plantebeskyttelsesmidler kan mængden af tilsat testkemikalie svare til den maksimale anbefalede dosis (enkel tilsætning).
11. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets og, hvis det er relevant, af dets omdannelsesprodukter i jord og perkolat. Analysens detektionsgrænse for testkemikaliets og væsentlige omdannelsesprodukter heraf (normalt mindst alle omdannelsesprodukter ≥ 10 % af den tilsatte dosis, som er observeret i undersøgelser af omdannelsesveje, men helst eventuelt relevante problematiske omdannelsesprodukter) skal også være kendt (se punkt 17).

REFERENCEKEMIKALIER

12. Referencekemikalier med kendte udvaskningsegenskaber, såsom atrazin eller monuron, der kan betragtes som moderate udvaskningsmidler i marken, anvendes til at vurdere testkemikaliets relative mobilitet i jord (1)(8)(11). Et ikke-sorberende og ikke-nedbrydeligt polært referencekemikalie (f.eks. tritiumbromid, fluorescein og eosin) til at spore vands bevægelse i søjlen kan også være nyttigt til at bekræfte jordsøjlelens hydrodynamiske egenskaber.
13. Standardkemikalier til analyse kan også være nyttige til at karakterisere og/eller identificere de omdannelsesprodukter, der påvises i jordsegmenter og perkolater ved kromatografiske, spektroskopiske eller andre relevante metoder.

DEFINITIONER OG ENHEDER

14. Se tillæg 1.

KVALITETSKRITERIER

Genfindning

15. Summen og procenttallene for testkemikaliets og søjleperkolatet efter udvaskning, angiver genfindingen for et udvaskningsforsøg. Der skulle gerne genfindes 90-110 % for radioaktivt mærkede kemikalier (11) og 70-110 % for ikke-radioaktivt mærkede kemikalier (8).

Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed

16. Repeterbarheden af analysemetoden til kvantitativ bestemmelse af testkemikalier og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse af det samme ekstrakt af et jordsegment eller et perkolat (se punkt 11).

17. Analysemetodens detektionsgrænse for testkemikaliet og for omdannelsesprodukterne må ikke være over $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i hvert jordsegment eller perkolat (som testkemikalie) og ikke over 0,5 % af den tilsatte mængde i et enkelt segment. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal ligeledes angives.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testsystem

18. Udvaskningssøjler (der eventuelt kan skæres i tværsnit) fremstillet af passende inaktivt materiale (f.eks. glas, rustfrit stål, aluminium, teflon, PVC osv.) med en indvendig diameter på mindst 4 cm og en minimumshøjde på 35 cm bruges til testen. Søjlematerialer testes for potentielle vekselvirkninger med testkemikaliet og/eller omdannelsesprodukterne heraf. Eksempler på egnede søjler, der eventuelt kan skæres i tværsnit, vises i tillæg 2.
19. Ske, trykstempel og vibrationsapparat bruges til at fylde og pakke jordsøjlerne.
20. Til tilsætning af kunstig regn til jordsøjlerne kan der bruges stempel eller peristaltiske pumper, brusehoveder, Mariotteflasker eller simple tildrypningstragter.

Laboratorieudstyr og kemikalier

21. Der kræves sædvanligt laboratorieudstyr, herunder specielt følgende:
- (1) analyseapparatur som f.eks. GC, HPLC og TLC med passende detektionssystem til analyse af mærkede eller umærkede kemikalier eller til omvendt isotopfortyndingsmetode
 - (2) instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, mv.)
 - (3) væskescintillationstæller til radioaktivt mærket testkemikalie
 - (4) oxiderende stof til forbrænding af mærket materiale
 - (5) ekstraktionsapparat (f.eks. centrifugeglas til kold ekstraktion og Soxhlet-apparat til kontinuerlig ekstraktion med recirkulation)
 - (6) udstyr til koncentreret af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper).
22. Anvendte kemikalier omfatter: organiske opløsningsmidler, analysekvalitet som acetone, methanol osv., scintillationsvæske, 0,01 M CaCl_2 -opløsning i destilleret eller deioniseret vand (= kunstig regn).

Testkemikalie

23. Testkemikaliet opløses i vand (deioniseret eller destilleret), inden det tilføres til jordsøjlen. Hvis testkemikaliet er tungt opløseligt i vand, kan det enten tilføres som formuleret produkt (eventuelt efter at være blevet suspenderet eller emulgeret i vand) eller i et organisk opløsningsmiddel. Såfremt der bruges et organisk opløsningsmiddel, skal det begrænses til et minimum og afdampes fra jordsøjens overflade, inden udvaskningen påbegyndes. Formuleringer i fast form, såsom granulater, anvendes i den faste form uden vand. For at sikre en bedre fordeling over jordsøjens overflade kan det formulerede produkt blandes med en lille smule kvartssand (f.eks. 1 g) før tilsætning.
24. Mængden af det testkemikalie, der er tilsat jordsøjlerne, skal være tilstrækkelig til, at der kan påvises mindst 0,5 % af den tilsatte dosis i et enkelt segment. Til aktive kemikalier i plantebeskyttelsesmidler kan dette være baseret på den maksimale anbefalede dosis (enkel tilsætning) og skal til både oprindelig og ældet udvaskning stå i forhold til den anvendte jordsøjles overfladeareal ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Den mængde, der skal anvendes på cylindriske jordsøjler, kan beregnes ud fra følgende formel:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

hvor:

M = anvendt mængde pr. søjle [μg]

A = doseringsmængde [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = jordsøjens diameter [cm]

$\pi = 3,14$

Referencekemikalie

25. Der anvendes et referencekemikalie i udvaskningsforsøg (se punkt 12). Det tilføres jordsøjle's overflade på samme måde som testkemikaliet og med en passende dosis, der sikrer tilstrækkelig detektion enten som intern standard sammen med testkemikaliet på den samme jordsøjle eller alene på en separat jordsøjle. Begge kemikalier skal helst testes på den samme søjle, undtagen hvis begge kemikalier er mærket ens.

Jordtyper

Valg af jordtype

26. Til udvaskningsundersøgelser med det oprindelige testkemikalie anvendes 3-4 jordtyper med varierende pH-værdi, organisk kulstofindhold og tekstur (12). Vejledning i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsforsøg er anført i tabel 1 nedenfor. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af kemikaliet's mobilitet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Mindst tre jordtyper bør have en pH-værdi, hvor testkemikaliet er i sin mobile form.

Tabel 1

Vejledning i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsundersøgelser

Jordtype nr.	pH-værdi	Organisk kulstof %	Lerindhold %	Tekstur (*)
1	> 7,5	3,5-5,0	20 - 40	mellemmer
2	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	siltblandet lerjord
3	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	lerjord
4	< 4,0-6,0 §	< 0,5-1,5 § ‡	< 10-15 §	lerblandet sandjord
5	< 4,5	> 10 #	< 10	lerblandet sandjord/ sand

(*) Ifølge FAO's og USDA's systemer (14).

§ De respektive variable skal helst vise værdier inden for de givne områder. Hvis der imidlertid opstår vanskeligheder med at finde egnet jordmateriale, accepteres værdier under det anførte minimum.

‡ Jordtyper med under 0,3 % organisk kulstof kan forstyrre korrelationen mellem organisk indhold og adsorption. Derfor anbefales det at bruge jordtyper med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.

Jordtyper med et meget højt kulstofindhold (f.eks. > 10 %) er måske ikke juridisk acceptable, f.eks. med henblik på pesticidregistrering.

27. Andre jordtyper kan undertiden være nødvendige for at repræsentere køligere, tempererede og tropiske regioner. Foretrækker man andre jordtyper, bør de derfor være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variationer i egenskaber som dem, der er beskrevet i vejledningen i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsundersøgelser (se tabel 1 ovenfor), også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.
28. Til udvaskningsundersøgelser med »ældede restkoncentrationer« bruges en jordtype (12). Den skal have et sandindhold > 70 % og et organisk kulstofindhold på 0,5-1,5 % (f.eks. jordtype nr. 4 i tabel 1). Det kan være nødvendigt at bruge flere jordtyper, hvis data om omdannelsesprodukterne er vigtige.

29. Alle jordtyper karakteriseres som minimum for tekstur [% sand, % silt, % ler ifølge FAO's og USDA's klassifikationssystemer (14)], pH-værdi, kationbytningskapacitet, organisk kulstofindhold, bulkdensitet (for forstyrret jord) og vandholdende evne. Måling af mikrobiel biomasse kræves kun for den jord, som bruges i ældnings-/inkubationsperioden, der går forud for forsøget med ældet udvaskning. Information om supplerende jordegenskaber (f. eks. jordklassifikation, lermineralogi, specifikt overfladeareal) kan være nyttig ved fortolkning af resultaterne af denne undersøgelse. Til bestemmelse af jordens karakteristika kan de anbefalede metoder i reference (15)(16)(17)(18)(19) bruges.

Indsamling og opbevaring af jordprøver

30. Jordprøverne tages fra det øverste lag (A-horisont) til en maksimal dybde af 20 cm. Rester af vegetation, makrofauna og sten fjernes. Jordprøverne (undtagen dem, der bruges til ældning af testkemikaliet) lufttørres ved stuetemperatur (helst ved 20-25 °C). Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordprøverne sigtes gennem en sigte på ≤ 2 mm. Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Før brug kan jordprøverne opbevares ved omgivelsestemperatur og holdes lufttørre (12). Der anbefales ingen grænse for opbevaringstid, men har jordprøverne været opbevaret i over tre år, bør de før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold og pH-værdi.
31. Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om de markarealer, hvor jordprøverne er indsamlet. Disse oplysninger omfatter nøjagtig beliggenhed [nøjagtigt defineret af UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiske koordinater], plantedække, behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder (12). Har jorden inden for de foregående fire år været behandlet med testkemikaliet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, må den ikke anvendes til udvaskningsundersøgelserne.

Testbetingelser:

32. I testperioden opbevares jordudvaskningssøjlerne i mørke ved omgivelsestemperatur, så længe denne temperatur holdes inden for et interval på ± 2 °C. Anbefalede temperaturer er 18-25 °C.
33. Kunstig regn (0,01 M CaCl_2) tilføres kontinuerligt til jordsøjlernes overflade med en dosis på 200 mm over en periode på 48 timer (⁽¹⁾). Denne dosis svarer til en tilførsel på 251 ml for en søjle med en indvendig diameter på 4 cm. Hvis det er nødvendigt af hensyn til testen, kan andre doser kunstig regn og længere varighed endvidere bruges.

Gennemførelsen af testen

Udvaskning med oprindeligt testkemikalie

34. Mindst to udvaskningssøjler pakkes med ubehandlet, lufttørret og sigtet jord (< 2 mm) op til en højde på ca. 30 cm. For at opnå en ensartet pakning tilsættes jorden til søjlerne i små portioner med en ske og presses med et stempel under samtidig forsigtig vibration af søjlen, indtil toppen af jordsøjlen ikke synker mere. En ensartet pakning er nødvendig for at få reproducerbare resultater fra udvaskningssøjlerne. Se nærmere oplysninger om søjlepakningsteknikker i reference (20)(21)(22). For at kontrollere at pakningsproceduren kan reproducere, bestemmes den samlede vægt af den pakkede jord i søjlerne (⁽²⁾), idet vægten af de to søjler skal være den samme.

(¹) Dette simulerer en ekstremt stor nedbørsmængde. Den gennemsnitlige årlige nedbørsmængde i f.eks. Centraleuropa er i størrelsesordenen 800-1 000 mm.

(²) Herunder ses eksempler på massefylde for forstyrrede jordtyper:
for en sandjord $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
for en lerblandet sandjord $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
for en lerjord $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
for en siltjord $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

35. Efter pakningen vædes jordsøjlerne på forhånd med kunstig regn ($0,01 \text{ M CaCl}_2$) fra top til bund for at fortrænge luften i jordporene med vand. Derefter lades jordsøjlerne ækvilibrere, og det overskydende vand drænes bort ved tyngdekraft. Metoder til søjlemætning gennemgås i reference (23).
36. Herefter tilsættes testkemikallet og/eller referencekemikallet til jordsøjlerne (se også punkt 23-25). For at opnå en homogen fordeling tilføres opløsninger, suspensioner eller emulsioner af test- og/eller referencekemikallet jævnt over jordsøjlernes overflade. Hvis indarbejdelse i jord anbefales for tilførsel af et testkemikalie, skal det blandes i en lille mængde (f.eks. 20 g) jord og tilsættes jordsøjlerens overflade.
37. Jordsøjlernes overflader dækkes herefter af en sintret glasskive, glasperler, glasfiberfiltre eller et rundt filterpapir til at fordele den kunstige regn jævnt over hele overfladen og undgå at forstyrre jordoverfladen med regndråber. Jo større søjlediameteren er, jo større forsigtighed skal der udvises ved tilførsel af den kunstige regn til jordsøjlerne for at sikre en jævn fordeling af den kunstige regn over jordoverfladen. Så tilsættes den kunstige regn til jordsøjlerne dråbevis ved hjælp af et stempel eller en peristaltisk pumpe eller en tildrypningstragt. Perkolaterne skal helst indsamles i fraktioner, og deres respektive volumener registreres ⁽¹⁾.
38. Efter udvaskning og dræning af søjlerne skæres jordsøjlerne i et passende antal segmenter, alt efter hvilke oplysninger der ønskes fra undersøgelsen, segmenterne ekstraheres med egnede opløsningsmidler eller opløsningsmiddelblandinger og analyseres for testkemikallet og eventuelt for omdannelsesprodukter, for samlet radioaktivitet og for referencekemikallet. Perkolater eller perkolatfraktioner analyseres direkte eller efter ekstraktion for de samme produkter. Når der anvendes et radioaktivt mærket testkemikalie, identificeres alle fraktioner, som indeholder $\geq 10 \%$ af den anvendte radioaktivitet.

Udvaskning med ældede restkoncentrationer

39. Frisk jord (ikke tidligere lufttørret) behandles med en dosis svarende til jordsøjlernes overfladeareal (se punkt 24) af det radioaktivt mærkede testkemikalie og inkuberes under aerobe betingelser ifølge testmetode C.23 (13). Inkubations- (ældnings-)perioden skal være lang nok til at producere væsentlige mængder af omdannelsesprodukter; en ældningsperiode på en halveringstid for testkemikallet anbefales ⁽²⁾, men bør ikke overstige 120 dage. Forud for udvaskningen analyseres den ældede jord for testkemikallet og omdannelsesprodukter heraf.
40. Udvaskningssøjlerne pakkes op til en højde på 28 cm med den samme jord (men lufttørret), som er brugt i ældningsforsøget, jf. punkt 34, og den samlede vægt af de pakke jordsøjler bestemmes også. Jordsøjlerne vædes på forhånd, jf. punkt 35.
41. Testkemikallet og omdannelsesprodukterne heraf tilføres herefter jordsøjlernes overflade i form af ældede jordrester (se punkt 39) som et 2 cm jordsegment. Jordsøjlernes samlede højde (ubehandlet jord + ældet jord) må helst ikke overstige 30 cm (se punkt 34).
42. Udvaskningen udføres som beskrevet i punkt 37.
43. Efter udvaskning analyseres jordsegmenter og perkolater som anført i punkt 38 for testkemikallet, omdannelsesprodukterne heraf og ikkeekstraheret radioaktivitet. For at bestemme, hvor meget af den ældede restkoncentration der tilbageholdes i det øverste 2-cm-lag efter udvaskning, analyseres dette segment separat.

⁽¹⁾ Typiske perkolatvolumener ligger på 230-260 ml svarende til ca. 92-104 % af den samlede anvendte kunstige regn (251 ml), når der bruges jordsøjler på 4 cm i diameter og 30 cm længde.

⁽²⁾ Der kan dannes mere end et vigtigt omdannelsesprodukt i jord, som også kan vise sig på forskellige tidspunkter under et omdannelsesforsøg. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at foretage udvaskningsundersøgelser med ældede restkoncentrationer af forskellig alder.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

44. Mængderne af testkemikalie, omdannelsesprodukter, ikkeekstraherbare stoffer og eventuelt referencekemikaliets anføres i % af anvendt startdosis for hvert jordsegment og hver perkolatfraktion. Der gives en grafisk fremstilling for hver søjle med indtegning af de procentdele, der påvises, som funktion af jorddybder.
45. Når et referencekemikalie medtages i disse søjleudvaskningsundersøgelser, kan udvaskningen af et kemikalie vurderes relativt under anvendelse af relative mobilitetsfaktorer (RMF, se definition i tillæg 3) (1)(11), hvilket giver mulighed for at sammenligne de udvaskningsdata for forskellige kemikalier, der opnås med forskellige jordtyper. Eksempler på RMF-værdier for forskellige plantebeskyttelsesmidler er anført i tillæg 3.
46. Skøn over K_{oc} (normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof) og K_{om} (normaliseret fordelingskoefficient for organisk kulstof) kan også fås fra søjleudvaskningsresultater ved at bruge den gennemsnitlige udvaskningsafstand eller fastslåede korrelationer mellem RMF og henholdsvis K_{om} og K_{oc} (4) eller anvende en simpel kromatografisk teori (24). Sidstnævnte metode bør dog bruges forsigtigt, især når man tager i betragtning, at udvaskningsprocessen ikke udelukkende involverer mættede flowbetingelser, men snarere umættede systemer.

Fortolkning af resultaterne

47. De i denne metode beskrevne søjleudvaskningsundersøgelser giver mulighed for at bestemme testkemikaliet's udvasknings- eller mobilitetspotentiale i jord (i den oprindelige udvaskningsundersøgelse) og/eller dets omdannelsesprodukters udvasknings- eller mobilitetspotentiale i jord (i undersøgelsen af ældede restkoncentrationer efter udvaskning). Disse test giver ikke en kvantitativ forudsigelse af udvaskningsegenskaber under feltbetingelser, men de kan bruges til at sammenligne et kemikalies »udvaskelighed« med andre, hvis udvaskningsegenskaber kan være kendt (24). På samme måde måler de ikke kvantitativt den procentdel af det tilførte kemikalie, som måske når grundvandet (11). Resultaterne af søjleudvaskningsundersøgelser kan dog være en hjælp til at afgøre, om der skal foretages supplerende tilnærmede feltforsøg eller rene feltforsøg for kemikalier, der udviser et højt mobilitetspotentiale i laboratorietest.

Testrapport

48. Rapporten skal indeholde:

Testkemikalie og (eventuelt) referencekemikalie:

- generisk navn, kemisk navn IUPAC- og CAS-nomenklatur), CAS-nummer, kemisk struktur (med angivelse af mærkets placering, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- renhed (urenheder) af testkemikaliets
- for mærkede stoffer, radiokemisk renhed og specifik aktivitet (når det er relevant).

Prøvejordtyper:

- enkeltheder vedrørende indsamlingsstedet
- jordtypernes egenskaber, således pH, organisk kulstof- og lerindhold, tekstur og bulkdensitet (for forstyrret jord)
- mikrobiel aktivitet i jorden (kun for jord, der bruges til ældning af testkemikaliets)
- jordopbevaringsvarighed og -betingelser

Testbetingelser:

- dato for forsøgenes udførelse
- udvaskningssøjlernes længde og diameter
- jordsøjlernes samlede jordvægt
- mængde tilført testkemikalie og eventuelt referencekemikalie

- mængde, hyppighed og varighed af tilførslen af den kunstige regn
- forsøgsopstillingens temperatur
- antal gentagelser (mindst to)
- metoder til analyse af testkemikalie, omdannelsesprodukter og eventuelt referencekemikalie i de forskellige jordsegmenter og perkolater
- metoder til karakterisering og identifikation af omdannelsesprodukter i jordsegmenter og perkolater.

Testresultater:

- tabeller med resultater angivet som koncentrationer og i % af den tilførte dosis til jordsegmenter og perkolater
- eventuelt massebalance
- perkolatvolumener
- udvaskningsafstande og eventuelt relative mobilitetsfaktorer
- grafisk optegning af % fundet i jordsegmenter i forhold til jordsegmentets dybde
- diskussion og fortolkning af resultater

LITTERATUR

- (1) J.A. Guth, N. Burkhard og D.O. Eberle (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) M.H. Russel (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts og P.C. Kearney, Eds.). John Wiley & Sons, Inc.,
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter og D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) J.A. Guth (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Bilag I til Kommissionens direktiv 95/36/EF af 14. juli 1995 om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler, EFT L 172 af 22.7.1995, s. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch (red.).
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italien, 18.-20. januar 1995.

(13) Følgende kapitler i dette bilag:

Kapitel A.4, Damptryk

Kapitel A.6, Vandopløselighed

Kapitel A.8, Fordelingskoefficient, rystekolbemetode

Kapitel A.24, Fordelingskoefficient, HPLC-metode

Kapitel C.7, Nedbrydning — abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH

Kapitel C.18, Adsorption/desorption med en batch-ligevægtmetode

Kapitel C.23, Aerob og anaerob omdannelse i jord

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).
- (15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller og D.R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Første udgave.
- (18) E. Mückenhausen (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) F. Scheffer og P. Schachtschabel (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) J.B. Weber og T.F. Peeper (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) J.B. Weber, L.R. Swain, H.J. Strek og J.L. Sartori (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.
- (23) C.D. Shackelford (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.
- (24) J.W. Hamaker (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 4112, OECD, Paris.
-

Tillæg 1

Definitioner og enheder

Restkoncentration i ældet jord: Testkemikalie og omdannelsesprodukter, der er til stede i jord efter tilførsel og efter en periode, som er lang nok til at muliggøre transport, adsorption, metabolisme og spredningsprocesser, så fordelingen og den kemiske karakter af noget af det tilførte kemikalie ændres (1).

Kunstig regn: 0,01 M CaCl₂ opløsning i destilleret eller deioniseret vand.

Gennemsnitlig udvaskningsafstand: Tværsnit af jordbund, hvor det akkumulerede genfundne kemikalie = 50 % af det samlede genfundne testkemikalie [normalt udvaskningsforsøg], eller (tværsnit af jordbund, hvor akkumuleret genfundet kemikalie = 50 % af det samlede genfundne testkemikalie) — ((tykkelsen af laget med ældet restkoncentration)/2) [undersøgelse af ældede restkoncentrationer efter udvaskning]

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Perkolat: Vandig fase, der trænger igennem en jordprofil eller en jordsøjle (1).

Udvaskning: Proces, hvorved et kemikalie bevæger sig ned gennem jordprofilen eller en jordsøjle (1).

Udvaskningsafstand: Dybeste jordsegment, hvor $\geq 0,5$ % af det tilførte testkemikalie eller den ældede restkoncentration blev fundet efter udvaskningsprocessen (svarende til penetrationsdybde).

Detektionsgrænsen (LOD) og kvantificeringsgrænsen (LOQ): Detektionsgrænsen (LOD) er den koncentration af et kemikalie, under hvilken kemikaliet's identitet ikke kan skelnes fra analysebetingede artefakter. Kvantificeringsgrænsen (LOQ) er den koncentration af et kemikalie, under hvilken koncentrationen ikke kan bestemmes med acceptabel nøjagtighed.

RMF, Relativ mobilitetsfaktor: (testkemikaliet's udvaskningsafstand (cm)) / (referencekemikaliet's udvaskningsafstand (cm))

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode

Omdannelsesprodukt: Alle kemikalier hidrørende fra biotisk eller abiotisk omdannelsesreaktioner i testkemikaliet, herunder CO₂ og produkter, som er bundet i restkoncentrationer.

Jord: En blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold og bebos af små organismer (hovedsagelig mikroskopiske). Jord kan håndteres i to tilstande:

- uforstyrret, som den har udviklet sig med tiden, i karakteristiske lag af forskellige jordtyper
- forstyrret, som den sædvanligvis findes i agerjord, eller når der opgraves prøver til anvendelse i denne testmetode (2).

(1) P.T. Holland (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

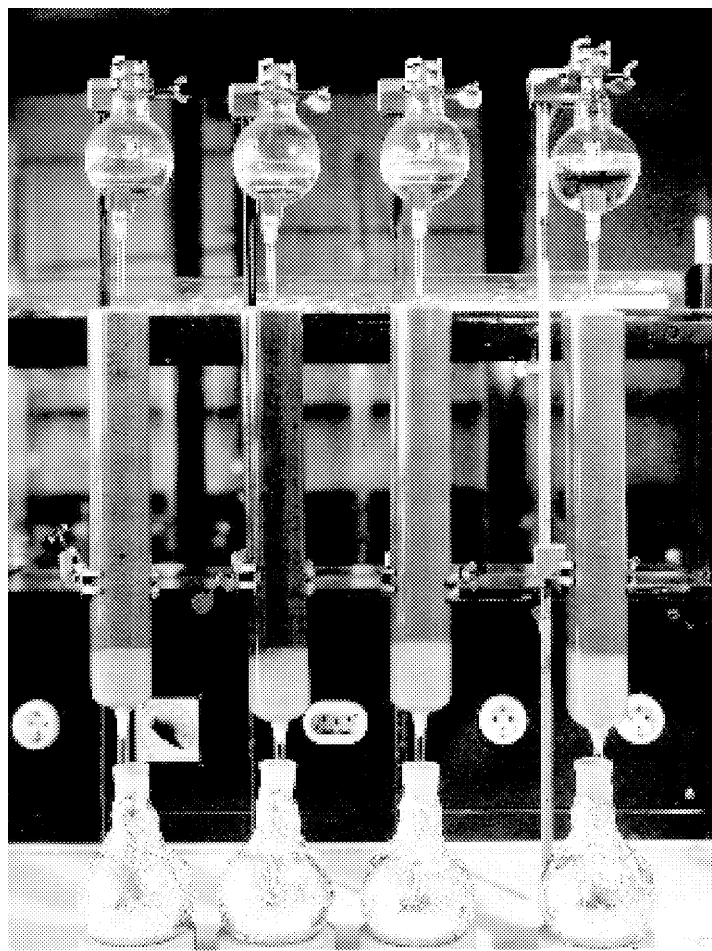
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (vedtaget 12. maj 1981).

Tillæg 2

Figur 1

Eksempel på udvaskningssøjler af glas, som ikke kan skæres i tværsnit

Med en længde på 35 cm og en indvendig diameter på 5 cm (1)



← Tildrypningstragter til tilførsel af kunstig regn

← Sintret glasskive for at undgå at forstyrre jordoverfladen og for at fordele den kunstige regn jævnt

← Glassøjle fyldt med testjord (ved testning af fotolabile produkter pakkes søjlerne i aluminiumsfolie)

← Lag kvartssand

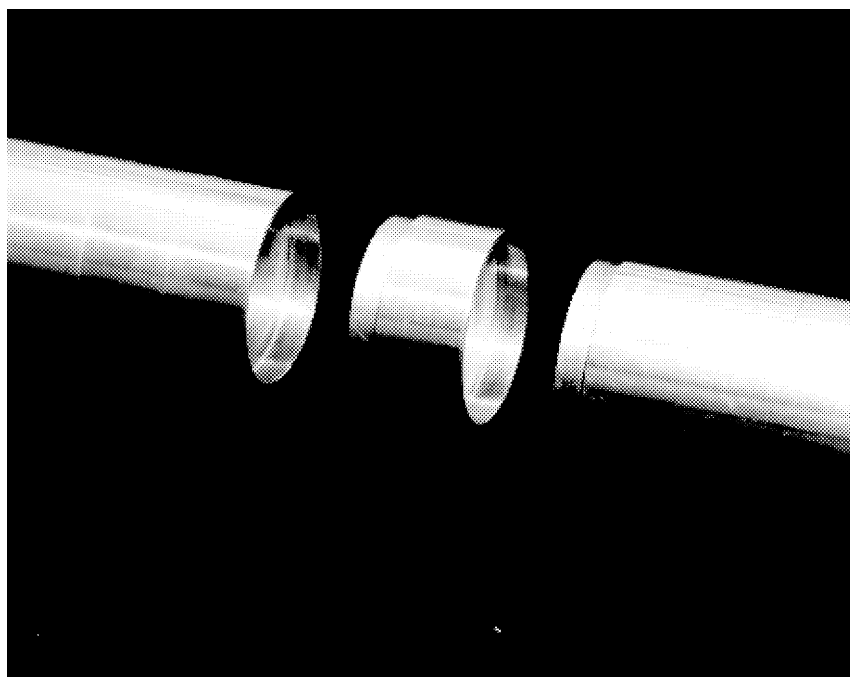
← Glasuldsprop for at holde jorden i søjlen

← Rundbundet kolbe til opsamling af perkolat. Pakket i aluminiumsfolie for at udelukke fotolyse

- (1) N. Drescher (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Figur 2

Eksempel på en metalsøjle, der kan skæres i tværsnit, med en indvendig diameter på 4 cm (1)



- (1) N. Burkhard, D.O. Eberle og J.A. Guth (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. *Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III*, 203-213.

Tillæg 3

Eksempler på relative mobilitetsfaktorer (*) (RMF) for forskellige plantebeskyttelseskemikalier (1)(2) og tilsvarende mobilitetsklasser +

RMF-område	Kemikalie (RMF)	Mobilitetsklasse
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I immobil
0,15-0,8	Profenophos (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazin (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazin, (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II let mobil
0,8-1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazin (1,03), Simazin (1,04), Fluometuron (1,18)	III moderat mobil
1,3-2,5	Prometon (1,67), Cyanazin (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilat (1,98)	IV ret mobil
2,5-5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V mobil
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI meget mobil

(*) Den relative mobilitetsfaktor udledes som følger (3):

$$RMF = \frac{\text{testkemikaliet's udvaskningsafstand (cm)}}{\text{referencekemikaliet's udvaskningsafstand (cm)}}$$

(**) Referencekemikalie

+ Andre systemer til at klassificere et kemikalies mobilitet i jord er baseret på R_f -værdier fra tyndtlagskromatografi i jord (4) og på K_{oc} -værdier (5)(6).

- (1) J.A. Guth (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium »Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.« Canterbury, UK, 1.-3. juli 1985.
- (2) J.A. Guth og W.D. Hörmann (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) C.I. Harris (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) C.S. Helling (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) P.J. McCall, D.A. Laskowski, R.L. Swann og H.J. Dishburger (1981). Measurements 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 D.C.
- (6) J.M. Hollis (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

C.45. SKØN OVER EMISSIONER FRA KEMISK BESKYTTET TRÆ TIL MILJØET: LABORATORIEMETODE FOR TRÆVARER, DER ER I DIREKTE KONTAKT MED FERSKVAND ELLER HAVVAND

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 313 (2007). Emissionerne fra kemisk behandlet træ til miljøet skal bestemmes kvantitativt, så der kan foretages en miljørisikovurdering af det behandlede træ. I denne testmetode beskrives en laboratoriemetode til at foretage skøn over emissioner fra kemisk behandlet træ i to situationer, hvor der kan trænge emissioner ud i miljøet:
 - emissioner fra behandlet træ i kontakt med ferskvand. Emissioner fra det behandlede træs overflade kan trænge ud i vandet.
 - emissioner fra behandlet træ i kontakt med havvand. Emissioner fra det behandlede træs overflade kan trænge ud i havvandet.
2. Denne testmetode har til formål at teste emissioner fra træ og trævarer, som ikke er dækket og er i kontakt med ferskvand eller havvand. Brugsklasser benyttes internationalt til at kategorisere den biologiske fare, det behandlede træ udsættes for. Brugsklasser definerer også den situation, hvor den behandlede vare bruges, og bestemmer, hvilke delmiljøer (luft, vand, jord) der potentielt er i fare på grund af det kemisk beskyttede træ.
3. Testmetoden er en laboratorieprocedure til at udtage prøver fra vand, der har været brugt til at nedsænke beskyttet træ, med stigende tidsintervaller efter eksponeringen. Mængden af emissioner i prøven hænger sammen med træets overfladeareal og eksponeringens længde med henblik på at anslå en udstrømning i mg/m²/dag. Udstrømningen (udvaskningshastigheden) efter perioder med stigende eksponering kan således anslås.
4. Emissionsmængden kan bruges i en miljørisikovurdering af det beskyttede træ.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Karakteren og sværhedsgraden af mekanismen for ferskvands udvaskning ved træoverfladen formodes ikke at være identisk med havvands udvaskning fra en træoverflade. For træbeskyttelsesmidler eller blandinger, som anvendes til behandling af træ, der bruges i nærheden af havvand, er en undersøgelse af udvaskning fra træ derfor nødvendig for havvand.
6. I tilfælde af træ behandlet med et træbeskyttelsesmiddel skal træet være repræsentativt for træ, som bruges erhvervsmæssigt. Det bør behandles i overensstemmelse med producentens instrukser og i henhold til relevante standarder og specifikationer. Parametrene for efterbehandling af træet før påbegyndelse af testen anføres.
7. De anvendte træprøver skal være repræsentative for de benyttede varer (f.eks. med hensyn til art, tæthed eller andre kendetegn).
8. Testen kan foretages på træ, hvor der benyttes en gennemtrængningsproces eller påføring på overfladen, eller på behandlet træ, som har fået en supplerende obligatorisk overfladebehandling (f.eks. maling, der er påført som et krav for kommerciel brug).
9. Vandets sammensætning, mængde, pH-værdi og fysiske form er vigtig ved bestemmelse af kvantitet, indhold og art af emissionerne fra træet.

TESTMETODENS PRINCIP

10. Kemisk behandlede testemner af træ nedsænkes i vand. Vandet (prøven) optages og analyseres kemisk tilstrækkeligt mange gange i løbet af eksponeringsperioden til, at der kan foretages statistiske beregninger. Emissionsrater i mg/m²/dag beregnes på grundlag af analyseresultater. Prøvetagningsperioderne skal registreres. Test med ubehandlede prøver kan afbrydes, hvis der ikke påvises nogen baggrund i de første tre datapunkter.

11. Når ubehandlede træprøver medtages, giver det mulighed for at bestemme baggrunds niveauer for andre emissioner fra træ end det anvendte beskyttelsesmiddel.

KVALITETSKRITERIER

Nøjagtighed

12. Testmetodens nøjagtighed med hensyn til at anslå emission afhænger af, at testemnerne er repræsentative for erhvervsmæssigt behandlet træ, i hvilken grad vandet er repræsentativt for rigtigt vand, og på hvilken måde eksponeringen er repræsentativ for naturlige betingelser.
13. Analysemetodens nøjagtighed, præcision og repeterbarhed bør bestemmes, før testen udføres.

Reproducerbarhed

14. Tre vandprøver udtages og analyseres, og middelværdien bruges som emissionsværdi. Resultaternes reproducerbarhed i et laboratorium og mellem forskellige laboratorier afhænger af nedsænkingsbetingelserne og det træ, der bruges som testemner.

Acceptable resultatintervaller

15. Et resultatinterval fra denne test, hvor de øvre og nedre værdier adskiller sig med mindre end en størrelsesorden, er acceptabel.

TESTBETINGELSER:

Vand

16. Scenarier for udvaskning med ferskvand: Deioniseret vand (f.eks. ASTM D 1193 Type II) anbefales til brug i udvaskningstesten, når træ eksponeret for ferskvand skal vurderes. Vandtemperaturen skal være 20 °C +/- 2 °C, og den målte pH-værdi og vandtemperatur inkluderes i testrapporten. En analyse af prøver af det anvendte vand, som er taget før nedsænkningen af de behandlede prøver, giver mulighed for at anslå de analyserede kemikalier i vandet. Dette er en kontrol for at bestemme baggrunds niveauer for de kemikalier, som herefter analyseres kemisk.
17. Scenarier for udvaskning med havvand: Det anbefales at bruge kunstigt havvand (f.eks. ASTM D 1141 Kunstigt havvand uden tungmetaller) i udvaskningstesten, når man skal vurdere træ eksponeret for havvand. Vandtemperaturen skal være 20 °C +/- 2 °C, og den målte pH-værdi og vandtemperatur inkluderes i testrapporten. En analyse af prøver af det anvendte vand, som er taget før nedsænkningen af de behandlede prøver, giver mulighed for at anslå de analyserede kemikalier i vandet. Dette er en kontrol til analysen af baggrunds niveauer for vigtige kemikalier.

Testemner af træ

18. Træsarterne bør være typiske for de træsorter, der bruges til effektivitetstestning af træbeskyttelsesmidler. De anbefalede sorter er *Pinus sylvestris* L. (skovfyr), *Pinus resinosa* Ait. (harpiksfyr) eller *Pinus spp* (sumpfyr). Der kan foretages supplerende test med andre sorter.
19. Der anvendes lige nopret træ uden knaster. Materiale med synlig harpiks bør undgås. Træet skal være typisk for træ, der er tilgængeligt i handlen. Kilde, tæthed og antal årringe pr. 10 mm registreres.
20. Det anbefales at have testemner i sæt à fem træklodser af en størrelse ifølge EN 113 (25 mm × 50 mm × 15 mm) med længderetningen parallelt med træets fibre, skønt andre dimensioner, såsom 50 mm × 150 mm × 10 mm kan anvendes. Testemnet bør være helt nedsænket i vand. Testemnet bør bestå af 100 % splintved. Hvert emne mærkes entydigt, så det kan identificeres gennem hele testen.
21. Alle testemner bør være høvlet eller planskåret, og overfladerne må ikke være slebne.

22. Der skal mindst bruges fem sæt testemner til analyse: tre sæt emner behandles med træbeskyttelsesmiddel, et sæt emner er ubehandlet, og et sæt emner bruges til at anslå testemnernes fugtindhold efter ovntørring og før behandling. Der klargøres tilstrækkeligt mange testemner til, at der kan udvælges tre sæt emner, som ligger inden for 5 % af middelværdien for retention af træbeskyttelsesmiddel for det samlede antal testemner.
23. Alle testemner endeforsegles med et kemikalie, som forhindrer, at beskyttelsesmidlet trænger ind i emnernes endeflade, eller forhindrer udvaskning fra emnerne via endefladen. Ved påføring af endeforseglingen er det nødvendigt at skelne mellem emner, der anvendes til overfladebehandling og til gennemtrængningsprocesser. Der skal kun påføres endeforsegling før behandling i tilfælde af overfladebehandling.
24. Endefladen skal være åben for behandlinger via gennemtrængningsprocesserne. Derfor skal emnerne endeforsegles ved afslutningen af konditioneringsperioden. Emissionen skal kun anslås for overfladeområdet i længderetningen. Forseglingsmidler inspiceres og påføres om nødvendigt igen før indledning af udvaskningen og må ikke påføres igen, efter at udvaskningen er påbegyndt.

Nedsækningskar

25. Karret er fremstillet af et inaktivt materiale og er stort nok til at rumme fem EN113 træprøver i 500 ml vand, hvilket giver et forhold mellem overfladeareal og vandvolumen på 0,4 cm²/ml.

Testopstilling

26. Testemnerne anbringes på et stativ, som giver mulighed for, at alle emnets eksponerede overflader kommer i kontakt med vandet.

FREM GANGSMÅDE FOR KEMISK BESKYTTELSE

Klargøring af de beskyttede testemner

27. De testemner af træ, der skal behandles med det kemiske beskyttelsesmiddel, som testes, behandles efter den for midlet anførte metode, som kan være en gennemtrængningsbehandling eller en overfladebehandling, hvilket kan ske ved dyp, spray eller børste.

Beskyttelsesmidler, der skal påføres ved en gennemtrængningsbehandling

28. Der fremstilles en opløsning af beskyttelsesmidlet, som vil sikre den anførte optagelse eller retention, når det påføres ved gennemtrængningsbehandlingen. Trætestemnet vejes og måles. Gennemtrængningsbehandlingen skal ske som anført for anvendelsen af beskyttelsesmidlet på træ til brug i brugsklasse 4 eller 5. Emnet vejes igen efter behandling, og beskyttelsesmidlets retention (kg/m³) beregnes ud fra ligningen:

$$\frac{\text{Masse efter behandling (kg)} - \text{Masse før behandling (kg)}}{\text{Testemnevolumen (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Opløsningens koncentration (\% masse/ masse)}}{100}$$

29. Bemærk, at der i denne test kan bruges industrielt behandlet tømmer (f.eks. ved vakuumtrykimprægnering). De anvendte fremgangsmåder registreres, og retentionen af materiale, der er behandlet på denne måde, skal analyseres og registreres.

Beskyttelsesmidler, der skal påføres ved overfladebehandling

30. Overfladebehandlingen omfatter dypning, påsprøjtning eller børstning af testemnerne. Processen og doseringen (f.eks. liter/m²) bør være som anført for overfladebehandling med beskyttelsesmidlet.

31. Bemærk, at der også i denne test kan bruges industrielt behandlet tømmer. De anvendte fremgangsmåder registreres, og retentionen af materiale, der er behandlet på denne måde, skal analyseres og registreres.

Konditionering af testemnerne efter behandling

32. Efter behandling konditioneres de behandlede testemner i overensstemmelse med anbefalingerne fra leverandøren af testbeskyttelsesmidlet ifølge mærkekravene for beskyttelsesmidlet eller i overensstemmelse med kommerciel behandlingspraksis eller ifølge EN 252 Standard.

Klargøring og udvælgelse af testemner

33. Efter konditioneringen efter behandling beregnes middelretentionen for gruppen af testemner, og tre repræsentative sæt emner med en retention inden for 5 % af middelværdien for gruppen udvælges tilfældigt til udvaskningsmålinger.

FREM GANGSMÅDE FOR EMISSIONSMÅLINGER FRA BESKYTTELS ES MIDLET

Nedsænkning smetode

34. Testemnerne vejes og nedsænkes efterfølgende fuldstændigt i vandet, og dato og tidspunkt registreres. Karret dækkes for at mindske fordampning.
35. Vandet udskiftes med følgende intervaller: 6 timer, 1 dag, 2 dage, 4 dage, 8 dage, 15 dage, 22 dage, 29 dage (bemærk: dette er samlede tider, ikke intervalltider). Tidspunkt og dato for vandudskiftningen og massen af vand, der opsamles fra karret, registreres.
36. Efter hver vandudskiftning opbevares en vandprøve, hvori sættet af testemner har været nedsænket, til senere kemisk analyse.
37. Prøvetagningsproceduren giver mulighed for at beregne profilen for mængden af emissioner i forhold til tid. Prøver opbevares under betingelser, der bevarer analysanden, f.eks. i et køleskab i mørke for at mindske mikrobiel vækst i prøven før analyse.

EMISSIONSMÅLINGER

Behandlede prøver

38. Opsamlet vand analyseres kemisk for det aktive stof og/eller relevante nedbrydnings-/omdannelsesprodukter efter behov.

Ubehandlede prøver

39. Opsamling af vand (prøven) i dette system og efterfølgende analyse af kemikalier, der var udvasket fra de ubehandlede træprøver, giver mulighed for at anslå beskyttelsesmidlets mulige emissionsrate fra ubehandlet træ. Opsamling og analyse af vandprøven efter stadigt længere perioders eksponering gør det muligt at anslå emissionsratens ændringshastighed i forhold til tid. Denne analyse er en kontrolprocedure for at bestemme testkemikaliets baggrundsniveauer i ubehandlet træ for at bekræfte, at det træ, der blev brugt som kilde til prøverne, ikke tidligere var blevet behandlet med beskyttelsesmidlet.

DATA OG RAPPORTERING

Kemiske analyser

40. Det opsamlede vand analyseres kemisk, og vandanalyseresultatet udtrykkes i passende enheder, f.eks. µg/l.

Rapportering af data

41. Alle resultater registreres. Tillægget viser et eksempel på en foreslået registreringsformular til et sæt behandlede testemner og et oversigtsskema til beregning af middelemissionsværdierne over hvert prøvetagningsinterval.
42. Den daglige emissionsstrøm i $\text{mg/m}^2/\text{dag}$ beregnes ved at tage middelværdien af de tre målinger fra de tre replikater og dividere dem med antal dages nedsækning.

Testrapport

43. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:
 - navnet på leverandøren af det testede beskyttelsesmiddel
 - det testede beskyttelsesmiddels specifikke og entydige navn eller kode
 - handelsnavn eller generisk navn på den eller de aktive ingredienser med en generisk beskrivelse af hjælpestoffer (f.eks. hjælpeopløsningsmiddel, harpiks) og sammensætningen i % m/m af ingredienserne
 - den relevante retention eller afsætning (i henholdsvis kg/m^3 eller l/m^2), der er anført for træ, som bruges i kontakt med vand
 - den anvendte træsort med densitet og vækstrate i ringe pr. 10 mm
 - afsætning eller retention af det testede beskyttelsesmiddel og den anvendte formel til at beregne retentionen udtrykt som l/m^2 eller kg/m^3
 - metoden til påføring af beskyttelsesmidlet med angivelse af den anvendte behandlingsplan for en gennemtrængningsproces og påføringsmetoden, hvis der blev benyttet overfladebehandling
 - datoen for anvendelse af beskyttelsesmidlet og et skøn over testemnernes fugtindhold udtrykt i procent
 - anvendte konditioneringsprocedurer med angivelse af type, betingelser og varighed
 - angivelse af anvendt endeforsegling og antal behandlinger
 - angivelse af eventuel efterfølgende behandling af træet, f.eks. angivelse af leverandør, type, egenskaber og tilsætning af maling
 - tidspunkt og dato for hver nedsækning, den vandmængde, som blev brugt ved hver nedsækning af testemnerne, og vandmængde absorberet af træet under nedsækningen
 - eventuel variation fra den beskrevne metode og eventuelle faktorer, der kan have påvirket resultaterne.

LITTERATUR

- (1) Europæisk standard, EN 84 — 1997. Træbeskyttelse. Accelereret ældning af imprægneret træ inden biologisk prøvning. Udvaskning.
- (2) Europæisk standard, EN 113/A1 — 2004. Træbeskyttelse. Prøvningsmetode til bestemmelse af beskyttelseseffektivitet mod trænedbrydende svampe (basidiomycetes). Bestemmelse af toksiske værdier.
- (3) Europæisk standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) Europæisk standard, EN 335 — Del 1: 2006. Holdbarhed af træ og træbaserede produkter — Definition af brugsklasser — Del 1: Generelt.

-
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
 - (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.
-

Tillæg 1

Registreringsformular for testmetode

Skøn over emissioner fra kemisk beskyttet træ til miljøet: laboratoriemetode for trævarer, der er i direkte kontakt med ferskvand eller havvand

Testlaboratorium	
Træbeskyttelsesmiddel	
Leverandør af beskyttelsesmidlet	
Beskyttelsesmidlets specifikke og entydige navn eller kode	
Beskyttelsesmidlets handelsnavn eller generiske navn	
Hjælpestoffer	
Relevant retention for træ brugt i kontakt med vand	
Anvendelse	
Anvendelsesmetode	
Anvendelsesdato	
Formel anvendt til beregning af retentionen:	
Konditioneringsmetode	
Konditioneringsens varighed	
Endeforsegling / antal behandlinger	
Efterbehandling	Hvis denne oplysning er relevant
Prøveemner	
Træsorter	
Træets densitet	(minimum ... middelværdi ... maksimum)
Vækstrate (ringe pr. 10 mm)	(minimum ... middelværdi ... maksimum)
Vandindhold	

Testopstillinger (*)	Retention (f.eks. kg/m ³)
Behandlet »x«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Behandlet »y«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Behandlet »z«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Ubehandlet	
Variation i testmetodeparametre	f.eks. vandkvalitet, testemnernes dimensioner osv.
(*) x, y, z repræsenterer de tre kontraprøver	

Klokkeslæt	Vandud-skift-ning	Emnemasse		Vandoptagelse		Vandprøve				
		Behandlet (middel)	Ubehandlet	Behandlet (middel)	Ubehandlet		Testvand	x	y	z
	Dato:	g	g	g	g	nr.	pH	pH	pH	pH
Starttids- punkt										
6 t.						1				
24 t.						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

Der udfærdiges separate tabeller for hver aktiv ingrediens

Klokkeslæt	Vandud-skift-ning	Analyseresultater														
		Ubehandlede emner			Behandlede emner											
		Koncentration af aktivt stof i vand mg/l	Udledt mængde mg/m²	Emissions-rate mg/m²/d	Koncentration af aktivt stof i vand				Udledt mængde				Emissionsrate			
	x				y	z	Middel	x	y	z	Middel	x	y	z	Middel	
	Dato:				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d
6 t.																
24 t.																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Bemærk: Da resultater fra ubehandlede prøver måske skal bruges til at korrigere emissionsrater fra behandlede prøver, anføres ubehandlede resultater først, og alle værdier for behandlede prøver vil være »korrigerede værdier«. Der kan også være en korrektion for den oprindelige vandanalyse.

*Tillæg 2***Definitioner**

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

C.46. BIOAKKUMULERING I BENTISKE OLIGOCHAETER, DER LEVER I SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 315 (2008). Dyr, der lever i og af sedimenter, kan eksponeres for sedimentbundne stoffer (1). Blandt disse sedimenttædere spiller akvatiske oligochaeter en vigtig rolle i bunden af de akvatiske systemer. De lever i sedimentet og repræsenterer ofte de hyppigst forekommende arter, især i habitater med miljøbetingelser, som er negative for andre dyr. Ved bioturbation af sedimentet og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af sådanne stoffer for andre organismer, f.eks. bentivore fisk. I modsætning til epibentiske organismer, graver endobentiske akvatiske oligochaeter sig ned i sedimentet og indtager sedimentpartikler under sedimentoverfladen. Af den grund eksponeres disse organismer for stoffer ad mange optagelsesveje, bl.a. direkte kontakt, indtagelse af forurenede sedimentpartikler, porevand og overliggende vand. Nogle arter af terrestriske oligochaeter, som i øjeblikket anvendes i forbindelse med økotoxikologiske test, er beskrevet i tillæg 6.
2. De parametre, der karakteriserer bioakkumuleringen af et stof, omfatter først og fremmest bioakkumuleringsfaktoren (BAF), hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e). Detaljerede definitioner på disse parametre kan ses i tillæg 1.
3. For at vurdere stoffers bioakkumuleringssevne generelt og undersøge bioakkumuleringen af stoffer, som deler sig i eller på sedimenter, er der behov for en rumspecifik testmetode (1)(2)(3)(4).
4. Denne testmetode har til formål at vurdere bioakkumulering af sedimenttilknyttede stoffer i endobentiske oligochaeter. Testkemikallet tilsættes til sedimentet. Brug af forurenat sediment skal simulere et sediment, der er kontamineret.
5. Denne metode er baseret på eksisterende testmetoder for sedimenttoksicitet og bioakkumulering, (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Andre nyttige dokumenter er: drøftelser og resultater af en international workshop (11) og resultatet af en international ringtest (12).
6. Denne test gælder for stabile, neutrale organiske stoffer, som normalt binder sig til sedimenter. Bioakkumulering af sedimentbundne, stabile metallo-organiske forbindelser kan også måles med denne metode (12). Den kan ikke anvendes på metaller og andre sporstoffer (11) uden modifikation af testdesignet med hensyn til substrat- og vandmængder og muligvis vævsprøvestørrelse.

FORUDSÆTNING OG INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

7. Der findes i øjeblikket kun nogle få indarbejdede kvantitative struktur-aktivitetsrelationer (QSAR) vedrørende bioakkumulering (14). Den mest udbredte relation er korrelationen mellem henholdsvis bioakkumulering og biokonzentration af stabile organiske stoffer og deres lipofilitet (udtrykt som logaritmen af octanol/vandfordelingskoefficienten ($\log K_{ow}$), (se definition i tillæg 1), som er blevet udviklet til beskrivelse af en stofs fordeling mellem vand og fisk. Der er også fastslået korrelationer for sedimentmiljøet ved hjælp af denne relation (15)(16)(17)(18). $\log K_{ow}$ -log BCF-korrelationen kan som en væsentlig QSAR være nyttig til et foreløbigt skøn over sedimentbundne stoffers bioakkumuleringspotentiale. BAF kan dog blive påvirket af testorganismens fedtindhold og sedimentets organiske kulstofindhold. Derfor kan den organiske kulstofvandfordelingskoefficient (K_{oc}) måske også benyttes som en vigtig determinant for sedimentbundne organiske stoffers bioakkumulering.
8. Denne test kan anvendes på:
 - stabile organiske stoffer med $\log K_{ow}$ -værdier mellem 3,0 og 6,0 (5)(19) og ekstremt lipofile stoffer med en $\log K_{ow}$ på mere end 6,0 (5)
 - stoffer, som tilhører en klasse af organiske stoffer, der er kendt for deres bioakkumuleringspotentiale i levende organismer, f.eks. overfladeaktive stoffer eller stærkt adsorptive stoffer (f.eks. høj K_{oc}).

9. Oplysninger om testkemikaliet, såsom sikkerhedsforanstaltninger, korrekte oplagringsbetingelser og stabilitet samt analysemetoder, bør indhentes, før undersøgelsen indledes. Vejledning om stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes i (20) og (21). Før man udfører en test for bioakkumulering med akvatiske oligochaeter, skal der foreligge følgende oplysninger om testkemikaliet:
- generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed
 - vandopløselighed [testmetode A.6 (22)]
 - octanol/vand-fordelingskoefficient, K_{ow} [testmetode A.8 og A.24] (22);
 - sediment/vand-fordelingskoefficient, udtrykt som K_d eller K_{oc} [testmetode C.19 (22)]
 - hydrolyse [testmetode C.7 (22)]
 - fototransformation i vand (23)
 - damptryk [testmetode A.4 (22)]
 - let bionedbrydelighed [testmetode C.4 og C.29 (22)]
 - overfladespænding [testmetode A.5 (22)]
 - kritisk micellekoncentration (24).
- Herudover vil følgende oplysninger være relevante — hvis de foreligger:
- bionedbrydning i vandmiljøet [testmetode C.24 og C.25 (22)]
 - Henrys lovkonstant.
10. Radioaktivt mærkede testkemikalier kan gøre analyse af vand- og sedimentprøver samt biologiske prøver lettere og kan benyttes til at afgøre, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter. Den her beskrevne metode blev valideret i en international ringtest (12) for ^{14}C -mærkede stoffer. Hvis det samlede indhold af radioaktivt materiale måles, er bioakkumuleringsfaktoren (BAF) baseret på det oprindelige stof, inklusive eventuelt tilbageholdte nedbrydningsprodukter. Det er også muligt at kombinere en metabolismeundersøgelse med en bioakkumuleringsundersøgelse gennem analyse og kvantitativ bestemmelse af den procentvise andel af oprindeligt stof og nedbrydningsprodukterne heraf i prøver, som tages ved afslutningen af optagelsesfasen, eller når bioakkumuleringen er på sit højeste niveau. Under alle omstændigheder anbefales det, at BAF-beregningen baseres på koncentrationen af det oprindelige stof i organismerne og ikke kun på det samlede indhold af radioaktivt restmateriale.
11. Ud over testkemikaliet's egenskaber er andre nødvendige oplysninger toksiciteten for de oligochaetararter, der skal anvendes i testen, såsom en gennemsnitlig dødelig dosis (LC_{50}) for den tid, der er nødvendig til optagelsesfasen, for at sikre, at valgte eksponeringskoncentrationer er meget lavere end de toksiske niveauer. Der anvendes fortrinsvis toksicitetsværdier fra langvarige forsøg vedrørende subletale effektparametre, hvis de foreligger (EC_{50}). Foreligger disse data ikke, kan en akut toksicitetstest under de samme betingelser som testbetingelserne for bioakkumulering eller toksicitetsdata om andre surrogatarter være nyttige oplysninger.
12. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testopløsningerne, i sedimentet og i det biologiske materiale, oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares, samt sikkerhedsdatablade for materialer. Teststoffets detektionsgrænser i vand, sediment og ormevæv bør også være kendt. Hvis der anvendes et radioaktivt mærket teststof, skal den specifikke radioaktivitet (dvs. Bq mol^{-1}), det radioaktivt mærkede atoms position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, også være kendt. Teststoffets specifikke radioaktivitet bør være så høj som muligt for at påvise så lave testkoncentrationer som muligt (11).
13. Oplysninger om kendetegnene for det sediment, der skal anvendes (f.eks. oprindelsen af sedimentet eller dets bestanddele, porevandets pH-værdi og ammoniakkoncentration (sediment fra marker), organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler og procent tørvægt), bør også være tilgængelige (6).

PRINCIP FOR TESTEN

14. Testen består af to faser: optagelsesfasen (eksponering) og elimineringsfasen (eftereksponering). I optagelsesfasen bliver ormene eksponeret for sediment tilsat teststoffet overhældt med rekonstitueret vand og eventuelt ækvilibreret (11). Grupper af kontrolorme holdes under identiske betingelser uden teststoffet.
15. Til elimineringsfasen overføres ormene til et sediment-vandsystem uden teststof. En elimineringsfase er nødvendig for at få oplysninger om, ved hvilken hastighed teststoffet udskilles af testorganismene (19)(25). En elimineringsfase er altid påkrævet, medmindre optagelsen af teststoffet i eksponeringsfasen har været ubetydelig (f.eks. hvis der ikke er nogen statistisk forskel mellem koncentrationen af teststoffet i test- og kontrolormene). Hvis der ikke er nået en steady state i optagelsesfasen, kan bestemmelsen af kinetikken — BAF_k , hastighedskonstanten/-konstanterne for optagelse og eliminering — ske ved hjælp af resultaterne af elimineringsfasen. Ændringer i koncentrationen af teststoffet i/på ormene overvåges i løbet af begge faser i testen.
16. I optagelsesfasen foretages der målinger, indtil BAF har nået et plateau eller en steady state. Som standard varer optagelsesfasen 28 dage. Erfaringer fra praksis har vist, at en 12-14-dages optagelsesfase er tilstrækkelig til, at flere stabile, neutrale organiske stoffer kan nå steady state (6)(8)(9).
17. Hvis steady state imidlertid ikke nås inden for 28 dage, påbegyndes elimineringsfasen ved at overføre eksponerede oligochaeter til beholdere indeholdende det samme medium uden teststoffet. Elimineringsfasen afsluttes, enten når der er målt en koncentration på 10 % i ormene på optagelsesfasens dag 28 nås eller efter en maksimal varighed på 10 dage. Restkoncentrationen i ormene ved afslutningen af elimineringsfasen registreres som et supplerende endepunkt, f.eks. som ikkeeliminerede restkoncentrationer. Bioakkumuleringsfaktoren (BAF_{ss}) beregnes fortrinsvis både som forholdet mellem koncentrationen i ormene (C_o) og i sedimentet (C_s) ved tilsyneladende steady state og som en kinetisk bioakkumuleringsfaktor, BAF_k som forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e), idet kinetikken antages at være af første orden. Hvis der ikke er opnået steady state inden for 28 dage, beregnes BAF_k ud fra hastighedskonstanten/-konstanterne for optagelse og eliminering. Se beregning i tillæg 2. Hvis der ikke kan anvendes kinetik af første orden, må der benyttes mere komplekse modeller (tillæg 2 og reference (25)).
18. Hvis der ikke opnås steady state inden for 28 dage, kan optagelsesfasen eventuelt forlænges, så grupper af eksponerede orme om muligt kan underkastes yderligere målinger, indtil der steady state er nået. Sideløbende bør elimineringsfasen dog påbegyndes på optagelsesfasens dag 28.
19. Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for eliminering (eller konstanterne, hvis der anvendes mere komplekse modeller), den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_k) og så vidt muligt konfidensgrænserne for hver af disse parametre beregnes ud fra computerbaserede modelligninger (se modeller i tillæg 2). En models tilpasningsgrad kan bestemmes ud fra korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter tæt på en indikerer god tilpasning).
20. For at reducere variabiliteten i testresultater for organiske stoffer med høj lipofilitet, bør bioakkumuleringsfaktorer yderligere udtrykkes i forhold til testorganismernes fedtindhold og til det organiske kulstofindhold (TOC) i sedimentet (biota-sedimentakkumuleringsfaktor eller BSAF i $\text{kg sediment TOC kg}^{-1}$ fedtindhold i orm). Denne tilgang er baseret på erfaringer og teoretiske korrelationer for vandmiljøet, hvor der — for nogle kemiske klasser — er et klart forhold mellem et stofs bioakkumuleringssevne og dets lipofilitet, som er blevet klart fastslået for fisk som modelorganismer (14)(25)(27). Der er også et forhold mellem testfiskens fedtindhold og den observerede bioakkumulering af disse stoffer. For bentiske organismer er der konstateret lignende korrelationer, f.eks. (15)(16)(17)(18). Hvis tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, kan testorganismernes fedtindhold bestemmes på det samme biologiske materiale som det, der benyttes til bestemmelse af koncentrationen af teststoffet. Det er dog praktisk i det mindste i starten eller — fortrinsvis — ved afslutningen af optagelsesfasen at benytte akklimatiserede kontrol dyr til måling af fedtindholdet, som herefter kan bruges til at normalisere BAF -værdierne.

TESTENS VALIDITET

21. Testens validitet forudsætter følgende:

- Den akkumulerede dødelighed for ormene (kontroller og behandlinger) indtil testens afslutning må ikke overstige 20 % af det oprindelige antal.
- For at sikre maksimal eksponering bør det endvidere påvises, at ormene graver sig ned i sedimentet. Se yderligere oplysninger i punkt 28.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testarter

22. Flere arter af akvatiske oligochaeter kan anvendes til testen. De mest almindeligt anvendte arter er anført i tillæg 6.
23. Toksicitetstest (96 h, kun i vand) bør foretages med jævne mellemrum (f.eks. hver måned) med et toksisk referencestof som kaliumchlorid (KCl) eller kobbersulfat (CuSO_4) (1) for at påvise testdyrenes sundhedstilstand (1)(6). Foretages der ikke referencetoksicitetstest med jævne mellemrum, bør det parti organismer, som skal anvendes i en sedimentbioakkumuleringstest, kontrolleres under anvendelse af et toksisk referencestof. Måling af fedtindholdet kan også give nyttig information om dyrenes tilstand.

Dyrkning af testorganismer

24. For at have et tilstrækkeligt antal orme til at foretage bioakkumuleringstest kan det være nødvendigt at holde ormene i en permanent laboratoriekultur for enkeltarter. Laboratoriedyrkningsmetoder for udvalgte testarter er opsummeret i tillæg 6. Se nærmere oplysninger i reference (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparater

25. Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, som kan opløses eller absorbere teststofferne eller afgive andre stoffer og have en skadelig virkning på testorganismene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardbeholdere af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af forsøgsorm. Det bør undgås at bruge bløde plastslanger til administration af vand og luft. Der bør bruges polytetrafluorethylen, rustfrit stål og/eller glas til alt udstyr, der kommer i berøring med testmedierne. For stoffer med høj adsorptionskoefficient, såsom syntetiske pyrethroider, kan det være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug (5). For radioaktivt mærkede teststoffer og for flygtige stoffer bør stripning og udstømning af det strippede testkemikalie omhyggeligt undgås. Udskillere (f.eks. gasvaskeflasker af glas) med egnede absorbenter benyttes til at tilbageholde eventuelle reststoffer, der fordamper fra testbeholderne (11).

Vand

26. Overliggende vand skal være af en sådan kvalitet, at testarten kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Rekonstitueret vand ifølge testmetode C.1 (25) bør bruges som overliggende vand i testene samt i laboratoriedyrkning af orme. Det har vist sig, at flere testarter kan overleve, vokse og formere sig i denne type vand (8), og der opnås maksimal standardisering af test- og kulturbetingelser. Vandet bør som minimum være karakteriseret ved pH, ledningsevne og hårdhed. En analyse af vandet for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger (tillæg 4).
27. Vandet bør være af konstant kvalitet under hele testen. Det overliggende vands pH-værdi bør ligge på 6-9. Den samlede hårdhed bør ligge på 90-400 mg CaCO_3 pr. liter ved påbegyndelse af testen (7). pH- og hårdhedsområder i det nævnte rekonstituerede vand er anført i testmetode C.1 (25). Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdheder og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed. I tillæg 4 sammenfattes de øvrige kriterier for acceptabelt fortyndingsvand i henhold til OECD TG 210 (34).

Sediment

28. Sedimentet skal være af en sådan kvalitet, at testorganismene kan overleve og helst forplante sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Ormene bør grave sig ned i sedimentet. Graveadfærd kan have indflydelse på eksponeringen og dermed på BAF. Derfor bør testorganismernes undgåelse af sediment eller graveadfærd registreres, hvis uklarhed i det overliggende vand giver mulighed for sådanne observationer. Ormene (kontrol- og behandlingsgrupper) bør grave sig ned i sedimentet inden for en periode på 24 timer efter tilsætning til testbeholderne. Såfremt der observeres manglende nedgravning eller undgåelse af sediment (f.eks. over 20 % i mere end halvdelen af optagelsesfasen), viser dette enten, at testbetingelserne ikke er hensigtsmæssige, eller at testorganismene ikke er sunde, eller også at koncentrationen af teststoffet fremkalder denne adfærd. I så fald bør testen stoppes og gentages på bedre betingelser. Der kan opnås yderligere oplysninger om indtagelse af sediment ved anvendelse af de metoder, der er beskrevet i (35)(36), som indeholder nærmere oplysninger om indtagelse af sediment og partikelselektion i testorganismene. Eventuel tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets på sedimentoverfladen, som indikerer, at ormene indtager sedimentet, registreres og tages i betragtning ved fortolkningen af testresultaterne med hensyn til eksponeringsveje.
29. Et syntetisk sediment baseret på den kunstige jord, der er beskrevet i testmetode C.8 (40), anbefales til brug i både test og laboratoriedyrkning af ormene (tillæg 5), da naturlige sedimenter af passende kvalitet måske ikke er tilgængelig hele året. Endvidere kan hjemmehørende organismer samt den mulige tilstedeværelse af mikroforurenere i naturlige sedimenter påvirke testen. Flere testarter kan overleve, vokse og formere sig i det kunstige sediment (8).
30. Det kunstige sediment bør som minimum karakteriseres ved bestanddelenes oprindelse, kornstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), organisk kulstofindhold (TOC), vandindhold og pH. Måling af redoxpotentiale er valgfri. Naturligt sediment fra uforurenede steder kan dog bruges som test- og/eller dyrkningssediment (1). Naturlige sedimenter karakteriseres ved mindst oprindelse (opsamlingssted), pH og ammoniak i porevandet, organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) samt vandindhold i procent (6). Såfremt der forventes ammoniakudvikling, bør det naturlige sediment inden tilsætning af teststoffet desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Ved udløbet af denne konditioneringsperiode, fjernes og kasseres det overliggende vand. En analyse af sedimentet eller dets bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger.

Fremstilling

31. Håndtering af naturlige sedimenter inden brug i laboratoriet er beskrevet i (1)(6)(44). Fremstilling af syntetisk sediment er beskrevet i tillæg 5.

Opbevaring

32. Opbevaringen af naturlige sedimenter i laboratoriet bør være så kort som mulig. U.S. EPA (6) anbefaler en opbevaringsperiode på højst 8 uger ved 4 ± 2 °C i mørke. Der må ikke være headspace over sedimentet i opbevaringsbeholderne. Tillæg 5 indeholder anbefalinger for opbevaring af syntetisk sediment.

Tilførsel af teststoffet

33. Testkemikalien tilsættes til sedimentet. Spiking-proceduren indebærer, at en eller flere af sedimentets bestanddele coates med teststoffet. F.eks. kan kvartssandet eller en del af det (f.eks. 10 g kvartssand pr. testbeholder) gennemvædes med en opløsning af teststoffet i et egnet opløsningsmiddel, som langsomt inddampes til tørhed. Den overfladebehandlede andel blandes derefter med det våde sediment. Den mængde sand, der findes i teststof- og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles, dvs. sedimentet skal således fremstilles med mindre sand (6).

34. Med et naturligt sediment kan teststoffet tilsættes ved spiking af en tørret del af sedimentet som beskrevet ovenfor for det kunstige sediment eller ved omrøring af teststoffet i det våde sediment med efterfølgende afdampning af eventuelt opløsningsmiddel. Egnede opløsningsmidler til spiking af vådt sediment er ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol (5)(34). Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af teststoffet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af en egnet opløselighedsfremmer. Supplerende vejledning om spiking-procedurer findes i Environment Canada (1995) (41). Det sikres, at det teststof, der tilsættes til sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Replikerede delprøver af det spikede sediment bør analyseres for at kontrollere koncentrationerne af teststoffet i sedimentet og bestemme homogenitetsgraden i testkemikaliet's fordeling.
35. Når det spikede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at teststoffet fordeler sig mellem sedimentet og den vandige fase. Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og stof og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger) (28)(42). I denne test afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer til syv dage anbefales. Afhængigt af forsøgets formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan det spikede sediment ækvilibreres eller ældes i længere tid (11).

UDFØRELSE AF TESTEN

Indledende test

36. 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 optagelses- og elimineringsfasen. Ormenes adfærd, f.eks. undgåelse af sediment, dvs. at ormene slipper ud af sedimentet, hvilket som kan skyldes teststoffet og/eller selve sedimentet, observeres og registreres under en indledende test. Undgåelse af sediment kan også bruges som en subletal parameter i en indledende test til at anslå, hvilke(n) koncentration(er) af testkemikallet der skal anvendes i en bioakkumuleringstest.

Eksponeringsbetingelser

Optagelsesfasens længde

37. Testorganismerne eksponeres for teststoffet i løbet af optagelsesfasen. Den første prøve tages 4-24 timer efter optagelsesfasens begyndelse. Optagelsesfasen bør vare op til 28 dage (1)(6)(11), medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Der opstår steady state, når: (i) en afbildning af bioakkumuleringsfaktorerne i hver prøvetagningsperiode mod tid er parallel med tidsaksen, (ii) tre successive analyser af BAF foretaget på prøver udtaget med intervaller på mindst to dage og højst varierer $\pm 20\%$ fra hinanden, og (iii) der ikke er væsentlige forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder (baseret på statistiske sammenligninger, f.eks. variansanalyse og regressionsanalyse). Hvis steady state ikke er opnået inden 28 dage, kan optagelsesfasen afsluttes ved at påbegynde elimineringsfasen, og BAF_K kan beregnes ud fra hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering (se også punkt 16-18).

Elimineringsfasens længde

38. Den første prøve udtages 4-24 timer efter starten af elimineringsfasen, da der i den første periode kan ske hurtige ændringer i vævsrester. Det anbefales at afslutte elimineringsfasen, enten når koncentrationen af teststoffet er under 10 % af steady-state-koncentrationen eller efter højst 10 dage. Restniveauet i ormene ved afslutningen af elimineringsfasen registreres som et supplerende endepunkt. Periodens længde kan f.eks. bestemmes af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i ormene er højere end detektionsgrænsen.

Testorganismer

Antal testorme

39. Antallet af orme pr. prøve skal give en ormevævsmasse, der sikrer, at massen af teststof pr. prøve i henholdsvis begyndelsen af optagelsesfasen og ved afslutningen af elimineringsfasen er væsentligt højere end detektionsgrænsen for teststoffet i biologisk materiale. På de nævnte trin i optagelses- og elimineringsfaserne er koncentrationen i testorganismerne normalt relativt lav (6)(8)(18). Eftersom den individuelle vægt hos mange arter af akvatiske oligochaeter er meget lav (5-10 mg vådvægt pr. individ for *Lumbriculus variegatus* og *Tubifex tubifex*), kan ormene i en given replikattestbeholder samles med henblik på vejning og analyse for testkemikalie. For testarter med højere individuel vægt (f.eks. *Branchiura sowerbyi*) kan der anvendes replikater, som indeholder et individ, men i disse tilfælde bør antallet af replikater øges til fem pr. prøvetagningssted (11). Det skal dog bemærkes, at *B. sowerbyi* ikke var med i ringtesten (12) og derfor ikke anbefales som en foretrukken art til metoden.
40. Orme af lignende størrelse bør anvendes (for *L. variegatus* se tillæg 6). De bør komme fra samme kilde og bør være voksne eller store dyr af samme aldersklasse (se tillæg 6). En organisms vægt og alder kan have en væsentlig virkning på BAF-værdierne (f.eks. på grund af forskelligt fedtindhold og/eller tilstedeværelse af æg). Disse parametre registreres nøjagtigt. For at måle middelvægten (våd og tør) vejes en delprøve af orme før påbegyndelse af testen.
41. Med *Tubifex tubifex* og *Lumbriculus variegatus*, forventes formering i testperioden. Manglende formering i en bioakkumulerings-test registreres og tages i betragtning ved fortolkning af testresultaterne.

Belastning

42. Høje forhold mellem sediment og orme og mellem vand og orme bør benyttes til at minimere reduktionen af teststoffets koncentration i sedimentet i optagelsesfasen og undgå fald i koncentrationen af opløst ilt. Den valgte belastningsgrad bør også svare til den valgte arts naturligt forekommende populationstæthed (43). F.eks. anbefales for *Tubifex tubifex* en belastningsgrad på 1-4 mg ormevæv (vådvægt) pr. gram vådt sediment (8)(11). I henhold til reference (1) og (6) anbefales en belastningsgrad på ≤ 1 g tørvægt ormevæv pr. 50 g organisk kulstof i sedimentet for *L. variegatus*.
43. De orme, der skal bruges i en test, fjernes fra kulturen ved at sigte dyrkningssedimentet. Dyrene (voksne eller store orme uden tegn på nylig fragmentering) flyttes til glasskåle (f.eks. petriskåle), som indeholder rent vand. Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne, bør en akklimatiseringsfase på 24 timer være tilstrækkelig. Inden vejning fjernes overskydende vand fra ormene. Dette kan ske ved forsigtigt at anbringe ormene på et stykke forhåndsfugtet filterpapir. Det kan ikke anbefales at bruge absorberende papir til at tørre ormene, da dette kan stresse eller skade dem. Brunson et al. (1998) anbefaler at anvende ikkeduppede orme på ca. 1,33 gange målbio Massen. Disse ekstra 33 % svarer til forskellen mellem duppede og ikkeduppede orme (28).
44. Ved starten af optagelsesfasen (testens dag 0) fjernes testorganismerne fra akklimatiseringsbeholderen og fordeles tilfældigt til beholdere (f.eks. petriskåle), der indeholder rekonstitueret vand, idet der tilsættes grupper på to orme til hver beholder, indtil hver beholder indeholder 10 orme. Hver af disse grupper af orme overføres herefter tilfældigt til separate testbeholdere, f.eks. ved hjælp af en blød ståltang. Testbeholderne inkuberes efterfølgende under testbetingelser.

Fodring

45. I lyset af det kunstige sediments lave næringsstofindhold bør sedimentet justeres med en fødekilde. For ikke at undervurdere eksponeringen af testorganismerne, f.eks. ved selektivt at fodre med ikkeforurenede føde, bør den føde, som er nødvendig for testorganismernes formering og vækst, tilsættes til sedimentet en gang før eller under tilsætningen af testkemikaliet (se tillæg 5).

Sediment-vandforhold

46. Det anbefalede sediment-vandforhold er 1:4 (45). Dette forhold anses for egnet til at opretholde iltkoncentrationerne på passende niveauer og undgå opbygningen af ammoniak i det overliggende vand. Iltindholdet i det overliggende vand bør fastholdes på en mætning på ≥ 40 %. Det overliggende vand i testbeholderne beluftes forsigtigt (f.eks. 2-4 bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt ca. 2 cm over sediment-overfladen med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet.

Lys og temperatur

47. Lysperioden i kulturen og testen er 16 timer. Lysintensiteten i testområder holdes på omkring 500-1 000 lx. Temperaturen bør være 20 ± 2 °C i hele testen.

Testkoncentrationer

48. En testkoncentration (så lav som muligt) bruges til at bestemme optagelseskinetikken, men der kan bruges en anden (højere) koncentration (f.eks. (46)). I så fald udtages og analyseres der prøver ved steady state eller efter 28 dage for at bekræfte den BAF-værdi, som blev målt ved den lavere koncentration (11). Den højere koncentration vælges, så negative virkninger kan udelukkes (f.eks. ved at vælge ca. 1 % af den lavest kendte koncentration med kronisk virkning EC_x som afledt af relevante kroniske toksicitetsforsøg). Den laveste testkoncentration bør være betydeligt højere end detektionsgrænsen i sediment og biologiske prøver ved den anvendte analysemetode. Hvis teststoffets effektkoncentration ligger tæt på detektionsgrænsen, anbefales det at bruge et radioaktivt mærket teststof med høj specifik radioaktivitet.

Behandlings- og kontrolreplikater

49. Der bør som minimum være tre behandlingsreplikater til kinetiske målinger pr. prøvetagningssted (11) i hele optagelses- og elimineringsfasen. Supplerende replikater bruges f.eks. til valgfrie supplerende prøvetagningsdatoer. Til elimineringsfasen klargøres et tilsvarende antal replikater med ikke-spiKET sediment og overliggende vand, så de behandlede orme ved afslutningen af optagelsesfasen kan overføres fra de pågældende behandlingsbeholdere til beholdere uden behandling. Det samlede antal behandlingsreplikater bør være tilstrækkeligt til både optagelses- og elimineringsfasen.
50. Alternativt kan orme, der er valgt til prøvetagning i elimineringsfasen, eksponeres i en stor beholder med spiket sediment fra samme parti som det, der blev brugt til optagelseskinetik. Det påvises, at testbetingelserne (f.eks. sedimentdybde, sediment-vandforhold, belastning, temperatur, vandkvalitet) kan sammenlignes med de replikater, som er valgt til optagelsesfasen. Ved afslutningen af optagelsesfasen udtages vand-, sediment- og ormeprøver fra denne beholder til analyse, og et tilstrækkeligt antal store orme, som ikke viser tegn på nylig fragmentering, fjernes forsigtigt og overføres til de replikater, der er klargjort til elimineringsfasen (f.eks. 10 organismer pr. replikatbeholder).
51. Hvis der ikke anvendes andet opløsningsmiddel end vand, skal der sikres mindst ni replikater af en negativ kontrol (mindst tre udtaget ved start, tre ved afslutning af optagelsen og tre ved afslutning af elimineringen) til biologisk analyse og baggrundsanalyse. Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer ved tilsætning af teststoffet, foretages der en kontrol med opløsningsmiddel (mindst tre replikater udtages ved start, tre ved afslutning af optagelsesfasen og tre ved afslutning af elimineringsfasen). I så fald sikres mindst fire replikater af en negativ kontrol (uden opløsningsmiddel) til prøveudtagning ved afslutning af optagelsesfasen. Disse replikater kan sammenlignes biologisk med opløsningsmiddelkontrollen for at få oplysninger om opløsningsmidlets mulige indvirkning på testorganismerne. Tillæg 3 indeholder nærmere oplysninger.

Hyppeghed af målinger af vandkvaliteten

52. Som minimum måles følgende vandkvalitetsparametre i det overliggende vand i optagelses- og elimineringsfasen:

Temperatur	i en beholder på hvert behandlingsniveau pr. prøvetagningsdato og i en kontrolbeholder en gang om ugen og ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden. Temperaturen i det omgivende medium (omgivende luft eller vandbad) eller i en repræsentativ testbeholder kan også registreres f.eks. kontinuerligt eller en gang i timen
Indhold af opløst ilt	i en beholder på hvert behandlingsniveau og i en kontrolbeholder pr. prøvetagningsdato udtrykt i mg/l og % ASV (luftmætningsværdi)
Luftforsyning	kontrolleres mindst en gang om dagen (hverdag) og justeres eventuelt
pH	i en behandlingsbeholder for hvert behandlingsniveau pr. prøvetagningsdato og i en kontrolbeholder en gang om ugen og ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden
Vandets samlede hårdhed	i mindst en behandlingsbeholder og en kontroltestbeholder ved begyndelsen og afslutningen af optagelses og elimineringsperioden udtrykt i mg/l CaCO_3
Samlet ammoniakindhold	i mindst en behandlingsbeholder og en kontroltestbeholder ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden udtrykt i mg/l NH_4^+ eller NH_3 eller samlet ammoniak-N.

Prøveudtagning og analyse af orme, sediment og vand*Prøvetagningsplan*

53. Eksempler på prøvetagningsplaner for en 28-dages optagelsesfase og en 10-dages elimineringsfase findes i tillæg 3.
54. Der udtages prøver af vand og sediment fra testbeholderne med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både inden ormene tilsættes og under optagelses- og elimineringsfasen. Under testen bestemmes koncentrationerne af teststof i orme, sediment og vand for at overvåge fordelingen af teststoffet i testsystemets delmiljøer.
55. Udtag prøver af orme, sediment og vand mindst seks gange i optagelses- og elimineringsfasen.
56. Fortsæt prøvetagningen, indtil der er fastslået et plateau (steady state) (se tillæg 1) eller i 28 dage. Er plateauet ikke nået inden for 28 dage, påbegyndes elimineringsfasen. Ved påbegyndelse af elimineringsfasen overføres de udvalgte orme til replikatbeholderne, der indeholder ubehandlet sediment og vand (se også punkt 17-18).

Udtagning og klargøring af prøver

57. Udtag vandprøver ved at dekantere, suge eller pipettere et tilstrækkeligt volumen til at måle mængden af teststoffet i prøven.
58. Det resterende overliggende vand dekanteres eller suges omhyggeligt fra testbeholderen/-beholderne. Sedimentprøver udtages forsigtigt, så der forårsages minimal forstyrrelse af ormene.
59. Fjern alle orme fra testreplikaten på prøvetagningstidspunktet, f.eks. ved at suspendere sedimentet med overliggende vand og sprede indholdet af hvert replikat på en lav bakke og udtage ormene ved hjælp af en blød ståltang. Skyl dem hurtigt med vand i et lavt glas eller en stålbakke. Fjern overskydende vand. Overfør forsigtigt ormene til en på forhånd vejlet beholder, og vej dem. Aflev ormene ved frysning (f.eks. $\leq -18^\circ\text{C}$). Tilstedeværelsen og antallet af kokoner og/eller afkom registreres.

60. Generelt skal ormene vejes og aflives umiddelbart efter prøvetagningen uden en tarmtømningsfase, så der kan fås et konservativt BAF, der omfatter forurenede tarmindehold, og for at undgå tab af restkoncentrationer i kroppen under en eventuel tarmtømningsperiode kun i vand (8). Kemikalier med $\log K_{ow}$ over 5 forventes ikke at blive elimineret væsentligt i en eventuel tarmtømningsperiode kun i vand, mens kemikalier med $\log K_{ow}$ under 4 kan gå tabt i betydelige mængder (47).
61. I elimineringsfasen tømmer ormene deres tarm i rent sediment. Dette betyder, at målinger umiddelbart før elimineringsfasen omfatter forurenede tarmsediment, mens størstedelen af det forurenede tarmindehold efter de første 4-24 timer af elimineringsfasen antages at blive udskiftet med rent sediment (11)(47). Koncentrationen i ormene i denne prøve kan herefter betragtes som vævskoncentrationen efter tarmtømning. For at tage højde for det uforurenede sediments fortynding af teststofkoncentrationen i løbet af elimineringsfasen kan vægten af tarmindeholdet estimeres ud fra forholdet mellem ormenes vådvægt/ormenes askevægt eller ormenes tørvægt/ormenes askevægt.
62. Hvis formålet med et bestemt forsøg er at måle biotilgængeligheden og de sande restkoncentrationer i testorganismernes væv, bør mindst en delprøve af behandlede organismer (f.eks. fra tre supplerende replikatbeholdere) herefter udtages under steady state, vejes, udtømmes i rent vand i en periode på seks timer (47) og vejes igen før analyse. Data om ormevægt og kropskoncentration fra denne delprøve kan efterfølgende sammenlignes med værdier opnået fra ikkeudtømte orm. De orme, som er udvalgt til måling af eliminering, udtømmes ikke, før de overføres til rent sediment, for at minimere den ekstra stress for dyrene.
63. Vand-, sediment- og ormeprøver skal helst analyseres straks (dvs. inden for 1-2 dage) efter fjernelse, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og elimineringshastigheder. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau er nået.
64. Foretages analyserne ikke med det samme, bør prøverne opbevares hensigtsmæssigt. Der skal indhentes oplysninger om stabilitet og passende opbevaringsbetingelser for det specifikke teststof (f.eks. opbevaringstid og -temperatur, ekstraktionsfremgangsmåder osv.), inden forsøget indledes. Hvis disse oplysninger ikke foreligger, og det anses for nødvendigt, kan spikede kontrolvæv testes samtidig for at bestemme opbevaringsstabiliteten.

Analysemetodens kvalitet

65. 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-, sediment- og ormeprøver for den valgte metode. Det kontrolleres tillige, at testkemikallet ikke kan påvises i kontrolkamrene i koncentrationer, som ligger over baggrundsniveauet. Om nødvendigt korrigeres C_w -, C_s - og C_a -værdierne for genfindning og baggrundsværdier i kontrollerne. Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at forurening og tab minimeres (f.eks. som følge af adsorption af teststoffet til prøvetagningsudstyret).
66. Den samlede genfindning og genfindingen af teststoffet i orme, sediment, vand og — hvis de anvendes — i udskillere med absorbenter, som kan tilbageholde fordampet teststof, registreres og rapporteres.
67. Eftersom det anbefales at avende radioaktivt mærkede stoffer, er det muligt at analysere for samlet radioaktivitet (dvs. oprindelige produkter og nedbrydningsprodukter). Hvis analysen kan gennemføres, kan en kvantitativ bestemmelse af det oprindelige stof og nedbrydningsprodukter ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen give vigtige oplysninger. Hvis det påtænkes at foretage disse målinger, underkastes prøverne passende ekstraktionsprocedurer, således at der kan foretages en kvantitativ bestemmelse af det oprindelige stof separat. Udgør et påvist nedbrydningsprodukt en signifikant procentdel (f.eks. > 10 %) af den radioaktivitet, der er målt i testorganismene ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen, anbefales det at identificere de pågældende nedbrydningsprodukter (5).

68. På grund af lav individuel biomasse er det ofte ikke muligt at bestemme teststoffets koncentration i hver enkelt orm, medmindre der anvendes *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg vådvægt pr. orm) som testart (11). Derfor er det acceptabelt at samle individer udtaget fra en given testbeholder, selvom det begrænser de statistiske procedurer, der kan anvendes på dataene. Hvis en bestemt statistisk metode og styrke er vigtige hensyn, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange testorganismer og/eller replikattestkamre til, at den ønskede pooling, procedure og styrke tilgodeses (6) (7).
69. Det anbefales, at BAF udtrykkes både som en funktion af den samlede vådvægt, samlede tørvægt og, når det er nødvendigt (f.eks. for stærkt lipofile stoffer), som en funktion af sedimentets fedtindhold og TOC. Fedtindholdet bestemmes ved hjælp af egnede metoder (48)(49). Som standardmetode kan ekstraktion (50) med chloroform/methanol anbefales (48). For at undgå brugen af chlorerede opløsningsmidler kan der anvendes en ringtestet tilpasning af Bligh og Dyer-metoden (50) som beskrevet i (51). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier (48), er det vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet. Når det er muligt, dvs. når tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, skal fedtindholdet måles på samme prøve eller ekstrakt som det, der blev udtaget til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved kromatografi (5). Det er dog praktisk i det mindste i starten eller — fortrinsvis — ved afslutningen af optagelsesfasen at bruge akklimatiserede kontroldyr til at måle fedtindholdet, f.eks. i tre prøver.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

70. Teststoffets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i teststoffet i/på ormene under optagelsesfasen mod tiden (lineære akser). Hvis kurven har nået et plateau, beregnes steady state BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ ved steady state eller på dag 28 (middel)}}{C_s \text{ ved steady state eller på dag 28 (middel)}}$$

71. Bestem den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAFK) som forholdet k_s/k_e . Elimineringskonstanten (k_e) bestemmes normalt ud fra elimineringskurven (dvs. en afbildning af koncentrationen af teststoffet i ormene i løbet af elimineringsfasen). Hastighedskonstanten for optagelse, k_s , beregnes herefter ud fra optagelseskurvens kinetik. Til at finde BAFK og hastighedskonstanterne, k_s og k_e , foretrækkes computerbaserede ikkelineære parameterestimeringsmetoder (tillæg 2). Hvis det er åbenlyst, at elimineringen ikke er af første orden, anvendes andre modeller (25)(27)(52).
72. Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF) bestemmes ved normalisering af BAFK for ormenes fedtindhold og sedimentets totale organiske kulstofindhold.

Fortolkning af resultater

73. Hvis der i testkoncentrationer måles koncentrationer nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed.
74. Skarpe optagelses- og elimineringskurver er tegn på bioakkumuleringsdata af høj kvalitet. Normalt bør konfidensgrænserne for BAF-værdier fra veltilrettelagte forsøg ikke overstige 25 % (5).

Testrapport

75. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger.

Teststof

- fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. log K_{ow} , vandopløselighed
- kemiske identifikationsdata, kilden til teststoffet, eventuelt anvendt opløsningsmiddels identitet og koncentration
- hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position, den specifikke radioaktivitet og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder.

Testarter

- videnskabeligt navn, stamme, herkomst, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse osv.

Testbetingelser:

- anvendt testprocedure (f.eks. statistisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)
- belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed
- testdesign (f.eks. antal testkamre, materiale og størrelse, vandvolumen, sedimentmasse og -volumen, vandudskiftningsrate (for gennemstrømningsprocedurer eller semistatiske procedurer), eventuel beluftning før og under testen, antal replikater, antal orme pr. replikat, antal testkoncentrationer, optagelses- og elimineringsfasernes varighed, udtagningshyppighed)
- metode til klargøring og applikation af testkemikalie samt begrundelse for valg af specifik metode
- nominelle testkoncentrationer
- kilde til bestanddelene i det kunstige vand og sediment eller — hvis der anvendes naturlige medier — vandets og sedimentets oprindelse, beskrivelse af eventuel forbehandling, resultater af eventuel påvisning af testorganismernes evne til at leve og/eller formere sig i de anvendte medier, sedimentets karakteristika (porevandets pH og ammoniak (naturlige sediment), organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), procent vandindhold og eventuelt andre målinger) og vandets karakteristika (pH, hårdhed, ledningsevne, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt) og eventuelt andre målinger)
- den nominelle og målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) af det kunstige sediment, den målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) for marksedimenter
- vandkvaliteten i testkamrene karakteriseres med temperatur, pH, ammoniak, samlet hårdhed og koncentration af opløst ilt
- detaljerede oplysninger om, hvordan vand-, sediment- og ormeprøver er behandlet, herunder fremstilling, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststoffet og fedtindhold samt genfindning af teststoffet.

Resultater

- dødelighed for kontrolorme og ormene i hvert testkammer og eventuelt observerede subletale effekter, bl.a. unormal adfærd (f.eks. undgåelse af sediment, tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets, manglende formering)
- den målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) for sedimentet og testorganismerne (nyttig til normalisering)
- ormenes fedtindhold
- kurver, der viser optagelses- og elimineringskinetikken for teststoffet i ormene samt tiden til steady state
- C_a , C_s og C_w (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) på alle prøvetagningstidspunkter (C_a udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af legemsvægt, C_s udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af sediment og C_w i mg l^{-1}). Hvis der kræves en biota-sedimentakkumuleringsfaktor (BSAF, se definition i tillæg 1) (f.eks. til sammenligning af resultaterne fra to eller flere test udført med dyr med forskelligt fedtindhold), kan C_a også udtrykkes som g kg^{-1} fedtindhold i organismen og C_s kan udtrykkes som g kg^{-1} organisk kulstof (OC) i sedimentet

- BAF (udtrykt i $\text{kg vådt sediment kg}^{-1}$ våd orm), hastighedskonstant for optagelse fra sediment k_s (udtrykt i $\text{g vådt sediment kg}^{-1}$ af våde orme d^{-1}) og hastighedskonstant for eliminering k_e (udtrykt i d^{-1}), BSAF (udtrykt i $\text{kg sediment OC kg}^{-1}$ fedtindhold i orm) kan også registreres
- ikkeeliminerede restkoncentrationer (NER) ved afslutningen af elimineringsfasen
- hvis det måles: procentdele af det oprindelige teststof, nedbrydningsprodukter og bundne restkoncentrationer (dvs. den procentdel af teststoffet, som ikke kan ekstraheres med almindelige ekstraktionsmetoder), der er påvist i testorganismerne
- metoder, som er anvendt til statistiske dataanalyser.

Vurdering af resultater

- resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i punkt 21
 - uventede eller usædvanlige resultater, f.eks. ufuldstændig eliminering af teststoffet fra testorganismerne, i sådanne tilfælde kan resultater af et eventuelt foreløbigt forsøg give nyttige oplysninger.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER OG ENHEDER

Syntetisk sediment eller formuleret, rekonstitueret eller kunstigt sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Bioakkumulering: en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium. Bioakkumulering er resultatet af både biokoncentrerings- og biomagnifikationsprocesser (se nedenfor).

Bioakkumuleringsfaktoren (BAF) på ethvert tidspunkt i denne bioakkumuleringstests optagelsesfase: koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen (C_a i g kg^{-1} våd- eller tørvægt) divideret med koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium (C_s som g kg^{-1} våd- eller tørvægt sediment). For at betegne C_a - og C_s -enhederne har BAF enhederne $\text{kg sediment kg}^{-1}$ orme (15).

Bioakkumuleringsfaktorer: beregnet direkte ud fra forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra sediment divideret med hastighedskonstanten for eliminering (henholdsvis k_s og k_e , — se nedenfor) betegnes kinetiske bioakkumuleringsfaktorer (BAFK).

Biokoncentration: forøgelse af teststoffets koncentration i eller på en organisme udelukkende som følge af optagelse gennem kroppens overflade i forhold til teststoffets koncentration i det omgivende medium.

Biomagnifikation: en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme primært som følge af optagelsen af forurenede foder eller bytte i forhold til koncentrationen af teststoffet i foder eller bytte. Biomagnifikation kan medføre overførsel eller akkumulering af teststoffet i fødekæder.

Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF): den fedtindholdsnormaliserede steady state-koncentration af teststoffet i eller på testorganismen divideret med den organisk kulstofnormaliserede koncentration af teststoffet i sedimentet ved steady state. C_a udtrykkes da som g kg^{-1} fedtindhold i organismen, og C_s som g kg^{-1} organisk indhold i sedimentet.

Konditioneringsperiode: bruges til at stabilisere den mikrobielle bestanddel af sedimentet og fjerne f.eks. ammoniak fra sedimentets bestanddele; den finder sted, inden teststoffet tilsættes til sedimentet. Normalt kasseres det overliggende vand efter konditionering.

Eliminering af teststof: tabet af stoffet fra testorganismens væv ved aktive eller passive processer, der forekommer uafhængigt af tilstedeværelsen eller fraværet af teststoffet i det omgivende medium.

Elimineringsfase: tidsrummet efter overførsel af testorganismerne fra et forurenede medium til et medium uden teststoffet, hvor elimineringen (eller nettotabet) af stoffet fra testorganismerne undersøges.

Hastighedskonstanten for eliminering (k_e): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den reduktion af koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen, efter at testorganismerne er overført fra et medium med teststoffet til et medium uden dette stof; k_e udtrykkes i d^{-1} .

Ækvilibreringsperiode: skal give mulighed for fordeling af teststoffet mellem den faste fase, porevandet og det overliggende vand; den finder sted efter tilsætning af teststoffet til sedimentet og inden tilsætning af testorganismerne.

Octanol/vand-fordelingskoefficient (K_{ow}): forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt, også betegnet P_{ow} . Logaritmen K_{ow} ($\log K_{ow}$) benyttes som rettesnor for et stofs potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

Organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient (K_{oc}): forholdet mellem et stofs koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i sediment og stoffets koncentration i vand ved ligevægt.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Plateau eller **steady state**: ligevægten mellem de optagelses- og elimineringsprocesser, der forekommer samtidig i løbet af eksponeringsfasen. Man taler om steady state i afbildningen af BAF i hver prøvetagningsperiode i forhold til tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af BAF i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen statistisk signifikante forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder. For testkemikalier, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende (5).

Porevand eller interstitielt vand: det vand, der optager pladsen mellem sediment- eller jordpartikler.

Hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den forøgelse af koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen, der følger af fasen for optagelse fra sediment. k_s udtrykkes i g sediment kg^{-1} orme d^{-1} .

Spiket sediment eller forurennet sediment: sediment, som testkemikallet er tilsat.

Steady state-bioakkumuleringsfaktor (BAF_{ss}): BAF ved steady state, som ikke ændres signifikant over en længere periode, idet koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium (C_s som g kg^{-1} våd- eller tørvægt sediment) er konstant i denne tidsperiode.

Optagelses- eller eksponeringsfase: det tidsrum, hvori testorganismerne eksponeres for testkemikallet.

Tillæg 2

Beregning af parametre for optagelse og eliminering

Den primære endepunkt i en bioakkumuleringstest er bioakkumuleringsfaktoren, BAF. Den målte BAF kan beregnes ved at dividere koncentrationen af teststoffet i testorganismen, C_a , med koncentrationen af teststoffet i sedimentet, C_s , ved steady state. Hvis steady state ikke nås i optagelsesfasen, beregnes BAF på samme måde for dag 28. Det skal angives, om BAF er baseret på steady state-koncentrationer.

De foretrukne midler til at finde den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_k), hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e) er at benytte computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder. På baggrund af tidsserierne for gennemsnitlige akkumuleringsfaktorer (C_a , middelværdier for hver prøvetagningsdato/ C_s , middelværdier for hver prøvetagningsdato = AF) i optagelsesfasen baseret på vådvægt af orme og sediment og modelligningen

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad [\text{ligning 1}]$$

hvor $AF(t)$ er forholdet mellem koncentrationen af teststoffet i orme og dets koncentration i sedimentet på et givet tidspunkt (t) i optagelsesfasen, beregner disse computerprogrammer værdierne for BAF_k , k_s og k_e .

Når steady state nås i løbet af optagelsesfasen (dvs. $t = \infty$), kan ligning 1 reduceres til:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{ligning 2}]$$

hvor

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [$\text{g sediment kg}^{-1}$ orme d^{-1}]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d^{-1}]

I så fald er $k_s/k_e \times C_s$ en tilgang til koncentrationen af teststoffet i ormevæv ved steady state ($C_{a,ss}$).

Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF) beregnes på følgende måde:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

hvor f_{oc} er andelen af organisk kulstof i sediment, og f_{lip} er andelen af fedtstof i orm, begge baseret på enten tørvægt eller vådvægt.

På baggrund af en tidsserie af koncentrationsværdier kan elimineringskinetikken modelleres ved hjælp af følgende modelligninger og en computerbaseret ikke-lineær parameterestimeringsmetode.

Middelværdien af den målte restkoncentration i kroppen ved afslutningen af optagelsesfasen anbefales som standard-udgangspunkt. Værdien, der er modelleret/estimeret fra optagelsesfasen, benyttes kun, f.eks. hvis den målte værdi afviger signifikant fra den modellerede restkoncentration i kroppen. Se også punkt 50 om alternativ præeksponering af orme udvalgt til eliminering. Med denne tilgang menes prøver af disse præeksponerede orme på elimineringsfasens dag 0 at give en realistisk restkoncentration i kroppen, med hvilken elimineringskinetikken kan påbegyndes.

Hvis de datapunkter, der er afsat i forhold til tid, indikerer et konstant eksponentielt fald i koncentrationen af teststoffet i testorganismerne, kan en etrumsmodel (ligning 4) bruges til at beskrive tidsforløbet for eliminering.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ligning 3}]$$

Elimineringsprocesser ser undertiden ud til at være tofasede og udvise et hurtigt fald i C_a i begyndelsen, som ændres til et langsommere tab af teststoffer i slutningen af elimineringsfasen (8)(19)(25)). De to faser kan fortolkes ud fra den antagelse, at der er to forskellige rum i den organisme, hvorfra teststof går tabt med forskellig hastighed. I sådanne tilfælde henvises til specifik litteratur (15) (16) (17) (25).

En torumseliminering beskrives f.eks. i følgende ligning (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{ligning 4}]$$

A og B repræsenterer rummenes størrelse (i procent af den samlede restkoncentration i vævet), hvor A er rummet med hurtigt tab af stof, og B er rummet med langsomt tab af teststof. Summen af A og B giver 100 % af hele dyrets rumvolumen ved steady state. k_a og k_b repræsenterer de tilsvarende elimineringskonstanter [d^{-1}]. Hvis torumsmodellen tilpasses udskilningsdataene, kan hastighedskonstanten for optagelse k_s bestemmes som følger (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [\text{ligning 5}]$$

Disse modelligninger bør dog bruges med forsigtighed, især når der opstår ændringer i teststoffets biotilgængelighed under testen (42).

Som alternativ til modelligningerne ovenfor kan kinetikken (k_s and k_e) også beregnes i et trin ved at anvende modellen for førsteordenskinetik på alle data fra både optagelses- og elimineringsfasen samtidig. En beskrivelse af en metode, der understøtter en sådan kombineret beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering, findes i (55) (56) og (57).

De ikkeeliminerede restkoncentrationer (NER) beregnes som et sekundært endepunkt ved at gange forholdet mellem den gennemsnitlige koncentration i ormene (C_a) på dag 10 i elimineringsfasen og den gennemsnitlige koncentration i ormene (C_a) ved steady state (dag 28 i optagelsesfasen) med 100:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ ved udløbet af eliminering (gns.)} \times 100}{C_a \text{ ved steady state (gns.)}}$$

Tillæg 3

Eksempel på en prøvetagningsplan for en 28-dages bioakkumuleringsfase**a) Optagelsesfase (bl.a. en 4-dages ækvilibreringsfase)**

Dag	Aktiviteter
– 6	Fremstilling af tørvesuspension til sediment, konditionering af suspensionen i 48 timer
– 4	Spiking af sediment eller sedimentandel, blanding af alle bestanddele i sedimentet, fjernelse af sedimentprøver af behandlet sediment og kontrold sediment med opløsningsmiddel til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilsætning af overliggende vand, inkubation på testbetingelser (ækvilibreringsfase)
– 3/–2	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering
0	Måling af vandkvalitet (se punkt 52), fjernelse af replikater til udtagning af prøver af vand og sediment til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilfældig fordeling af orme til testkamrene, tilbageholdelse af et tilstrækkeligt antal delprøver af orme til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, kontrol af luftforsyning, hvis der anvendes et lukket testsystem
1	Fjernelse af replikater til prøveudtagning, kontrol af luftforsyning, ormenes adfærd, vandkvalitet (se punkt 56), udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration
2	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes adfærd og temperatur.
3	Samme som dag 1.
4 - 6	Samme som dag 2.
7	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
8-13	Samme som dag 2.
14	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
15-20	Samme som dag 2.
21	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
22-27	Samme som dag 2.
28	Samme som dag 1, måling af vandkvalitet (se punkt 52), afslutning af optagelsesfase, tilbageholdelse af et tilstrækkeligt antal delprøver af orme til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt samt fedtindhold, overførsel af orme fra resterende eksponerede replikater til beholdere med rent sediment til elimineringsfasen (ingen tarmtømning), prøvetagning af vand, sediment og orme fra opløsningsmiddelkontroller, eventuelt prøvetagning af opsamlingsvæsker.
	Præeksponeringsaktiviteter (ækvilibreringsfase) bør planlægges under hensyntagen til teststoffets egenskaber. Hvis det er nødvendigt, konditioneres det fremstillede sediment under overliggende vand ved 20 ± 2 °C i 7 dage. I så fald fremstilles sedimentet tidligere!
	Aktiviteter beskrevet for dag 2 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

b) **Elimineringsfase**

Dag	Aktiviteter
– 6	Fremstilling af tørvesuspension til sediment, konditionering af suspensionen i 48 timer
– 4	Blanding af alle bestanddele i sedimentet, fjernelse af sedimentprøver af behandlet sediment og kontrolsediment med opløsningsmiddel til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilsætning af overliggende vand, inkubation på testbetingelser.
0 (dag 28 af optagelsesfasen).	Måling af vandkvalitet (se punkt 52), overførsel af orme fra resterende eksponerede replikater til beholdere med rent sediment, efter 4-6 timer fjernelse af replikater til udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilfældig fordeling af orme til testkamrene
1	Fjernelse af replikater til prøveudtagning, kontrol af luftforsyning, ormenes adfærd, vandkvalitet (se punkt 52), udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration
2	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes adfærd og temperatur.
3	Samme som dag 1.
4	Samme som dag 2.
5	Samme som dag 1.
6	Samme som dag 2.
7	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
8-9	Samme som dag 2.
10	Samme som dag 1, afslutning af elimineringsfasen, måling af vandkvalitet (se punkt 52), prøvetagning af vand, sediment og orme fra opløsningsmiddelkontroller, eventuelt prøvetagning af opsamlingsvæsker.
	Fremstilling af sediment inden starten på elimineringsfasen på samme måde som inden optagelsesfasen.
	Aktiviteter beskrevet for dag 2 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

Tillæg 4

Nogle fysisk-kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

BESTANDDEL	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 µg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

SAMMENSÆTNING AF DET ANBEFALEDE REKONSTITUERERDE VAND

a) Calciumchloridopløsning

Opløs 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

b) Magnesiumsulfatopløsning

Opløs 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

c) Natriumhydrogencarbonatopløsning

Opløs 2,59 g NaHCO_3 i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

d) Kaliumchloridopløsning

Opløs 0,23 g KCl i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Det destillerede eller deioniserede vands ledningsevne må ikke overstige $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

25 ml af hver af opløsningerne a)-d) blandes, og der fortyndes til et samlet volumen på 1 l med deioniseret vand. Summen af calcium- og magnesiumioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l.

Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1, og forholdet mellem Na- og K-ioner 10:1. Syrekapaciteten $K_{s4,3}$ i denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Fortyndingsvandet beluftes, indtil der er opnået iltmætning, og opbevares i ca. to dage uden yderligere beluftning inden brug.

pH af acceptabelt vand til fortynding bør ligge i området 6-9.

Tillæg 5

Syntetisk sediment — anbefalinger til fremstilling og oplagring

I modsætning til kravene i testmetode C.8 (40) anbefales det, at tørveindholdet af det kunstige sediment er 2 % i stedet for 10 % af tørvægten, så det svarer til et lavt til moderat organisk indhold af naturlige sedimenter (58).

Procentdel tørre bestanddele i det kunstige sediment:

Bestanddel	Egenskaber	% tørt sediment
Tørv	Sphagnum — nedbrydningsgrad: »middel« — uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm) og lufttørret	$2 \pm 0,5$
Kvartssand	Kornstørrelse: ≤ 2 mm, men 50 % af partiklerne skal være 50-200 μm	76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	22 ± 1
Fødekilde	<i>Folia urticae</i> , pulveriserede blade af <i>Urtica</i> sp. (brændenælde), findelt (partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm) eller en blanding af pulveriserede blade af <i>Urtica</i> sp. med α -cellulose (1: 1), i overensstemmelse med farmaceutiske standarder til konsum, ud over tørt sediment	0,4-0,5 %
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulveriseret, kemisk rent, ud over tørt sediment	0,05-1
Deioniseret vand	Ledningsevne $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, ud over tørt sediment	30-50

Hvis der forventes høje ammoniakkoncentrationer, f.eks. hvis testkemikaliet har vist sig at hæmme nitrifikation, kan det være hensigtsmæssigt at erstatte 50 % af det kvælstofrige urtica-pulver med cellulose (f.eks. α -Cellulose-pulver, kemisk rent, partikelstørrelse $\leq 0,5$ mm.).

Forberedelse

Tørven lufttørres og males til et fint pulver (kornstørrelse $\leq 0,5$ mm, ingen synlige planterester). Der fremstilles en suspension af den krævede mængde tørvpulver ved hjælp af en portion deioniseret vand, som skal tilsættes til det tørre sediment (et vandvolumen på $11,5 \times$ tørvægten af tørven har vist sig egnet til at producere en tørveslam (8), der kan røres) ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat.

pH-værdien af denne suspension justeres til $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH-værdien og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH-værdien måles igen og justeres om nødvendigt til $6,0 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Herefter blandes hele suspensionen med de øvrige tørre bestanddele under hensyntagen til en eventuel portion til spiking. Det resterende deioniserede vand tilsættes for at få et homogent sediment. pH-værdien måles igen og justeres om nødvendigt til $6,5-7,5$ med CaCO_3 . Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det dog være hensigtsmæssigt at holde sedimentets pH under 7,0 (f.eks. 6,0-6,5). Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Såfremt der forventes ammoniakudvikling, kan det kunstige sediment desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test (f.eks. sediment-vandforhold 1:4, højde på sedimentlag som i testbeholderne), inden tilsætning af testkemikaliet, dvs. at det overhældes med vand, som beluftes. Ved udløbet af konditioneringsperioden, fjernes og kasseres det overliggende vand. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det samlede organiske kulstofindhold (f.eks. tre prøver).

Derefter blandes det forurenede kvartssand med sedimentet for hvert behandlingsniveau, sedimentet fordeles i replikattestbeholderne og overhældes med testvandet (f.eks. sediment-vandforhold 1:4, højde på sedimentlag som i testbeholderne). Derefter inkuberes beholderne under samme betingelser som i den efterfølgende test. Det er på dette tidspunkt, at ækvilibreringsperioden indledes. Det overliggende vand beluftes.

Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Det kan først blandes med tørvesuspensionen (se ovenfor). For omfattende nedbrydning af fødekilden inden tilsætningen af testorganismerne — f.eks. ved en lang ækvilibreringsperiode — kan dog undgås ved at sørge for, at tidsrummet mellem tilsætningen af foder og begyndelsen af eksponeringsperioden er så kort som muligt. For at sikre, at foderet er i tilstrækkelig kontakt med testkemikaliet, blandes fødekilden senest med sedimentet på den dag, hvor testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Der kan gøres undtagelser, hvis ækvilibreringsperiodens længde fører til for stor mikrobiel nedbrydning af foderet, før testorganismerne tilsættes. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det samlede organiske kulstofindhold (f.eks. tre prøver af forurenet sediment eller kontrolediment).

Tørvægten af bestanddelene (tørv, sand, kaolin) registreres i g og i procent af den samlede tørvægt.

Den mængde vand, der skal tilsættes til de tørre bestanddele under fremstillingen af sedimentet, registreres også i procent af samlet tørvægt (f.eks. betyder 100 % tørvægt + 46 % vand, at 1 000 g tørvægt får i alt 460 ml vand, hvilket giver 1 460 g vådt sediment).

Opbevaring

De tørre bestanddele i det kunstige sediment opbevares tørt og køligt ved stuetemperatur. Det klargjorte våde sediment kan opbevares (kun til senere brug i dyrkningen) ved 4 ± 2 °C i mørke i en periode på 2-4 uger fra fremstillingsdagen (8).

Sediment, der er tilsat teststoffet, anvendes straks, medmindre der foreligger oplysninger om, at det pågældende sediment kan opbevares, uden at det påvirker testkemikaliets toksicitet og biotilgængelighed. Prøver på spiket sediment kan opbevares under de betingelser, der anbefales for det pågældende teststof indtil analyse.

Tillæg 6

Oligochaetararter, der anbefales til bioakkumuleringsbænk***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

De tubificide oligochaeter (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) lever i ferskvandssedimenter i rør, som er foret med slim. I disse rør ligger ormen med hovedet nedad og indtager sedimentpartikler og udnytter de dertil knyttede mikroorganismer og organiske affald. Bagenden ligger normalt og bølger i det overliggende vand af hensyn til vejtrækningen. Selv om denne art lever i en lang række sedimenttyper over hele den nordlige halvkugle, foretrækker *tubifex tubifex* relativt fine kornstørrelser (59). Denne arts egnethed til økotoxikologiske test er f.eks. beskrevet i (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Dyrkningsmetoder

For at have et tilstrækkeligt antal *tubifex tubifex* til at foretage bioakkumuleringsbænk skal ormen holdes i en permanent laboratoriedyrkning. Et system bestående af syntetisk sediment baseret på den kunstige jord ifølge testmetode C.8 (40) og rekonstitueret vand ifølge testmetode C.1 anbefales til *T. tubifex*-dyrkning (8).

Beholdere af glas eller rustfrit stål med en højde på 12-20 cm kan bruges som dyrkningsbeholdere. Hver dyrkningsbeholder tilsættes et lag vådt syntetisk sediment fremstillet som beskrevet i tillæg 5. Dybden af sedimentlaget skal give mulighed for ormens naturlige nedgravningsadfærd (minimumsdybde for *T. tubifex*: 2 cm). Rekonstitueret vand tilsættes til systemet. Forstyrrelse af sedimentet minimeres. Vandet beluftes forsigtigt (f.eks. to bobler pr. sekund med 0,45 µm-filtreret luft) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt 2 cm over sedimentoverfladen. Den anbefalede dyrkningstemperatur er 20 ± 2 °C.

Ormen tilsættes dyrkningssystemet med en maksimal belastning på 20 000 individer/m² sedimentoverflade. En højere belastning kan forårsage en reduktion i vækst- og formeringshastigheder (43).

I kunstige sedimentkulturer skal ormen fodres. En diæt bestående af fintmalet fiskefoder, f.eks. TetraMin®, kan bruges som supplerende ernæring (8), Klerks 1994, personlig kommunikation. Fodermængderne skal sikre tilstrækkelig vækst og formering og holde opbygningen af ammoniak og svampevækst i kulturen på et minimum. Foder kan gives to gange om ugen (f.eks. 0,6-0,8 mg pr. cm² sedimentoverflade). Erfaringer fra praksis har vist, at tilsætning af foder, der er suspenderet og homogeniseret i deioniseret vand, kan lette en homogen foderfordeling på sedimentoverfladen i dyrkningsbeholderne.

For at forhindre akkumulering af ammoniak udskiftes det overliggende vand mindst en gang om ugen ved hjælp af et gennemstrømningssystem eller manuelt. Sedimentet udskiftes hver tredje måned i stamkulturerne.

Udtagning af prøver af orme fra kulturen kan ske ved at sigte dyrkningssedimentet gennem en 1 mm sigte, hvis der kun er brug for voksne. Til tilbageholdelse af kokoner er en maskestørrelse på 0,5 mm egnet, og afkom kræver en sigte på 0,25 mm. Sigterne kan anbringes i rekonstitueret vand, efter at sedimentet er sigtet. Ormene forlader nettet og kan samles op af vandet med en blød ståltang eller en pipette med flammepolerede kanter.

Kun intakte og klart identificerede enheder af *Tubifex tubifex* (f.eks. (64)) bruges til at begynde en test eller nye kulturer. Syge eller skadede orme samt kokoner angrebet af svampehyfer skal kasseres.

En synkroniseret kultur kan med passende intervaller give orme i en bestemt alder, hvis det ønskes. Nye dyrkningsbeholdere opstilles med de valgte intervaller (f.eks. hver anden uge) og begynder med organismer af en vis alder (f.eks. kokoner). Under de her beskrevne dyrkningsbetingelser er ormen voksne efter 8-10 uger. Kulturerne kan høstes, når ormen har lagt nye kokoner, f.eks. 10 uger. De udtagne voksne kan bruges til test, og nye kulturer kan påbegyndes med kokonerne.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) forekommer også i ferskvandssedimenter over hele verden og anvendes i vid udstrækning i økotoksikologiske test. Oplysninger om arternes biologi, dyrkningsbetingelser og følsomhed kan indhentes fra (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* kan også dyrkes i det kunstige sediment, der anbefales for *T. tubifex* ifølge (8) inden for visse begrænsninger. Da *L. variegatus* i naturen foretrækker grovere sedimenter end *T. tubifex* (59), kan laboratoriekulturer med det kunstige sediment, som bruges til *T. tubifex*, ophøre efter 4-6 måneder. Erfaringer fra praksis har vist, at *L. variegatus* kan holdes i en sandet bund (f.eks. kvartssand, fint grus) i et gennemstrømningssystem med fiskefoder som næringskilde i flere år, uden at bunden udskiftes. En stor fordel ved *L. variegatus* i forhold til andre akvatiske oligochaetararter er dens hurtige reproduktion, som giver en hurtigt stigende biomasse i laboratoriedyrkede populationer (1)(6)(9)(10).

Dyrkningsmetoder

Dyrkningsbetingelser for *Lumbriculus variegatus* er detaljeret beskrevet i Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Nedenfor gives en kort sammenfatning af disse betingelser.

Ormene kan dyrkes i store akvarier (57-80 l) ved 23 °C med en lysperiode på 16 timers lys og otte timers mørke (100-1 000 lx) med dagligt udskiftet råvand (45-50 l pr. akvarium). Substratet klargøres ved at skære ublegede brune papirservietter i strimler, som derefter kan blandes med dyrkningsvand i nogle få sekunder, hvilket giver små stykker papirsubstrat. Dette substrat kan derefter bruges direkte i *Lumbriculus*-dyrkningsakvarierne ved at dække bunden af tanken eller opbevares frosset i deioniseret vand til senere brug. Nyt substrat i tanken vil generelt holde sig i ca. to måneder.

Hver ormekultur startes med 500-1 000 orme og tilføres en 10 ml suspension, som indeholder 6 g startfoder til ørred tre gange om ugen under udskiftnings- eller gennemstrømningsbetingelser. Statiske eller semistatiske kulturer bør modtage lavere foder mængder for at forhindre bakterie- og svampevækst. Foder- og papirsubstrat analyseres for stoffer, der skal bruges i bioakkumuleringstest.

Under disse betingelser fordobles antallet af individer i kulturen generelt på ca. 10-14 dage.

Lumbriculus variegatus kan fjernes fra kulturene, f.eks. ved at overføre substrat med et finmasket net eller organismer med en flammepoleret glaspipette med bred åbning (ca. 5 mm i diameter) til et separat bæger. Hvis substrat føres med over i dette bæger, henstår bægeret, som indeholder orme og substrat, natten over under gennemstrømning, hvilket vil fjerne substratet fra bægeret, mens ormene bliver i bunden af beholderen. De kan derefter overføres til nye klargjorte dyrkningsbeholdere eller bearbejdes yderligere med henblik på testen, jf. (1) og (6). Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller dentale sonder i rustfrit stål til håndtering af ormene.

Et spørgsmål, der skal betragtes som afgørende, når der bruges *L. variegatus* i sedimentbioakkumuleringstest, er ormens forplantningsform (fragmentation efterfulgt af regenerering). Denne vegetative formering resulterer i to fragmenter, som ikke indtager føde i en vis periode, indtil hoved- eller haledelen er regenereret (f.eks. (36)(37)). Dette betyder, at optagelse af sediment og forurenende stof gennem indtagelse måske ikke finder sted kontinuerligt hos *L. variegatus* som hos tubificider, der ikke formerer sig ved fragmentation.

Derfor bør der gennemføres en synkronisering for at minimere ukontrolleret reproduktion og regenerering og efterfølgende høj variation i testresultaterne. En sådan variation kan forekomme, når individer, der har fragmenteret sig og derfor ikke indtager føde i en periode, er mindre eksponeret for teststoffet end andre individer, der ikke fragmenterer sig under testen, f.eks. (38). 10-14 dage inden påbegyndelsen af eksponeringen fragmenteres ormene kunstigt (synkronisering) (65). Der bør anvendes store orm, som helst ikke må vise tegn på nylig fragmentering. Disse orme kan anbringes på en glasplade i en dråbe dyrkningsvand og dissekteres i det mediane kropsområde med

en skalpel. Bagenderne skal have samme størrelse. Bagenderne henstår herefter i en dyrkningsbeholder, der indeholder samme substrat som kulturen og rekonstitueret vand, så de kan regenerere nye hoveder indtil eksponeringsperiodens start. Det er et tegn på, at nye hoveder er regenereret, når de synkroniserede orme graver sig ned i substratet (tilstedeværelse af nye hoveder kan bekræftes ved at undersøge en repræsentativ delprøve under binokulært mikroskop). Testorganismerne forventes derefter at være i tilsvarende fysiologisk tilstand. Det betyder, at når regenerering forekommer hos synkroniserede orme under testen, forventes stort set alle dyr at være eksponeret for det forurenede sediment i samme grad. Fodring af de synkroniserede orme sker, så snart ormene begynder at grave sig ned i substratet eller syv dage efter dissektion. Fodersystemet skal være sammenligneligt med fodersystemet for de almindelige kulturer, men det kan være hensigtsmæssigt at fodre de synkroniserede orme med samme fødekilde som i testen. Ormene holdes ved testtemperatur, $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Efter regenerering anvendes de intakte hele orme af samme størrelse, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller dentale sonder i rustfrit stål til håndtering af ormene.

Når *Lumbriculus variegatus* bruges i testen, bør der på grund af denne arts særlige reproduktionsform forekomme en stigning i antallet af orme i løbet af testen, hvis betingelserne er passende (6). Manglende reproduktion i en bioakkumulerings-test med *L. variegatus* registreres og tages i betragtning ved fortolkning af testresultaterne.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (ikke valideret i ringtest)**

Branchiura sowerbyi lever i forskellige sedimenttyper i reservoirer, søer, damme og floder, oprindelig i tropiske områder. De kan også ses i varme vandområder på den nordlige halvkugle. De forekommer dog hyppigere i muddersedimenter med et højt indhold af organisk materiale. Endvidere lever ormene i sedimentlaget. Selv bagenden af ormene er normalt nedgravet. Denne art kan let identificeres ud fra gælletrådene på bagenden. De voksne kan nå en længde på 9-11 cm og en vådvægt på 40-50 mg. Ormene har en høj reproduktionshastighed og kan fordoble populationen på under to uger og under de nedenfor beskrevne temperatur- og fodringsbetingelser (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* er blevet brugt i både toksicitets- og bioakkumuleringsforsøg (henholdsvis Marchese & Brinkhurst 1996, (31) og Roghair et al. 1996, (67)).

Dyrkningsmetoder

Et resumé af dyrkningsbetingelserne for *Branchiura sowerbyi* er anført nedenfor (fra Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina og Carla J. Roghair, RIVM, Nederlandene).

Der kræves ikke en enkelt teknik til dyrkning af testorganismerne. Organismerne kan dyrkes i uforurenede naturligt sediment (31). Erfaring fra praksis har vist, at et medium bestående af naturligt sediment og sand forbedrer ormenes tilstand sammenlignet med rent naturligt sediment (32)(67). 3 l-bægerglas, der indeholder 1 500 ml sediment/vand-medium bestående af 375 ml naturligt uforurenede sediment (ca. 10 % totalt organisk kulstof, ca. 17 % af partiklerne $\leq 63\text{ }\mu\text{m}$), 375 ml rent sand (M32) og 750 ml rekonstitueret eller afkloret ledningsvand, kan bruges til dyrkningen (31)(32)(67). Papirservietter kan også bruges som substrat til dyrkningen, men populationens vækst er lavere end i naturligt sediment. I semistatiske systemer beluftes vandlaget i bægerglasset langsomt, og det overliggende vand udskiftes en gang om ugen.

Hvert bægerglas indeholder 25 unge orme til at begynde med. Efter to måneder udtages de store orme af sedimentet med en pincet og anbringes i et nyt bægerglas med frisklavet sediment/vandmedium. Det gamle bægerglas indeholder også kokoner og afkom. Der kan høstes op til 400 unge orme pr. bægerglas på denne måde. Voksne orme kan bruges til reproduktion i mindst et år.

Kulturerne skal være reguleret til en temperatur i området $21\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperaturvariationen holdes under $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Den tid, der går til fosterudvikling, fra et æg bliver lagt, til afkommet forlader kokonen, er ca. tre uger ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ægproduktionen pr. overlevende orm hos *B. sowerbyi* viste sig at ligge fra 6,36 (31) til 11,2 (30) i mudder ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antallet af æg pr. kokon fra 1,8 til 2,8 (66)(69) eller op til 8 (68).

Opløst ilt, vandets hårdhed, temperatur og pH-værdi måles en gang om ugen. Fiskefoder (f.eks. TetraMin®) kan tilsættes som suspension to eller tre gange om ugen ad libitum. Ormene kan også fodres med optøet salat ad libitum.

En stor fordel ved denne art er den høje individuelle biomasse (op til 40-50 mg vådvægt pr. individ). Derfor kan denne art bruges til at teste bioakkumulering af ikke radioaktivt mærkede teststoffer. Den kan eksponeres i systemer, der bruges til *T. tubifex* eller *L. variegatus* med et enkelt individ pr. replikat (11). Replikationen bør dog i så fald øges, medmindre der anvendes større testkamre (11). Validitetskriteriet i forbindelse med nedgravningsadfærd skal tilpasses denne art.

LITTERATUR

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. I ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) Europa-Kommissionen (EK) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Kontoret for De Europæiske Fællesskabers Officielle Publikationer, Luxembourg.
- (3) OECD (1992a), Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment, OECD Monographs No. 60, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD), Paris.
- (4) C. G. Ingersoll, G. T. Ankley, D. A. Benoit, E. L. Brunson, G. A. Burton, F. J. Dwyer, R. A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King og P. V. Winger (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications, Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, marts 2000.
- (7) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenset sediment.
- (8) Ph. Egeler, J. Römbke, M. Meller, Th. Knacker, C. Franke, G. Studinger og R. Nagel (1997), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid slugworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions, Chemosphere, 35, 835-852.
- (9) C. G. Ingersoll, E. L. Brunson, N. Wang, F. J. Dwyer, G. T. Ankley, D. R. Mount, J. Huckins og J. Petty og P. F. Landrum (2003), Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Ph. Egeler, J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke og G. Studinger (1999), Workshop on »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- (13) J.R. Kelly, S.N. Levine, L.A. Buttel, A.C. Kelly, D.T. Rudnick og R.D. Morton (1990), Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- (14) M. Nendza (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel og R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) P.F. Landrum, H. Lee II og M.J. Lydy. (1992), Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) R.D. Markwell, D.W. Connell og A.J. Gabric (1989), Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) A.J. Gabric, D.W. Connell og P.R.F. Bell (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) C. Franke, G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg og U. Jöhncke (1994), The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Følgende kapitler i dette bilag:
- Kapitel A.4, Damptryk
- Kapitel A.5, Overfladespænding
- Kapitel A.6, Vandopløselighed
- Kapitel A.8, Fordelingskoefficient, rystekolbemetode
- Kapitel A.24, Fordelingskoefficient, HPLC-metode
- Kapitel C.7, Nedbrydning — abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH
- Kapitel C.4 A-F Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed
- Kapitel C.19, Bestemmelse af adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord og i kloakslam med HPLC (high performance liquid chromatography)
- Kapitel C.29, Let bionedbrydelighed — CO₂ i lukkede beholdere
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) M.D. Antoine, S. Dewanathan og G. Patonay (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) B. Beek, S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke og G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In O. Hutzinger, (red.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) A. Spacie og J.L. Hamelink (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) D.W. Hawker og D.W. Connell (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

- (29) T.B. Reynoldson, S.P. Thompson og J.L. Bamsey (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) R.J. Aston og A.G.P. Milner (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) M.R. Marchese og R.O. Brinkhurst (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) C.J. Roghair og A. Buijze (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Toksicitetstest for fisk i de tidlige udviklingsstadier OECD, Paris.
- (35) J. L. Kaster, J. V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski og M. E. Smith (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) M.T. Leppänen og J.V.K. Kukkonen (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller), *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) M. Martinez-Madrid, P. Rodriguez, J. I. Perez-Iglesias og E. Navarro (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay, *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (40) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) P. F. Landrum (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*, *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) T.L. Poddubnaya (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst og D.G. Cook (red.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) R.N. Hoofman, K. van de Guchte og C.J. Roghair (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) C. Franke (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) D. R. Mount, T. D. Dawson og L. P. Burkhard (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*, *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) R.C. Randall, H. Lee II, R.J. Ozretich, J.L. Lake og R.J. Pruell (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) W.S. Gardner, W.A. Frez, E.A. Cichocki og C.C. Parrish (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) E.G. Bligh og W.J. Dyer (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) J. De Boer, F. Smedes, D. Wells og A. Allan (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) P. Kristensen (1991). (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Vandkvalitetsinstituttet, Danmark.
- (53) S. Zok, G. Gorge, W. Kalsch og R. Nagel (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) R. Nagel (1988). (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Tyskland.
- (55) M.P.M. Janssen, A. Bruins, T.H. De Vries og N.M. Van Straalen (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) T.C. Van Brummelen og N.M. Van Straalen (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) I. Sterenborg, N.A. Vork, S.K. Verkade, C.A.M. Van Gestel og N.M. Van Straalen (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) B. C. Suedel og J. H. Rodgers (1993), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) B. Wachs (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) B.G. Oliver (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) P.M. Chapman, M.A. Farrell og R.O. Brinkhurst (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) P.M. Chapman, M.A. Farrell og R.O. Brinkhurst (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) P. Rodriguez og T. B. Reynoldson (1999), Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment, In: A. Mudroch, J.M. Azcue og P. Mudroch (red.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*, Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) R. O. Brinkhurst (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta, *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) R.J. Aston, K. Sadler og A.G.P. Milner (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

-
- (67) C.J. Roghair, A. Buijze, M.P.A. Huys, M.A.H. Wolters-Balk, E.S.E. Yedema og J.L.M. Hermens (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) R.J. Aston (1984), The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) C. Bonacina, A. Pasteris, G. Bonomi og D. Marzuoli (1994), Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274«
-