

DEEL C: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT

ALGEMENE INLEIDING

De hieronder beschreven testmethoden dienen voor de bepaling van sommige van de ecotoxicologische eigenschappen, vermeld in bijlage VIII van Richtlijn 79/831/EEG. Kennisgevers worden erop geattendeerd dat er geen methoden voor de bepaling van onderstaande, bij niveau 1 van bijlage VIII bedoelde eigenschappen in de tekst zijn opgenomen:

- verlengd toxiciteitsonderzoek met *Daphnia magna*,
- onderzoek op een hogere plant,
- verlengd toxiciteitsonderzoek op vis,

Zodra passende testmethoden voor de bepaling van deze eigenschappen zijn uitgewerkt, zullen zij worden gepubliceerd in de vorm van een nadere aanpassing aan de vooruitgang van de techniek. In de tussentijd moeten kennisgevers passende, internationaal erkende methoden gebruiken, waarvan aan de bevoegde instantie opgave moet worden gedaan.

C. 8

TOXICITEIT VOOR REGENWORMEN

TEST MET KUNSTMATIGE GROND

1. METHODE

1.1. Inleiding

In deze laboratoriumtoets wordt de te onderzoeken stof toegevoegd aan kunstmatige grond waarin gedurende veertien dagen regenwormen worden geplaatst. Na deze veertien dagen (en naar keuze ook al na zeven dagen) wordt het letale effect van de stof op de regenwormen onderzocht. Met deze test kan betrekkelijk snel een indruk worden verkregen van het effect van chemicaliën op regenwormen bij opname via de huid en via het voedsel.

1.2. Definitie en eenheid

LC₅₀: De geschatte concentratie van een stof die de dood van 50% van de proefdieren gedurende de testperiode tot gevolg heeft.

1.3. Referentiestof

Op gezette tijden wordt een referentiestof getoetst om aan te tonen dat de gevoeligheid van het testsysteem niet wezenlijk is veranderd.

Als referentiestof wordt aanbevolen chlooracetamide van analytische kwaliteit.

1.4. Principe van de test

Grond is een variabel medium en daarom wordt voor deze proef een nauwkeurig gedefinieerde kunstmatige leemgrond gebruikt. Volwassen regenwormen van de soort *Eisenia foetida* (zie de opmerking in het aanhangsel) worden gehouden in deze kunstmatige grond, die is behandeld met verschillende concentraties van de te onderzoeken stof. De kunstgrond wordt na veertien dagen (en naar keuze ook na zeven dagen) vanaf het begin van de proef op een schaal uitgespreid en het aantal overlevende regenwormen bij elke concentratie wordt geteld.

1.5. Kwaliteitsnormen

De opzet is zodanig dat de test ten aanzien van het testsubstraat en het organisme zo reproduceerbaar mogelijk is. Indien de sterfte in de controles aan het eind van de proef hoger is dan 10%, is de test ongeldig.

1.6. Beschrijving van de methode

1.6.1. Materiaal

1.6.1.1. Testsubstraat

Als basis-testsubstraat wordt goed gedefinieerde kunstmatige grond gebruikt.

a) Basissubstraat (percentages aangegeven in droog gewicht)

- 10% veenmosturf (zo dicht mogelijk bij pH 5,5 – 6,0, zonder zichtbare plantenresten en fijngemalen);
- 20% kaolienklei met zo mogelijk meer dan 50% kaoliniet;
- ongeveer 69% industrieel kwartszand (overwegend fijn zand met meer dan 50% deeltjesgrootte 0,05 – 0,2 mm). Indien de stof onvoldoende dispergeerbaar is in water, wordt per testpot 10 g zand achtergehouden om later met de teststof te kunnen worden gemengd;
- ongeveer 1% calciumcarbonaat (CaCO₃), poedervormig, chemisch zuiver, dat wordt toegevoegd om de pH op 6,0 ± 0,5 te brengen.

b) Testsubstraat

Het testsubstraat bevat het basissubstraat, de teststof en gedeïoniseerd water.

Het vochtgehalte bedraagt 25 tot 45% van het drooggewicht van het basissubstraat. Het vochtgehalte van het substraat wordt bepaald door een monster bij 105 °C tot constant gewicht te drogen. De kunstmatige grond moet zover nat worden gemaakt dat er net geen water op blijft staan. Er moet zorgvuldig worden gemengd, zodat een gelijkmatige verdeling van de te onderzoeken stof over het substraat wordt verkregen. Aangegeven moet worden op welke wijze de te onderzoeken stof door het substraat is gemengd.

c) Controlesubstraat

Het controlesubstraat bevat het basissubstraat en water. Indien een hulpstof is gebruikt, moet een extra controle worden gedaan met daarin dezelfde hoeveelheid van de hulpstof.

1.6.1.2. Testpotten

Er wordt gebruik gemaakt van glazen potten met een inhoud van ongeveer 1 liter (afgesloten met plastic deksels, schotels of plastic folie met luchtgaten), die worden gevuld met een hoeveelheid nat test- of controlesubstraat die overeenkomt met 500 g droog substraat.

1.6.2. Testomstandigheden

De potten worden geplaatst in klimaatkamers bij een temperatuur van 20 ± 2 °C onder continu licht. De lichtintensiteit dient 400 tot 800 lux te bedragen. De testduur bedraagt veertien dagen maar de sterfte kan indien gewenst ook al na zeven dagen worden bepaald.

1.6.3. Werkwijze

Testconcentraties

De concentraties van de te onderzoeken stof worden uitgedrukt als gewicht van de stof per drooggewicht basissubstraat (mg/kg).

Oriënterende toets

Het concentratiegebied dat leidt tot een sterfte tussen 0 tot 100 % kan worden bepaald in een oriënterende toets met behulp waarvan de reeks concentraties voor de definitieve test kan worden vastgesteld.

In de oriënterende toets wordt de te onderzoeken stof getest bij de volgende concentraties: 1 000, 100, 10, 1 en 0,1 mg stof per kg testsubstraat (drooggewicht).

Als er een volledige definitieve toets wordt uitgevoerd, kan voor de oriënterende toets worden volstaan met uitvoering in enkelvoud, dat wil zeggen met één pot per concentratie en één voor de controle zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen.

Definitieve toets

De resultaten van de oriënterende toets worden gebruikt voor het kiezen van ten minste vijf concentraties in een meerkundige reeks die juist het gebied tussen 0 en 100 % sterfte bestrijken en onderling met een constante factor van ten hoogste 1,8 verschillen.

Door middel van de toets met deze reeks concentraties moeten de LC₅₀-waarde en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen zo nauwkeurig mogelijk kunnen worden geschat.

In de definitieve toets worden ten minste vier potten per concentratie en vier controles zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen, onderzocht. De resultaten van deze parallelle toetsen worden gegeven als een gemiddelde met een standaarddeviatie.

Wanneer twee opeenvolgende concentraties, met een onderlinge verhouding van 1,8, slechts respectievelijk 0 en 100 % sterfte geven, zijn deze twee waarden voldoende om het gebied aan te geven waarbinnen de LC₅₀ ligt.

Mengen van het basissubstraat en de teststof

Het testsubstraat wordt zoveel mogelijk bereid zonder andere hulpstoffen dan water. Vlak voor het begin van de test wordt een oplossing, emulsie of dispersie van de te onderzoeken stof in gedeïoniseerd water of een ander oplosmiddel met het basissubstraat gemengd of daarover gelijkmatig verdeeld met een fijne chromatografische of soortgelijke sproeier.

Indien de te onderzoeken stof onoplosbaar is in water, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bij voorbeeld hexaan, aceton of chloroform). Alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen mogen worden gebruikt voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de te onderzoeken stof. Het testsubstraat wordt voor het gebruik geventileerd. De hoeveelheid verdampt water wordt daarna weer aangevuld.

De controle moet van elke hulpstof dezelfde hoeveelheid bevatten. Indien de te onderzoeken stof niet oplosbaar, disperseerbaar of emulgeerbaar is in organische oplosmiddelen, wordt 10 g van een mengsel van fijn gemalen kwartszand en een hoeveelheid van de te onderzoeken stof die nodig is voor de behandeling van 500 g droog gewicht aan kunstmatige grond gemengd met 490 g droog gewicht aan basissubstraat.

Voor elke testportie wordt een hoeveelheid nat testsubstraat die overeenkomt met 500 g droog gewicht in een glazen pot gebracht en worden tien regenwormen, die 24 uur in een soortgelijk nat basissubstraat zijn geconditioneerd en voor gebruik snel zijn gewassen en met filterpapier van overtollig water zijn ontdaan, bovenop het testsubstraat geplaatst.

De potten worden afgedekt met geperforeerde plastic deksels, schalen of folie om uitdrogen van het substraat te voorkomen en worden vervolgens veertien dagen onder de testomstandigheden gehouden.

De bepalingen worden gedaan veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na het begin van de test. Het substraat wordt uitgespreid op een plaat van glas of roestvrij staal. De regenwormen worden onderzocht en het aantal overlevende wormen wordt bepaald. Regenwormen worden als dood aangemerkt indien zij niet reageren op een zachte mechanische prikkel op de kop.

Indien onderzoek na zeven dagen plaatsvindt, wordt het substraat terug in de pot gedaan en worden de overlevende regenwormen weer bovenop het testsubstraat geplaatst.

- 1.6.4. *Testorganismen*
De testorganismen zijn volwassen *Eisenia foetida* (zie opmerking in de bijlage), ten minste twee maanden oud met citellum, nat gewicht 300—600 mg (voor kweekmethode zie aanhangsel).
2. **GEGEVENS**
- 2.1. **Verwerking van de resultaten**
De concentraties van de onderzochte stof worden vermeld in samenhang met de bijbehorende percentages dode regenwormen.
Wanneer de gegevens zich daartoe lenen, worden de LC₅₀-waarde en de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,05$) bepaald volgens standaardmethoden (Litchfield en Wilcoxon, 1949 of gelijkwaardige methode). De LC₅₀ wordt weergegeven in mg te onderzoeken stof per kg testsubstraat (droog gewicht).
Indien de helling van de concentratiecurve te steil is voor de berekening van de LC₅₀, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.
Wanneer twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts respectievelijk 0% en 100% sterfte geven, zijn deze waarden voldoende voor het aangeven van het gebied waarbinnen de LC₅₀ ligt.
3. **VERSLAGGEVING**
- 3.1. **Testrapport**
Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:
— een verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig de bovenvermelde kwaliteitsnormen;
— uitgevoerde toetsen (oriënterende toets en/of definitieve toets);
— nauwkeurige beschrijving van de testomstandigheden of verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig deze methode; alle afwijkingen worden vermeld;
— nauwkeurige beschrijving van de wijze waarop de te onderzoeken stof door het basissubstraat is gemengd;
— gegevens over de testorganismen (soort, leeftijd, gemiddeld gewicht en variatie in gewicht, houd- en kweekomstandigheden, leverancier);
— gebruikte methode voor de bepaling van de LC₅₀;
— testresultaten met inbegrip van alle gebruikte gegevens;
— beschrijving van waargenomen symptomen of wijzigingen in het gedrag van de testorganismen;
— sterfte in de controleproeven;
— LC₅₀ of hoogste geteste concentratie zonder sterfte dan wel laagste geteste concentratie met een sterfte van 100%, veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na de start van de test;
— grafiek van de concentratie-responscurve;
— resultaten verkregen met de referentiestof, in samenhang met de onderhavige test dan wel uit eerdere kwaliteitsborging.
4. **REFERENTIES**
- (1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 207*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.
 - (2) Edwards, C. A., en Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 blz.
 - (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 blz.
 - (4) Litchfield, J. T., en Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 1949, blz. 99.
 - (5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
 - (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Aanhangsel

Kweken en houden van de wormen vóór de test

Voor het kweken worden 30 tot 50 volwassen wormen in een kweekbak met vers substraat gebracht en na veertien dagen daaruit verwijderd. Deze dieren kunnen worden gebruikt voor verder kweken. De uit de cocons gekomen regenwormen worden voor het onderzoek gebruikt wanneer ze volwassen zijn (onder de voorgeschreven omstandigheden na twee tot drie maanden).

Houd- en kweekomstandigheden

Klimaatkamer: temperatuur 20 ± 2 °C, zo mogelijk met continu licht (intensiteit 400—800 lux).

Kweekbakken: geschikte ondiepe bakken met een inhoud van 10 tot 20 l.

Substraat: Eisenia foetida kan worden gekweekt in verschillende dierlijke uitwerpselen. Aanbevolen als kweekmedium wordt een mengsel van 50 volumepercent turf en 50% koemest of paardemest. Het medium moet een pH hebben van 6 tot 7 (bij te stellen met calciumcarbonaat) en een lage-ionengeleiding (lager dan 6 mmho's of 0,5% zoutconcentratie). Het substraat dient vochtig maar niet te nat te zijn.

Naast de aangegeven methode kunnen ook andere procedures die goede resultaten geven worden gebruikt.

Opmerking: Eisenia foetida bestaat in twee ondersoorten die door sommige taxonomen als soorten worden aangemerkt (Bouche, 1972). Deze zijn morfologisch overeenkomstig, maar de ene, Eisenia foetida foetida, heeft kenmerkende dwarse strepen of banden op de segmenten terwijl de andere, Eisenia foetida andrei, deze niet heeft en een onregelmatige roodachtige kleur heeft. Zo mogelijk dient Eisenia foetida andrei te worden gebruikt. Andere soorten kunnen worden gebruikt indien de benodigde methodiek beschikbaar is.

C. 9

BIOLOGISCHE AFBRAAK

ZAHN-WELLENS TEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare, niet-vluchtige organische stoffen, wanneer deze in een statische proef aan betrekkelijk hoge concentraties micro-organismen worden onderworpen.

Aan de gesuspendeerde vaste stoffen kan fysisch-chemische adsorptie plaatsvinden en hiermee moet bij het interpreteren van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

De te onderzoeken stoffen worden gebruikt in concentraties, die overeenkomen met DOC-waarden tussen 50 en 400 mg/liter of COD-waarden tussen 100 en 1 000 mg/liter (DOC = opgeloste organische koolstof; COD = chemisch zuurstofverbruik). Deze betrekkelijk hoge concentraties hebben het voordeel dat ze analytisch betrouwbaar zijn. Verbindingen met toxische eigenschappen kunnen het afbraakproces vertragen of verhinderen.

In deze methode wordt door middel van meting van de concentratie opgeloste organische koolstof of het chemisch zuurstofverbruik de uiteindelijke biologische afbraak van de teststof bepaald.

Het gelijktijdig toepassen van een specifieke analytische methode biedt de mogelijkheid de primaire biologische afbraak van de stof (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur) te bepalen.

Deze methode is alleen toepasbaar op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- onder de testomstandigheden in water oplosbaar zijn,
- onder de testomstandigheden een verwaarloosbare dampspanning hebben,
- geen remmende werking op bacteriën hebben,
- slechts in beperkte mate worden geadsorbeerd aan de testapparatuur,
- niet door schuimvorming uit de testoplossing verdwijnen.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste componenten van het testmateriaal kunnen van nut zijn bij het interpreteren van de resultaten, vooral wanneer deze laag of marginaal zijn.

Gegevens aangaande de toxiciteit van de stof ten opzichte van micro-organismen zijn gewenst voor de interpretatie van lage resultaten en voor de keuze van de geschikte testconcentraties.

1.2. Definities en eenheden

De aan het eind van de proef verkregen mate van afbraak wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test“:

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

waarin

D_T = biologische afbraak (%) op tijd T,

C_A = DOC- of COD-waarden in het testmengsel, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l) (DOC = opgeloste organische koolstof, COD = chemisch zuurstofverbruik),

C_T = DOC- of COD-waarden in het testmengsel op het tijdstip van monsterneming (mg/l),

C_B = DOC- of COD-waarden van de blanco op het tijdstip van monsterneming (mg/l),

C_{BA} = DOC- of COD-waarden van de blanco, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l).

De mate van afbraak wordt op het dichtstbijzijnde hele procent afgerond.

Het percentage afbraak wordt bepaald als zijnde het percentage DOC- of COD-verwijdering van de onderzochte stof.

Het verschil tussen de waarde gemeten na drie uur en de berekende of bij voorkeur gemeten oorspronkelijke waarde kan nuttige informatie verschaffen over de verwijdering van de stof (zie 3.2: Interpretatie van de resultaten).

1.3. Referentiestoffen

Bij het onderzoeken van nieuwe stoffen kunnen referentiestoffen soms van nut zijn; er kunnen echter nog geen specifieke referentiestoffen worden aanbevolen.

1.4. Principe van de testmethode

In een glazen vat van 1 tot 4 liter inhoud, uitgerust met een roerstoel en een beluchtingsapparaat, worden actief slib, minerale voedingsstoffen en het testmateriaal als enige koolstofbron in water bij elkaar gebracht. Het mengsel wordt gedurende hooguit 28 dagen onder diffuus licht of in een donkere ruimte bij 20 tot 25 °C geroerd en belucht. Het verloop van het afbraakproces wordt gevolgd door het dagelijks of op andere geschikte gezette tijden bepalen van de DOC- of COD-waarden in de gefiltreerde oplossing. De verhouding tussen de verdwenen hoeveelheid DOC (of COD) bij elke meettijd en de hoeveelheid drie uur na het begin wordt uitgedrukt als het percentage biologische afbraak en dient voor het bepalen van de mate van afbraak op dat tijdstip.

Het resultaat wordt uitgezet tegen de tijd en geeft aldus de kromme van de biologische afbraak.

Wanneer een specifieke analytische methode wordt toegepast, kunnen de veranderingen in de concentratie van de uitgangsmoleculen als gevolg van de biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van deze test is in een ringtest voldoende gebleken. De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de veranderlijkheid van de blanco en, in mindere mate, door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgeloste organische koolstof en van de concentratie van de testverbinding in de vloeistof.

1.6. Beschrijving van de testmethode

1.6.1. Preparaten

1.6.1.1. Reagentia

Water: drinkwater met een organisch-koolstofgehalte kleiner dan 5 mg/l. De totale concentratie van calcium- en magnesiumionen te zamen mag 2,7 mmol/l niet overschrijden; zonodig moet met gedeïoniseerd of gedestilleerd water worden verdund.

Zwavelzuur, analytisch reagens (AR): 50 g/l.

Natriumhydroxideoplossing AR: 40 g/l.

Minerale nutriëntoplossingen: hiervoor wordt in 1 liter gedeïoniseerd water opgelost:

ammoniumchloride, NH_4Cl , AR: 38,5 g,

natriumdihydrogenfosfaat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, AR: 33,4 g,

kaliumdihydrogenfosfaat, KH_2PO_4 , AR: 8,5 g,

di-kaliumwaterstofosfaat, K_2HPO_4 , AR: 21,75 g.

Dit mengsel dient tegelijkertijd als voedingsstof maar ook als bufferoplossing.

1.6.1.2. Apparatuur

Glazen vaten met inhoud van 1 tot 4 liter (bij voorbeeld cilindervormige recipiënten).

Roerapparaat met glazen of metalen roerblad op een geschikte schacht. (De roerder moet 5 tot 10 cm boven de bodem van het vat ronddraaien.) Een magneetroerder met een roerstaaf van 7 tot 10 cm kan eveneens gebruikt worden.

Glazen buis met een inwendige diameter van 2 tot 4 mm voor het inleiden van lucht. De opening van de buis moet zich ongeveer 1 cm boven de bodem van het vat bevinden.

Centrifuge (ongeveer 3 550 g).

pH-meter.

Apparaat voor het meten van de opgeloste zuurstof.

Papieren filters.

Membraanfilterapparaat.

Membraanfilters, mazen van 0,45 μm . Membraanfilters zijn geschikt als vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en bij het filteren de stof niet absorberen.

Analyseapparatuur voor het bepalen van het organisch koolstofgehalte en het chemisch zuurstofverbruik.

1.6.1.3. Bereiding van het inoculum

Actief slib uit een biologische zuiveringsinstallatie wordt gewassen door (herhaald) centrifugeren of bezinken in het water dat gebruikt wordt voor de test (zie boven).

Het actief slib moet de juiste kenmerken hebben. Dergelijk slib kan worden betrokken van een goed werkende waterzuiveringsinstallatie. Om zoveel mogelijk verschillende soorten en stammen van bacteriën te verkrijgen kan het de voorkeur verdienen inocula van verschillende bronnen (bij voorbeeld verschillende zuiveringsinstallaties, bodemextracten, rivierwater en dergelijke) te mengen. Het mengsel moet dan worden behandeld als hierboven beschreven.

Voor het controleren van de activiteit van het actief slib, zie 1.6.2, onder „Functionele controle”.

1.6.1.4. Bereiding van de testoplossingen

In het testvat worden gebracht: 500 ml testwater, 2,5 ml/l minerale nutriëntoplossing en een hoeveelheid actief slib die overeenkomt met 0,2—1,0 g/l droge stof in het uiteindelijke mengsel. Hieraan wordt een voldoende hoeveelheid van een voorraadoplossing van de te onderzoeken stof toegevoegd, zodanig dat het DOC-gehalte in het uiteindelijke mengsel 50—400 mg/l bedraagt. De overeenkomstige COD-waarden zijn 100—1 000 mg/l. Het volume wordt met testwater op een totaal van 1 tot 4 liter gebracht. De keuze van het volume wordt bepaald door het aantal monsters voor de DOC- of COD-bepaling en door de voor de analytische procedure benodigde volumes.

Doorgaans wordt een volume van 2 liter als voldoende beschouwd.

Er wordt ten minste één blanco controlevat bereid dat parallel met elke testreeks wordt behandeld; het bevat alleen actief slib en minerale nutriëntoplossing, aangevuld met testwater tot hetzelfde totale volume als in de testvaten.

1.6.2. Uitvoering van de test

De testvaten worden geroerd met magneetroeders of schroefbladen onder gedempt licht of in het donker bij 20 tot 25 °C. Beluchting vindt plaats door middel van perslucht die met een wattenfilter en eventueel een wasfles wordt gereinigd. Er dient voor gezorgd te worden dat het slib niet bezinkt en de zuurstofconcentratie niet beneden de 2 mg/l daalt.

De pH-waarde wordt op gezette tijden (bij voorbeeld dagelijks) gemeten en zonodig bijgesteld tot pH 7 à 8.

Verliezen ten gevolge van verdamping worden vlak voor de monsterneming aangevuld met gedeïoniseerd of gedestilleerd water in de vereiste hoeveelheden. Een goede methode bestaat erin, het vloeistofniveau voor het begin van de proef aan te duiden op het vat. Na elke monsterneming worden, bij uitgeschakelde beluchting en beroering, nieuwe aanduidingen aangebracht.

De eerste monsters worden steeds drie uur na het begin van de test genomen, ten einde adsorptie van testmateriaal aan het actief slib te kunnen ontdekken.

De verwijdering van het testmateriaal wordt gevolgd aan de hand van DOC- of COD-bepalingen, welke dagelijks of op andere gezette tijden worden uitgevoerd. De monsters uit het testvat en de blanco's worden gefiltreerd door een zorgvuldig gewassen papieren filter. De eerste 5 ml filtraat van de testoplossing worden niet gebruikt. Moeilijk filtreerbaar slib kan worden afgescheiden door voorafgaand centrifugeren gedurende tien minuten. DOC- en COD-bepalingen worden ten minste in duplo uitgevoerd. De test duurt maximaal 28 dagen.

Opmerking: Monsters die troebel blijven, worden gefiltreerd door membraanfilters. De membraanfilters mogen geen organisch materiaal afgeven of adsorberen.

Functionele controle van het actieve slib

Parallel met elke testreeks wordt een vat met een bekende stof onderzocht ten einde de functionele capaciteit van het actieve slib te controleren. Diëthyleenglycol is voor dit doel bruikbaar gebleken.

Adaptatie

Indien de analyses met betrekkelijk korte intervallen worden uitgevoerd (bij voorbeeld dagelijks), komt het adaptatiefenomeen duidelijk tot uiting in de afbraakkromme (zie figuur 2). Om deze reden wordt de test niet vlak voor het weekeinde gestart. Indien adaptatie in de laatste dagen van de test optreedt, kan de test worden verlengd tot de afbraak is beëindigd.

Opmerking: Indien een grondiger kennis van het gedrag van het geadapteerde slib nodig is, wordt hetzelfde actief slib nogmaals met hetzelfde testmateriaal in contact gebracht volgens de volgende procedure:

De roermotor en het beluchtingsapparaat worden uitgeschakeld en men laat het actief slib bezinken. De bovendrijvende vloeistof wordt verwijderd, het volume wordt met water op 2 liter gebracht, vervolgens wordt er vijftien minuten geroerd, waarna men het slib weer laat bezinken. Nadat de bovendrijvende vloeistof weer is verwijderd, wordt het resterende slib gebruikt om de test met hetzelfde materiaal volgens 1.6.1.4 en 1.6.2 te herhalen.

Het actief slib kan ook door centrifugeren in plaats van door bezinken worden afgezonderd.

Het geadapteerde slib kan met vers slib worden gemengd tot een totale hoeveelheid van 0,2—1 g droog gewicht per liter.

Analyse

Doorgaans worden de monsters gefiltreerd door een grondig gewassen papieren filter (voor het wassen wordt gedeïoniseerd water gebruikt).

Monsters die troebel blijven, worden door membraanfilters gefiltreerd (0,45 µm).

De DOC-concentratie in de filtraten van het monster (eerste 5 ml worden niet gebruikt) wordt, in duplo, bepaald met behulp van het DOC-instrument. Als analyse van de filtraten op dezelfde dag niet mogelijk is, worden deze tot de volgende dag in de koelkast bewaard. Langer bewaren wordt niet aanbevolen.

De COD-concentratie in de filtraten van het monster wordt bepaald met een COD-analyseapparaat volgens de procedure beschreven in referentie (2).

2. RESULTATEN

De DOC- en COD-concentraties in de monsters worden ten minste in duplo bepaald volgens 1.6.2. Het percentage afbraak op tijdstip T wordt berekend volgens de bij 1.2 gegeven formule (met definities).

De mate van afbraak wordt naar het dichtstbijzijnde geheel percent afgerond. De mate van afbraak die aan het eind van de test is verkregen, wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test”.

Opmerking: Indien volledige afbraak bereikt wordt voor het einde van de testduur en dit resultaat door een tweede analyse op de volgende dag wordt bevestigd, kan de test worden beëindigd.

3. VERSLAG

3.1. Testverslag

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- de beginconcentratie van de teststof,
- alle andere gegevens en experimentele resultaten betreffende de onderzochte stof, de referentiestof, indien gebruikt, en de blanco,
- de concentratie na drie uur,
- de biologische afbraakkromme met een toelichting,
- datum en plaats van monsterneming van het inoculum, adaptatietoestand, gebruikte concentratie, enz.,
- wetenschappelijke verantwoording voor eventuele wijzigingen in de testprocedure.

3.2. Interpretatie van de resultaten

Geleidelijke verwijdering van DOC of COD in de loop van dagen of weken betekent dat de teststof biologisch wordt afgebroken.

Fysisch-chemische adsorptie kan echter in sommige gevallen een rol spelen en dit wordt aangetoond door een gehele of gedeeltelijke verwijdering van de teststof gedurende de eerste drie uur en door het onverwacht klein blijven van het verschil tussen de resultaten bekomen met de controlevloeistof en de bovendrijvende vloeistof.

Als er onderscheid moet worden gemaakt tussen de biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie, zijn aanvullende proeven nodig.

Dit kan op een aantal manieren geschieden, waarvan de meest geschikte erin bestaat de bovendrijvende vloeistof als inoculum te gebruiken in een test van het basisniveau (bij voorkeur een respirometrische test).

Stoffen die in deze test een grote mate van niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering van DOC (COD) te zien geven, dienen te worden beschouwd als potentieel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering duidt erop dat de stof ten minste in enige mate biologisch afbreekbaar is.

Een geringe of ontbrekende verwijdering van DOC (COD) kan het gevolg zijn van remming van micro-organismen door de teststof en dit kan ook aan het licht komen door lysis en verlies van slib, hetgeen leidt tot troebele bovendrijvende vloeistoffen. In een dergelijk geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van teststof.

Door toepassing van een voor een verbinding specifieke analytische methode of van een met ^{14}C gemerkte teststof kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. Bij onderzoek van een ^{14}C -verbinding vormt het terugvinden van $^{14}\text{CO}_2$ de bevestiging dat biologische afbraak heeft plaatsgevonden.

Wanneer resultaten worden uitgedrukt in termen van primaire biologische afbraak dient er, zo mogelijk, een verklaring gegeven te worden over de wijziging van de chemische structuur die leidt tot een vermindering van de respons van de oorspronkelijke teststof.

De validatie van de analytische methode moet opgegeven worden te zamen met de respons die gevonden werd met het blanco-testmedium.

4. REFERENTIES

- (1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302 B*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.
- (2) Bijlage V, C 9 Degradatie: Chemisch zuurstofverbruik, Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie, *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 25 van 19. 9. 1984.

Aanhangsel

VOORBEELD VAN EEN VERSLAG

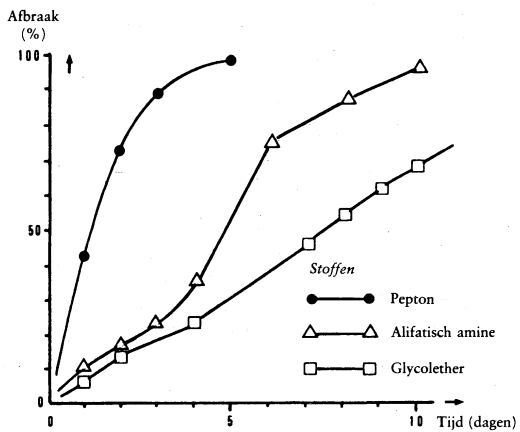
Organische verbinding: 4-Ethoxybenzoëzuur
Theoretische testconcentratie: 600 mg/l
Theoretische DOC: 390 mg/l
Entmateriaal: Waterzuiveringsinstallatie van ...
Concentratie: 1 g droge stof per liter
Adaptatietoestand: niet geadapteerd
Analyse: DOC-bepaling
Monstervolume: 3 ml
Controlestof: Diëthyleenglycol
Toxiciteit van de verbinding: Geen toxische effecten beneden 1 000 mg/l
 Gebruikte test: fermentatie/buizentest

Testtijd	Controlestof				Teststof		
	Blanco DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC ⁽¹⁾ mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %	DOC ⁽¹⁾ mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 uur	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagen	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagen	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagen	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagen	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagen	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagen	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagen	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(¹) Gemiddelde waarden van bepalingen in triplo.

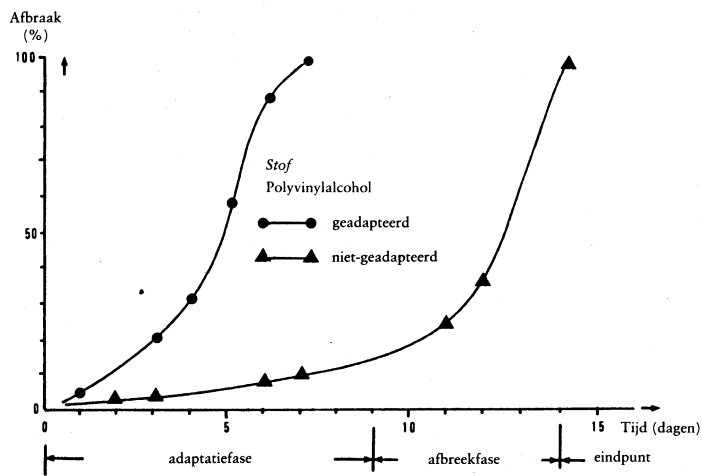
Figuur 1

Voorbeelden van krommen van de biologische afbraak



Figuur 2

Voorbeelden van adaptatie van slib



C. 10
BIOLOGISCHE AFBRAAK

SIMULATIEPROEVEN ACTIEF SLIB

1. METHODE

1.1. Inleiding

1.1.1. Algemene opmerkingen

De methode is uitsluitend van toepassing op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- oplosbaar zijn in water in de mate die nodig is voor de bereiding van de testoplossingen,
- onder de testomstandigheden een te verwaarlozen dampdruk hebben,
- niet remmend werken op bacteriën.

Gegevens over de mate waarin de belangrijke componenten van het testmateriaal zich tot elkaar verhouden, zijn van nut bij de interpretatie van de verkregen resultaten, vooral wanneer de testwaarden laag of marginaal zijn.

Informatie over de giftigheid van de stof voor micro-organismen is gewenst voor de interpretatie van lage testwaarden en bij de keuze van de juiste testconcentraties.

1.1.2. Bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid (DOC/COD-analyse)

Het doel van deze methode is de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid te bepalen door het meten van de afbraaksnelheid van de stof en eventuele metabolieten daarvan in een actief-slibmodelinstallatie bij een concentratie die overeenkomt met meer dan 12 mg DOC/l (of ongeveer 40 mg COD/l). De ideale concentratie ligt rond 20 mg DOC/l.

(DOC = opgeloste organische koolstof; COD = CZV = chemisch zuurstofverbruik.)

Het organisch koolstofgehalte (of het chemisch zuurstofverbruik) van het testmateriaal moet bepaald worden.

1.1.3. Bepaling van de primaire biologische afbreekbaarheid (specifieke analyse)

Het doel van deze methode is de primaire biologische afbreekbaarheid van een stof te bepalen in een actief-slibmodelinstallatie bij een concentratie van ongeveer 20 mg/l volgens een bepaalde analytische methode (een hogere of een lagere concentratie is mogelijk indien de analytische methode en de eventuele toxiciteit dat toelaten). Hiermee kan de primaire biologische afbreekbaarheid van de stof (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur) worden bepaald.

Doel van deze methode is *niet* het bepalen van de mineralisatie van de onderzochte stof.

Voor de bepaling van de onderzochte stof moet een goede analytische methode beschikbaar zijn.

1.2. Definities en eenheden

1.2.1. DOC/COD-analyse

De mate van verdwijning van de stof wordt gegeven door:

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

waarin:

DR = mate van verdwijning in procent DOC (of COD) binnen de gegeven gemiddelde verblijftijd ten opzichte van het testmateriaal,

T = concentratie van het testmateriaal in de toevoerstroam in mg DOC/l (of COD/l),

E = DOC- of COD-concentratie in de afvoerstroam (effluent) van de testeenheid in mg DOC/l (of COD/l),

E₀ = DOC- of COD-concentratie in de afvoerstroam van de blanco-eenheid in mg DOC/l (of COD/l).

De afbraak wordt opgegeven als percentage DOC- of COD-verwijdering binnen de gegeven verblijftijd ten opzichte van het testmateriaal.

1.2.2. *Specifieke analyse*

Het percentage verdwijning van de onderzochte stof uit de waterfase (R_w) binnen de gegeven verblijftijd wordt gegeven door:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100\% \quad [1 b)]$$

waarin:

C_i = concentratie van de stof in de toevoerstroam van de testeenheid (mg stof/l, bepaald met specifieke analyse),

C_o = concentratie van de stof in de afvoerstroam van de testeenheid (mg stof/l, bepaald met specifieke analyse).

1.3. **Referentiestoffen**

Bij het onderzoek van een nieuwe stof kan het gebruik van referentiestoffen in sommige gevallen nuttig zijn; specifieke referentiestoffen kunnen echter nog niet worden aanbevolen.

1.4. **Principe van de testmethoden**

Voor de bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid worden twee proefeenheden met actief slib (van OESO-bevestigende test of poreuze potten) tegelijkertijd in werking gesteld. De teststof wordt aan het influent (kunstmatig of huishoudelijk afvalwater) van een van de twee eenheden toegevoegd terwijl de andere alleen afvalwater ontvangt. Voor de bepaling van de primaire biologische afbreekbaarheid met specifieke analyse van het influent en effluent wordt slechts één eenheid gebruikt.

De DOC- of COD-concentraties van het effluent worden gemeten; ook kunnen de concentraties van de stof zelf en afbreekprodukten bepaald worden met specifieke analysemethoden.

De DOC van de uitgangsstof wordt niet gemeten maar eenvoudig opgegeven.

Wanneer DOC- of COD-metingen worden verricht, wordt verondersteld dat het verschil in gemiddelde concentraties tussen de effluents van de test en van de controle het gevolg is van niet-afgebroken uitgangsstof.

Wanneer specifieke analyses worden uitgevoerd, kan de verandering in de concentratie van de oorspronkelijke verbinding worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

De eenheden kunnen eventueel werken volgens de „coupled units mode” via wederzijdse enting.

1.5. **Kwaliteitsnormen**

De aanvangsconcentratie van de stof is afhankelijk van het type toegepaste analyse en de beperkingen daarvan.

1.6. **Beschrijving van de methode**

1.6.1. *Vorbereiding*

1.6.1.1. **Apparatuur**

Er zijn twee eenheden van hetzelfde type nodig, behalve wanneer specifieke analyses worden verricht. Twee soorten installaties kunnen worden gebruikt:

OESO-bevestigende test

De apparatuur (aanhangel 1) bestaat uit een voorraadvat (A) voor kunstmatig afvalwater, een doseerpomp (B), een beluchtingsvat (C), een nabezinkvat (D), een persluchtpomp (E) voor het recirculeren van actief slib en een vergaarbak (F) voor het opvangen van behandeld afvalwater.

De vaten (A) en (F) zijn van glas of geschikte kunststof met een inhoud van ten minste 24 liter. Pomp (B) zorgt voor een constante toevoer van kunstmatig afvalwater naar het beluchtingsvat; elk geschikt systeem mag worden gebruikt, mits de toevoerstroam en de concentratie worden gehandhaafd.

Bij normaal gebruik is de hoogte van het nabezinkvat (D) zo ingesteld dat het beluchtingsvat 3 liter gemengde vloeistof bevat. Een plaatje van gesinterd glas voor de beluchting (beluchter) (G) hangt in vat (C) op het laagste

punt van de binnenste kegel van dit vat. De hoeveelheid via de beluchtingsinrichting ingeblazen lucht wordt gemeten met een stroommeter.

De persluchtpomp (E) wordt zo ingesteld dat het actief slib voortdurend en gelijkmatig uit het nabezinkvat naar beluchtingsvat (C) wordt teruggevoerd.

„Poreuze pot”

De „poreuze pot” wordt vervaardigd van vellen poreus polyethyleen (2 mm dik, maximale poriëgrootte 95 µm), waarvan cilinders van 14 cm doorsnede worden gemaakt met een conisch uiteinde van 45° (figuren 1 en 2 van aanhangsel 2). De poreuze pot is ingesloten in een ondoordringbaar vat van geschikte kunststof van 15 cm doorsnede met een uitgang op 17,2 cm hoogte op het cilindrische gedeelte, die het volume (3 liter) in de pot bepaalt. Een vaste draagring van geschikte kunststof rondom de bovenkant van het binnenvat zorgt ervoor dat er tussen het binnenvat en het buitenvat een ruimte is van 0,5 cm breedte voor het afvalwater.

De poreuze potten kunnen worden opgehangen in het midden van een thermostatisch geregeld waterbad. Er is luchttoevoer naar de bodem van het binnenvat waarop geschikte beluchters zijn gemonteerd.

De vaten (A) en (E) zijn van glas of geschikte kunststof met een inhoud van ten minste 24 liter. Pomp (B) zorgt voor een constante toevoer van kunstmatig rioolwater naar het beluchtingsvat; elk geschikt systeem is bruikbaar, mits de invoerstroom en de concentratie zijn verzekerd.

Er moeten enige poreuze binnenvaten in reserve worden gehouden ter vervanging van potten die tijdens het gebruik verstopt raken; verstopte potten worden gereinigd door ze 24 uur in een hypochlorietoplossing te dompelen en vervolgens grondig met leidingwater te spoelen.

1.6.1.2. Filtratie

De membraanfiltratieapparatuur en membraanfilters hebben een poriëgrootte van 0,45 µm. Membraanfilters zijn geschikt indien vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en de stof tijdens de filtratie niet absorberen.

1.6.1.3. Afvalwater

Er kan gebruik gemaakt worden van geschikt kunstmatig afvalwater of van huishoudelijk afvalwater.

Voorbeeld van een kunstmatige toevoer

Per liter leidingwater worden opgelost:

Pepton:	160 mg,
Vleesextract:	110 mg,
Ureum:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ · 2H ₂ O:	4 mg,
MgSo ₄ · 7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Huishoudelijk afvalwater

Dit wordt dagelijks opnieuw verzameld uit de overloop van de primaire bezinkingsvijver van een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater.

1.6.1.4. Voorraadoplossing testmateriaal

Een oplossing van de teststof (bij voorbeeld 1 %) wordt bereid, ten einde aan de testeenheid te worden toegevoegd. De concentratie van het materiaal wordt bepaald, zodat het juiste volume bekend is dat aan het afvalwater of rechtstreeks aan de eenheid via een tweede pomp moet worden toegevoegd, ten einde de vereiste testconcentratie te verkrijgen.

1.6.1.5. Entmateriaal

Opmerking: Bij gebruik van huishoudelijk afvalwater heeft het geen zin entmateriaal met lage bacterieconcentratie te gebruiken; actief slib kan echter wel worden gebruikt.

Verschillende entmaterialen kunnen worden gebruikt.

Drie voorbeelden:

a) Entmateriaal uit secundaire effluent

Het entmateriaal wordt genomen van een secundaire effluent van goede kwaliteit uit een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater. Het monster afvoerwater wordt tussen de bemonstering en het gebruik onder aerobe omstandigheden gehouden. Voor de bereiding van het entmateriaal wordt het monster door een grof filter geleid, waarbij de eerste 200 ml wordt weggegooid. Het filtraat wordt tot aan het gebruik aerobisch gehouden. Het entmateriaal moet op de dag van de monstername worden gebruikt. Voor het enten is ten minste 3 ml nodig.

b) Samengesteld entmateriaal

Entmateriaal uit secundaire effluent

Zie beschrijving hierboven.

Entmateriaal uit bodem

100 g tuingrond (vruchtbaar, niet steriel) wordt gesuspenderd in 1 000 ml chloorvrij drinkwater. (Grond met een extreem gehalte aan klei, zand of humus is niet geschikt.) Na roeren laat men de suspensie 30 minuten bezinken. De bovenstaande vloeistof wordt door een grof papierfilter gehaald, waarbij de eerste 200 ml wordt weggeworpen. Het filtraat wordt direct daarna tot aan het gebruik belucht. Het entmateriaal wordt op de dag van bereiding gebruikt.

Entmateriaal uit oppervlaktewater

Ook wordt nog een deel van het entmateriaal genomen uit mesosaproef oppervlaktewater. Het monster wordt door een grof papierfilter geleid, waarbij de eerste 200 ml wordt weggeworpen. Het filtraat wordt aerobisch gehouden tot aan het gebruik. Het entmateriaal wordt gebruikt op de dag van de monstername.

Gelijke volumes van de drie verschillende entmonsters worden bijeengebracht en grondig gemengd. Het uiteindelijke entmateriaal wordt van dit mengsel genomen. Voor het enten wordt ten minste 3 ml gebruikt.

c) Entmateriaal uit actief slib

Als entmateriaal kan ook een hoeveelheid (niet meer dan 3 liter) actief slib (gehalte aan gesuspendeerde vaste stof maximaal 2,5 g/l) worden genomen uit de beluchtingstank van een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater.

1.6.2. *Werkwijze*

De test wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur, dat wil zeggen tussen 18 en 25°C.

Indien gewenst kan de test ook bij lagere temperatuur (minimaal 10 °C) worden uitgevoerd; indien de stof dan wordt afgebroken, is verder onderzoek doorgaans niet nodig. Indien de stof bij die temperatuur echter niet wordt afgebroken, moet de test worden uitgevoerd bij een constante temperatuur tussen 18 en 25 °C.

1.6.2.1. **Aanlooperperiode: vorming en stabilisatie van slib in de eenheden**

De groei/stabilisatieperiode van het slib is de tijd gedurende welke de concentratie gesuspendeerd actief slib en de activiteit van de testeenheden toenemen tot een stationaire toestand bereikt wordt onder de heersende omstandigheden.

De aanlooperperiode is de periode tussen het tijdstip waarop de toevoeging van teststof begint en het tijdstip waarop de verwijdering daarvan een plateau (betrekkelijk constante waarde) bereikt. Deze periode dient niet langer dan zes weken te zijn.

De beoordelingsperiode is een tijdvak van drie weken vanaf het tijdstip dat de verwijdering van de teststof een betrekkelijk constante, doorgaans hoge waarde bereikt. Voor stoffen die in de eerste zes weken weinig of geen afbraak vertonen, worden de daaropvolgende drie weken genomen als beoordelingsperiode.

Als eerste stap worden de voor één test benodigde eenheden gevuld met het toevoerwater gemengde entmateriaal.

De beluchter (en persluchtpomp (E) bij gebruik van de eenheden van de OESO-bevestigende test) en doseerinrichting (B) worden vervolgens in werking gesteld.

Door het beluchtingsvat (C) wordt toevoerwater zonder teststof geleid met een snelheid van hetzij 1 liter per uur hetzij 0,5 liter per uur; dit geeft een gemiddelde verblijftijd van drie respectievelijk zes uur.

De beluchting wordt zodanig geregeld dat de inhoud van het vat (C) constant in suspensie blijft en het gehalte opgeloste zuurstof ten minste 2 mg/l bedraagt.

Schuimvorming wordt met gepaste middelen tegengegaan. Anti-schuimmiddelen die het actief slib remmen, mogen niet worden gebruikt.

Het slib, dat zich langs de bovenste rand van het beluchtingsvat (C) en (bij testeenheden van de OESO-bevestigende test) onder in het nabezinkvat (D) en in de omloop heeft verzameld, wordt ten minste eenmaal per dag door roeren of op andere wijze naar de gemengde suspensie teruggebracht.

Wanneer het slib niet bezinkt, kan de dichtheid ervan worden verhoogd door 2 ml 5 % ijzer(III)-chlorideoplossing toe te voegen en dit zo nodig te herhalen.

Het effluent wordt gedurende 20 tot 24 uur in vat (E respectievelijk F) opgevangen en na grondig mengen wordt er een monster genomen. Vat E of F wordt daarna grondig gereinigd.

Om de efficiëntie van het proces te volgen en zo nodig bij te sturen, worden het chemisch zuurstofverbruik of het gehalte opgeloste organische koolstof (DOC) van het filtraat van het opgevangen effluent en dat van het gefiltreerde influent ten minste tweemaal per week gemeten (filtratie geschiedt met een membraan met een poriëgrootte van 0,45 µm waarbij het eerste filtraat van ongeveer 20 ml wordt weggeworpen).

De afname van COD of DOC moet zich stabiliseren wanneer een min of meer regelmatige dagelijkse afbraak is bereikt.

Het gehalte aan droge stof van het actief slib in het beluchtingsvat wordt ten minste tweemaal per week bepaald (in g/l). De eenheden kunnen op twee manieren in werking worden gehouden: in het ene geval wordt het gehalte droge stof in het actief slib tweemaal per week bepaald en, wanneer dit boven 2,5 g/l komt, wordt de overmaat actief slib afgevoerd; in het andere geval wordt dagelijks 500 ml van de gemengde vloeistof afgevoerd, zodat een gemiddelde verblijftijd voor het slib van zes dagen ontstaat.

Wanneer de gemeten en geschatte parameters (efficiëntie van het proces (in COD- of DOC-verwijdering), slibconcentratie, bezinkingsneiging van het slib, troebelheid van het effluent en dergelijke) van de twee eenheden voldoende constant zijn geworden, kan de teststof in de toevoerstream van een van de twee eenheden, overeenkomstig 1.6.2.2, worden toegevoegd.

Als alternatief kan de teststof worden toegevoegd bij het begin van de slibgroeiperiode (1.6.2.1), in het bijzonder wanneer slib als entmateriaal wordt toegevoegd.

1.6.2.2. Testprocedure

De bedrijfscondities van de aanloopperiode worden gehandhaafd en er wordt voldoende voorraadoplossing (ongeveer 1%) van de teststof aan de toevoer van de testeenheid toegevoegd zodat de gewenste concentratie teststof (ongeveer 10–20 mg DOC/l of 40 mg COD/l) in het afvalwater wordt verkregen. Dit kan worden bereikt door de oplossing dagelijks in het afvalwater te mengen of door een afzonderlijk pompsysteem. Deze concentratie kan geleidelijk worden bereikt. Indien de teststof geen vergiftiging van het actief slib teweeg brengt, kunnen ook hogere concentraties worden onderzocht.

De blanco-eenheid wordt uitsluitend met toevoerwater gevoed zonder toegevoegde stoffen. Voor analyse worden geschikte volumes effluent genomen en door membraanfilters (0,45 µm) geleid, waarbij het eerste filtraat van ongeveer 20 ml wordt weggegooid.

De gefiltreerde monsters moeten op dezelfde dag worden geanalyseerd of anderszins op een geschikte wijze worden geconserveerd, bij voorbeeld door aan elke tien ml filtraat 0,05 ml 1% kwik(II)chlorideoplossing toe te voegen of door gekoeld (2–4 °C tot 24 uur, –18 °C indien langer) te bewaren.

De aanlooptijd waarin de teststof wordt toegevoegd dient niet langer te zijn dan zes weken en de beoordelingsperiode niet korter dan drie weken, zodat ongeveer 14 tot 20 bepalingen beschikbaar zijn voor de berekening van het eindresultaat.

Gekoppelde eenheden

De koppeling van de eenheden komt tot stand door eenmaal per dag 1,5 liter actief-slib suspensie uit de beluchtingsvaten met actief slib tussen de twee eenheden uit te wisselen. Indien het testmateriaal sterk absorberend is, wordt slechts 1,5 liter van de bovenstaande vloeistof uit de bezinkingsvaten opgenomen en in het actief-slibvat van de andere eenheid gegoten.

1.6.2.3. Analyse

Om het gedrag van de stof te volgen, kunnen twee soorten analyse worden uitgevoerd:

DOC en COD

De DOC-concentraties worden in duplo bepaald met de koolstofanalysator en/of de COD-waarden worden bepaald overeenkomstig referentie (2).

Specifieke analyse

De concentraties van de onderzochte stoffen worden bepaald met een geschikte analytische methode. Zo mogelijk wordt ook een specifieke bepaling van de stof geabsorbeerd op slib uitgevoerd.

2. GEGEVENS

2.1. Gekoppelde eenheden

Wanneer de methode van gekoppelde eenheden wordt gevolgd, worden de dagelijkse verdwijningspercentages berekend volgens 1.2.1.

Deze dagelijkse verdwijningspercentages worden gecorrigeerd tot DRc voor de materiaaloverdracht als gevolg van de overentingsprocedure met behulp van vergelijking [2] voor een verblijftijd van drie uur en vergelijking [3] voor een verblijftijd van zes uur:

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

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

Het gemiddelde van de DRc-waarden wordt, evenals de standaardafwijking, berekend met vergelijking [4]:

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

waarin:

S_{DRc} = standaardafwijking van de reeks DRc-waarden,

\overline{DRc} = gemiddelde DRc-waarde,

n = aantal bepalingen.

Uitschieters van de DRc-reeks worden geëlimineerd vanaf het 95% waarschijnlijkheidsniveau volgens een geschikte statistische methode, bij voorbeeld Nalimov (6). Vervolgens worden het gemiddelde en de standaardafwijking van de DRc-waarden zonder uitschieters opnieuw berekend.

Het eindresultaat wordt vervolgens berekend met vergelijking [5]:

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

waarin:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelwaarde van t voor n paar waarden van E en E_0 en statistische betrouwbaarheid P ($P = 1 - \alpha$), waarbij P wordt gesteld op 95% (1).

Het resultaat wordt opgegeven als gemiddelde met tolerantiegrenzen bij het 95% waarschijnlijkheidsniveau met opgave van de bijbehorende standaardafwijking en het aantal gegevens uit de DRc-reeks zonder uitschieters en het aantal uitschieters, bij voorbeeld:

$DRc = 98,6 \pm 2,3\%$ DOC-verwijdering,

$s = 4,65\%$ DOC-verwijdering,

$n = 18$,

x = aantal uitschieters.

2.2. Niet-gekoppelde eenheden

De werking van de eenheden kan als volgt worden gecontroleerd:

$$\% \text{ verwijdering COD of DOC} = \frac{\text{COD of DOC toegevoerd afvalwater} - \text{COD of DOC effluent}}{\text{COD of DOC toegevoerd afvalwater}} \times 100$$

Deze dagelijkse verwijderingsgraad kan grafisch worden uitgezet, waardoor bepaalde tendensen, bij voorbeeld in verband met de acclimatisering, naar voren komen.

2.2.1. Gebruik van COD/DOC-bepalingen

Het dagelijkse verdwijningspercentage DR wordt berekend volgens 1.2.1.

Het gemiddelde van de DR-waarden en de standaardafwijking worden berekend overeenkomstig:

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

waarin:

S_{DR} = standaardafwijking van de reeks DR_i -waarden,

\overline{DR} = gemiddelde van DR_i ,

n = aantal bepalingen.

Uitschieters van de reeks DR-waarden worden geëlimineerd vanaf het 95 % waarschijnlijkheidsniveau volgens een geschikte statistische methode, bij voorbeeld Nalimov (6). Vervolgens worden het gemiddelde en de standaardafwijking van de DR-waarden zonder uitschieters opnieuw berekend.

Daarna wordt het eindresultaat berekend met vergelijking [7]

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

waarin:

$t_{n-1; \alpha}$ = tabelwaarde van t voor n paar waarden van E en E_O en statistische betrouwbaarheid P ($P = 1 - \alpha$), waarbij P wordt gesteld op 95 % (1).

Het resultaat wordt opgegeven als het gemiddelde met tolerantiegrenzen bij 95 % waarschijnlijkheidsniveau, de bijbehorende standaardafwijking en het aantal gegevens van de reeks DR-waarden zonder uitschieters en het aantal uitschieters, bij voorbeeld:

DR = (98,6 ± 2,3%) DOC-verwijdering,

s = 4,65% DOC-verwijdering,

n = 18,

x = aantal uitschieters.

2.2.2. *Gebruik van specifieke analyse*

Het percentage verwijdering van de teststof uit de waterfase (R_w) wordt berekend volgens 1.2.2.

3. **VERSLAGGEVING**

3.1. **Testrapport**

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- het in aanhangsel 3 weergegeven formulier waaruit de bedrijfsomstandigheden voor de test blijken;
- de gekozen apparatuur (OESO-bevestigende test of poreuze pot);
- de gekozen wijze van uitvoering: al dan niet gekoppelde eenheden;
- soort afvalwater: kunstmatig of huishoudelijk; indien huishoudelijk afvalwater, datum en plaats van bemonstering;
- entmateriaal, met datum en plaats van bemonstering;
- een verklaring met de beschrijving van de analysemethode indien specifieke analyses zijn uitgevoerd;
- grafiek van het percentage COD- of DOC-verwijdering als functie van de tijd, inclusief aanloopperiode en beoordelingsperiode;
- analytisch terugvindpercentage van de teststof als COD of DOC in de voorraadoplossing;
- indien specifieke analyses werden uitgevoerd, de grafiek van het percentage verwijdering van de onderzochte stof uit de waterfase als functie van de tijd (aanloop- en beoordelingsperiode);
- de gemiddelde verwijdering van DOC, COD of van teststof en standaardafwijking, berekend uit de resultaten van de beoordelingsperiode, dat wil zeggen wanneer er een constante verwijdering van testmateriaal is dan wel de installatie stationair werkt;
- grafiek van de concentratie actief slib als functie van de tijd;
- opmerkingen over het actief slib (verwijdering van overmaat slib, sterke toename, ijzerchloride, enz.)
- in de test gebruikte concentratie van de stof;
- alle resultaten van de analyse van het slib;
- alle informatie en experimentele resultaten over de teststof en, indien gebruikt, de referentiestof;
- wetenschappelijke verantwoording van eventuele wijzigingen in de procedure.

3.2. Interpretatie van de resultaten

Een geringe verwijdering van de teststof uit de waterfase kan het gevolg zijn van remming van micro-organismen door de teststof. Dit kan ook blijken uit de ontbinding en het verlies van slib, met als gevolg een troebele vloeistof en uit een afname van de efficiëntie van de COD- of DOC-verwijdering van de proefinstallatie.

Fysisch-chemische adsorptie kan ook een rol spelen. Verschillen tussen de biologische aantasting van de verbinding en de fysisch-chemische adsorptie kan blijken door analyse van het slib na een geschikte desorptie.

Indien onderscheid moet worden gemaakt tussen biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie, zijn verdere proeven nodig.

Hiervoor bestaat een aantal mogelijkheden, maar de meest ondubbelzinnige is het gebruik van de bovenstaande vloeistof als entmateriaal in een basistest (bij voorkeur respirometrische test).

Indien hoge percentages DOC- of COD-verwijdering worden waargenomen, is dit het gevolg van biologische afbraak, terwijl bij geringe verwijdering de biologische afbraak niet te onderscheiden is van verwijdering. Indien bij voorbeeld een oplosbare verbinding een hoge adsorptieconstante van 98 % blijkt te hebben en per dag 10 % overmaat slib wordt afgevoerd, is een verwijdering tot 40 % mogelijk; bij een afvoer van 30 % overmaat slib per dag kan verwijdering als gevolg van adsorptie aan en verwijdering met overmaat slib oplopen tot 65 % (4).

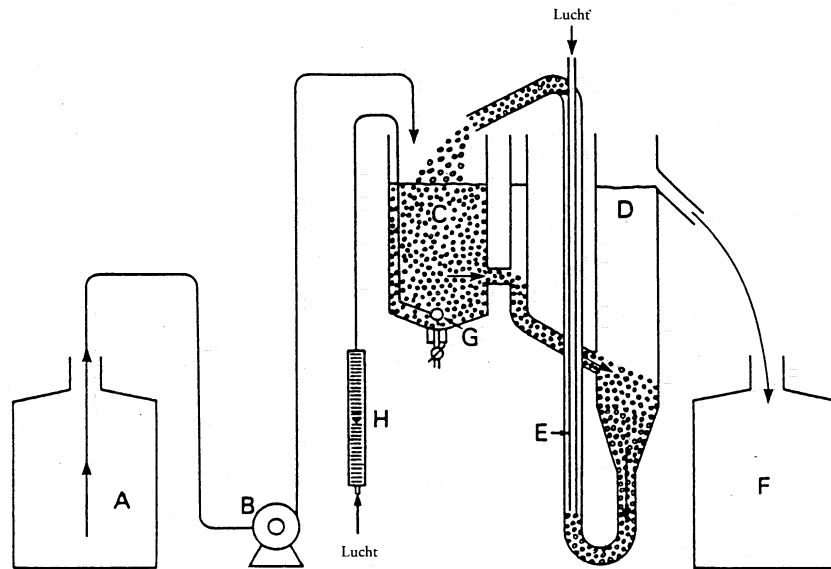
Wanneer specifieke analyses worden uitgevoerd, moet gelet worden op het verband tussen de structuur van de stof en de gebruikte specifieke analyse. In dit geval kan het waargenomen verschijnsel niet worden uitgelegd als mineralisering van de stof.

4. REFERENTIES

- (1) OESO, Parijs, 1981, *Testrictlijn 303 A*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.
- (2) Bijlage V, C 9 Degradatie: Chemisch zuurstofverbruik, Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie, *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 251 van 19. 9. 1984.
- (3) Painter, H. A., en King, E. F., Porous-Pot method for assessing biodegradability, *Technical Report TR70*, juni 1978, Water Research Centre, UK.
- (4) Wierich, P., en Gerike, P., The Fate of Soluble Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, no. 2, juni 1981, blz. 161 en 171.
- (5) Richtlijnen 82/242/EEG en 82/243/EEG (*Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 109 van 22. 4. 1982) tot wijziging van de Richtlijnen 73/404/EEG en 73/405/EEG: Biologische afbreekbaarheid van detergents (*Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 347 van 17. 12. 1973).
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980), blz. 406.

Aanhangsel 1

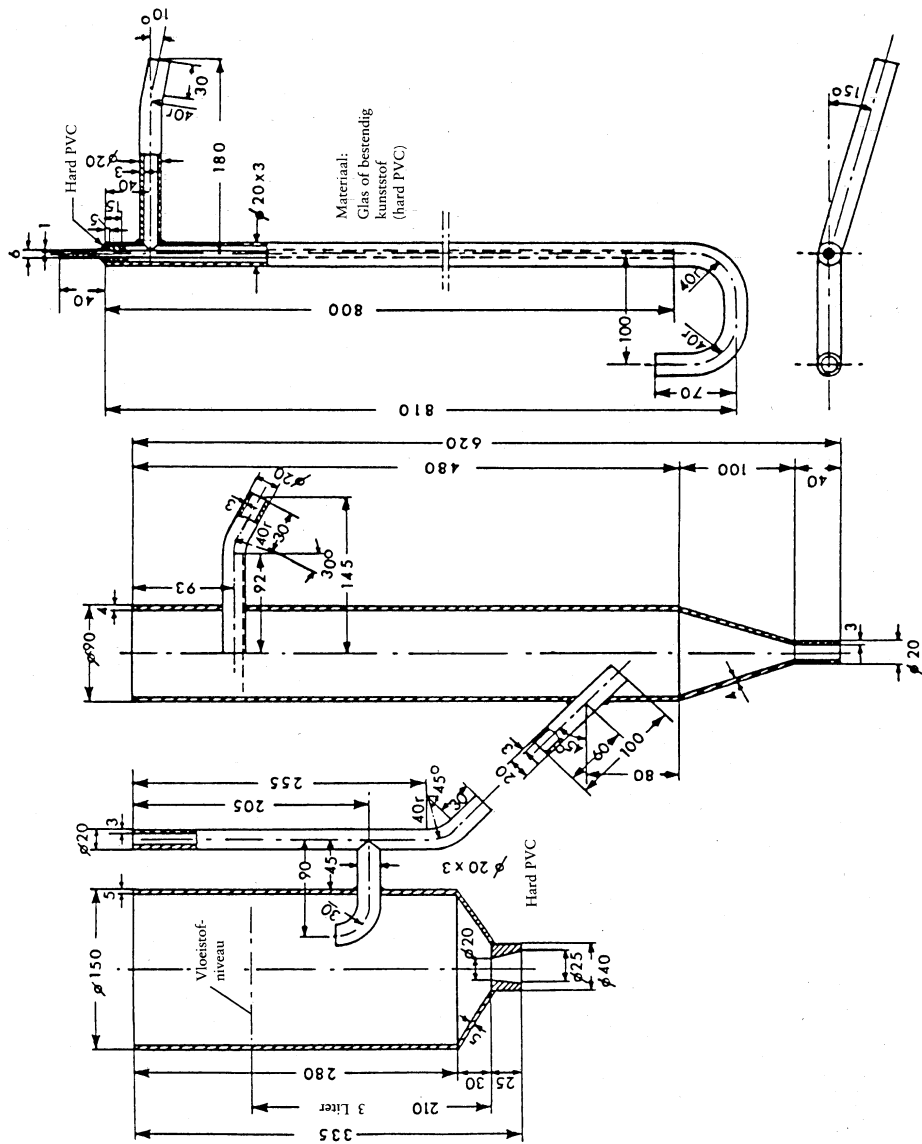
Figuur 1



A = Voorraadvat;
B = Doseerpomp;
C = Beluchtingsvat (inh. 3 l);
D = Bezinkvat;

E = Persluchtpomp;
F = Vergaarbak;
G = Beluchter;
H = Luchtstroommeter (indien gewenst).

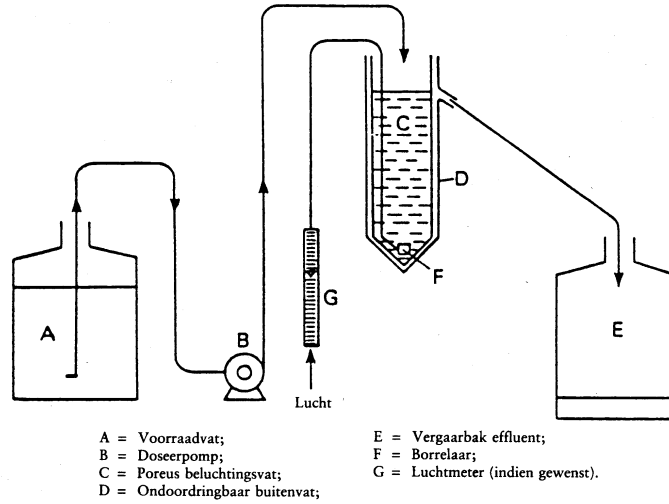
Figuur 2



Aanhangsel 2

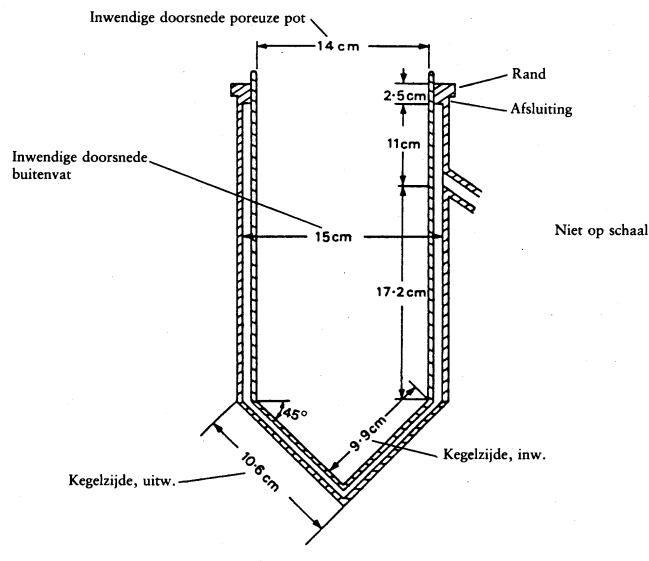
Figuur 1

Apparatuur voor bepaling biologische afbreekbaarheid



Figuur 2

Maten van poreuze beluchtingsvat van 3 liter



Aanhangsel 3

Bedrijfsomstandigheden simulatietest actief slib

Controle in elke groep

Apparatuur

Bevestigingsproef OESO
Poreuze pot

Uitvoering

Een eenheid
Twee gekoppelde eenheden
Niet gekoppelde eenheden

Overenting

Geen
Actief slib
Bovenstaande vloeistof

Gemiddelde verblijftijd

Drie uur
Zes uur

Basisvoeding

Huishoudelijk afvalwater
Kunstmatic afvalwater

Entmateriaal

Secundaire effluent
Samengesteld
Actief slib

Toevoeging testmateriaal

Bij de start
Geleidelijk
Na slibvorming

Analyse

Specifiek
COD (CZV)
DOC

C. 11

BIOLOGISCHE AFBRAAK

ACTIEF SLIB: REMMING ADEMHALING

1. METHODE

1.1. Inleiding

In de hier beschreven methode wordt de invloed van een teststof op micro-organismen bepaald doordat de ademhalingsnelheid onder gedefinieerde omstandigheden wordt gemeten in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof.

Deze methode is een snelle test, waarmee stoffen die de werking van aerobe microbiële zuiveringsinstallaties kunnen schaden, kunnen worden geïdentificeerd. Ook dient de test om een aanwijzing te krijgen van niet-remmende concentraties van stoffen waarvan de biologische afbreekbaarheid moet worden onderzocht.

De definitieve test kan worden voorafgegaan door een oriënterende proef. Deze levert informatie op over het concentratiegebied dat in de definitieve test dient te worden onderzocht.

De test bevat verder twee controles zonder teststof, welke respectievelijk aan het begin en aan het eind van de test worden ingezet. Bovendien wordt elke partij actief slib met behulp van een referentiestof gecontroleerd.

Deze methode verloopt het gemakkelijkst met stoffen die door de goede oplosbaarheid in water in de geringe vluchtigheid waarschijnlijk in het water blijven.

Voor stoffen met beperkte oplosbaarheid in het testmedium is het niet altijd mogelijk de EC_{50} te bepalen.

Resultaten gebaseerd op zuurstofopname kunnen tot onjuiste conclusies leiden, indien de teststof de neiging heeft de oxidatieve fosforylering te ontkoppelen.

Voor de uitvoering van de test is de volgende informatie over de teststof van nut:

- oplosbaarheid in water,
- dampdruk,
- structuurformule,
- zuiverheid.

Aanbeveling

Actief slib kan potentieel ziekteverwekkende organismen bevatten en dient daarom met voorzichtigheid te worden behandeld.

1.2. Definities en eenheden

Onder ademhalingsnelheid wordt verstaan het zuurstofverbruik van actief slib van micro-organismen in afvalwater. Dit wordt doorgaans uitgedrukt in mg O_2 per mg actief slib (droge stof) per uur.

Voor de berekening van het remmend effect van een bepaalde concentratie van de teststof wordt de ademhalingsnelheid uitgedrukt als percentage van het gemiddelde van de ademhalingsnelheden van de twee controles:

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

waarin:

R_s = ademhalingsnelheid bij de geteste concentratie van de teststof,

RC_1 = ademhalingsnelheid van de eerste controle,

RC_2 = ademhalingsnelheid van de tweede controle.

De EC_{50} in deze methode is de concentratie van de teststof waarbij de ademhalingsnelheid 50% bedraagt van die in de controle onder de in deze methode beschreven omstandigheden.

1.3. Referentiestoffen

Aanbevolen wordt 3,5-dichloorfenol, dat een bekende remmer van de ademhaling is, te gebruiken als referentiestof en hiervan de EC_{50} te testen ter controle van de gevoeligheid van het slib.

1.4. **Principe van de testmethode**

De ademhalingsnelheid van actief slib waaraan een standaardhoeveelheid kunstmatig afvalwater wordt toegevoegd, wordt gemeten na een contacttijd van 30 minuten of drie uur of beide. Ook wordt de ademhalingsnelheid van hetzelfde actief slib gemeten in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof onder overigens identieke omstandigheden. De remmende werking van de teststof bij een bepaalde concentratie wordt weergegeven als percentage van de gemiddelde ademhalingsnelheden van twee controles. Een EC_{50} -waarde wordt berekend op grond van bepalingen bij verschillende concentraties.

1.5. **Kwaliteitsnormen**

De testresultaten zijn geldig indien:

- de ademhalingsnelheden van de twee controles onderling minder dan 15 % verschillen;
- de EC_{50} (30 minuten en/of drie uur) van 3,5-dichloorfenol 5 tot 30 mg/l bedraagt.

1.6. **Beschrijving van de testmethode**

1.6.1. *Reagentia*

1.6.1.1. **Oplossingen van de teststof**

De benodigde oplossingen van de teststof worden bij de aanvang van het onderzoek vers uit een voorraadoplossing bereid. Voor de voorraadoplossing kan, indien de onderstaande aanbevolen werkwijze wordt gevolgd, een concentratie van 0,5 g/l worden aangehouden.

1.6.1.2. **Oplossing van de referentiestof**

Een oplossing van 3,5-dichloorfenol kan bij voorbeeld worden bereid door 0,5 g 3,5-dichloorfenol op te lossen in 10 ml 1 M NaOH, dan tot ongeveer 30 ml met gedestilleerd water te verdunnen, vervolgens onder roeren 0,5 M H_2SO_4 toe te voegen tot er een neerslag begint te ontstaan — hiervoor zal ongeveer 8 ml 0,5 M H_2SO_4 nodig zijn — en ten slotte het mengsel met gedestilleerd water tot 1 liter te verdunnen. De pH moet dan liggen tussen 7 en 8.

1.6.1.3. **Kunstmatig afvalwater**

Kunstmatig afvalwater wordt bereid door de volgende hoeveelheden stoffen op te lossen in 1 liter water:

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

Opmerking 1: Dit kunstmatige afvalwater is 100 maal zo geconcentreerd als hetgeen is beschreven in het technisch rapport van de OESO „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents” van 11 juni 1976. Bovendien is er dikaliumwaterstoffsfaat toegevoegd.

Opmerking 2: Indien het kunstmatige afvalwater niet onmiddellijk wordt gebruikt, moet het in het donker bij 0 tot 4 °C bewaard worden gedurende maximaal één week, zodanig dat verandering in samenstelling vermeden wordt. Het kunstmatige afvalwater kan eventueel gesteriliseerd worden voor opslag of de pepton en het vleesextract kunnen kort voor de uitvoering van de test toegevoegd worden. Vóór het gebruik moet de oplossing goed worden gemengd en de pH worden bijgesteld.

1.6.2. *Apparatuur*

Meetapparaat: De precieze maten zijn niet van wezenlijk belang. Er moet echter geen vrije ruimte bovenin zijn en de elektrode moet goed zijn ingeklemd in de hals van het meetvat.

Benodigde apparatuur:

- meetapparaat (zie figuur 1),
- beluchtingstoestel,
- pH-elektrode en meetapparaat,
- O_2 -elektrode.

1.6.3. *Bereiding van het entmateriaal*

Als microbieel entmateriaal voor de test wordt doorgaans actief slib uit een zuiveringsinstallatie gebruikt die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater behandelt.

Indien nodig kunnen de grotere deeltjes door bezinking, gedurende bij voorbeeld vijftien minuten, en door decanteren van de bovenlaag met fijnere deeltjes voor het gebruik afgescheiden worden. Een alternatieve methode is het gedurende enkele seconden homogeniseren van het slib met behulp van een mixer. Wanneer er reden is te veronderstellen dat er toxische componenten aanwezig zijn, moet het slib gewassen worden met leidingwater of een isotone oplossing. Na centrifugeren wordt het supernatant gedecanteerd (deze procedure moet drie keer herhaald worden).

Een klein gedeelte van het slib wordt gewogen en gedroogd. Aan de hand van dit resultaat kan de hoeveelheid nat slib berekend worden die in water gesuspenderd dient te worden ten einde een actief slib te verkrijgen met een droge-stofgehalte tussen 2 en 4 g/l. Dit niveau correspondeert met een concentratie tussen 0,8 en 1,6 g/l in het testmedium, wanneer de hieronder aanbevolen procedure wordt gevolgd.

Indien het slib niet kan worden gebruikt op de dag dat het is verzameld, wordt aan elke liter actief slib die op bovenstaande wijze is bereid, 50 ml kunstmatig afvalwater per liter slib toegevoegd; dit mengsel wordt dan 's nachts belucht bij 20 ± 2 °C. Ook gedurende de dag wordt dit belucht. Voor gebruik wordt de pH gecontroleerd en indien nodig tussen 6 en 8 gebracht. Het gehalte aan gesuspendeerde vaste stof wordt bepaald als beschreven in de voorgaande alinea.

Indien dezelfde partij slib nodig is voor proeven op opeenvolgende dagen (ten hoogste vier dagen) wordt aan het eind van elke werkdag steeds 50 ml kunstmatig afvalwater toegevoegd.

1.6.4. *Uitvoering van de test*

Duur/contacttijd:	30 minuten en/of drie uur, gedurende welke tijd wordt belucht.
Water:	Drinkwater (zo nodig chloorvrij gemaakt).
Luchttoevoer:	Schone lucht, vrij van olie. Stroomsnelheid 0,5 tot 1 liter/minuut.
Meetapparaat:	Platbodemkolf, bij voorbeeld een BOD-kolf (zie figuur 1).
Zuurstofmeter:	Een geschikte zuurstofelektrode met een recorder.
Voedingsoplossing:	Kunstmatig afvalwater (zie boven).
Teststof:	De testoplossing wordt vers bereid bij de aanvang van de test.
Referentiestof:	bij voorbeeld 3,5-dichloorfenol (ten minste drie concentraties).
Controle:	Geënt monster zonder teststof.
Temperatuur:	20 ± 2 °C.

Voor zowel de teststof als de referentiestof kan voor de drie uur contactperiode de volgende werkwijze worden gevolgd:

Er worden verschillende vaten (bij voorbeeld bekeerglazen van 1 l) gebruikt.

Er worden ten minste vijf concentraties gebruikt die onderling steeds met dezelfde factor (bij voorkeur kleiner dan 3,2) verschillen.

Op tijdstip „0” wordt 16 ml kunstmatig afvalwater aangevuld met water tot 300 ml. Hieraan wordt 200 ml microbieel entmateriaal toegevoegd en het totale mengsel (500 ml) wordt in het eerste vat gegoten (eerste controle C 1). De testvaten moeten continu belucht worden om er zeker van te zijn dat het gehalte aan opgelost O₂ niet lager wordt dan 2,5 mg/l en dat vlak voor de meting van de ademhalingsnelheid de O₂-concentratie ten minste 6,5 mg/l bedraagt.

Op tijdstip „vijftien minuten” (vijftien minuten is een willekeurige maar geschikte tijd) wordt bovenstaande procedure herhaald, behalve dat eerst aan de 16 ml kunstmatig afvalwater 100 ml voorraadoplossing van de teststof wordt toegevoegd voordat met water tot 300 ml en daarna met microbieel entmateriaal tot 500 ml wordt aangevuld. Dit mengsel wordt dan in een tweede vat gegoten en als boven belucht. Dit proces wordt met tussenpozen van vijftien minuten herhaald met verschillende volumes van de voorraadoplossing van de teststof, zodat een reeks vaten ontstaat met verschillende concentraties van de teststof. Ten slotte wordt een tweede controle bereid (C 2).

Na drie uur wordt de pH gemeten, wordt een goed homogeen monster van de inhoud van het eerste vat in het meetapparaat gegoten en wordt de ademhalingsnelheid gedurende maximaal tien minuten gemeten.

Deze bepaling wordt om de vijftien minuten herhaald met steeds een volgend vat, zodanig dat de contacttijd per vat drie uur is.

Met elke partij microbiel entmateriaal wordt de referentiestof op dezelfde wijze getest.

Wanneer er metingen na 30 minuten contact nodig zijn, moet een andere procedure worden gekozen (bij voorbeeld meer dan één zuurstofmeter).

Indien meting van het chemisch zuurstofverbruik nodig is, worden nog meer vaten bereid met teststof, kunstmatig afvalwater en water, maar zonder actief slib.

Het zuurstofverbruik wordt gemeten en geregistreerd na een beluchtingstijd van 30 minuten en/of drie uur (contacttijd).

2. GEGEVENS EN UITWERKING

De ademhalingsnelheid wordt berekend uit de recorderuitslag in mg O₂/l.h tussen ongeveer 6,5 mg O₂/l en 2,5 mg O₂/l of over een periode van tien minuten indien de ademhalingsnelheid laag is. Het gedeelte van de ademhalingscurve waarover de ademhalingsnelheid wordt gemeten moet rechtlijnig zijn.

Indien de ademhalingsnelheden van de twee controles niet binnen 15 % van elkaar liggen of de EC₅₀ (30 minuten en/of drie uur) van de referentiestof niet in het aanvaardbare gebied (5 tot 30 mg/l voor 3,5-dichloorfenol) ligt, is de test niet geldig en moet deze worden herhaald.

Het percentage remming wordt bij elke testconcentratie berekend (zie 1.2). Het percentage remming wordt uitgezet tegen de concentratie op log-normaal- of log-waarschijnlijkheidspapier en daaruit wordt de EC₅₀-waarde herleid.

De 95 % betrouwbaarheidsgrenzen voor de EC₅₀-waarden kunnen volgens standaardprocedures worden bepaald.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- teststof: scheikundige gegevens ter identificatie;
- testsysteem: herkomst, concentratie en eventuele voorbehandeling van het actief slib;
- testomstandigheden:
 - de pH van het reactiemengsel voor de respiratiemeting,
 - testtemperatuur,
 - testduur,
 - referentiestof en de gemeten EC₅₀ daarvan,
 - abiotische zuurstofopname (indien plaatsvindend);
- resultaten:
 - alle meetgegevens,
 - remmingscurve en methode ter bepaling van EC₅₀,
 - EC₅₀ en zo mogelijk 95 % betrouwbaarheidsgrenzen, EC₂₀ en EC₈₀,
 - alle waarnemingen en alle afwijkingen van deze testmethode die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

3.2. Interpretatie van de gegevens

De EC₅₀-waarde dient te worden beschouwd als niet meer dan een aanwijzing voor de waarschijnlijke toxiciteit van de teststof, hetzij voor de afvalwaterbehandeling met actief slib, hetzij voor micro-organismen in afvalwater, omdat de in het milieu optredende ingewikkelde interacties in een laboratoriumproef niet voldoende kunnen worden nagebootst. Bovendien kunnen teststoffen die mogelijk remmend werken op de ammonia-oxydatie eveneens atypische inhibitiecurven opleveren. Dergelijke curven dient men met gepaste terughoudendheid te interpreteren.

4. **REFERENTIES**

- (1) International Standard ISO 8192-1986.
 - (2) Broecker, B., en Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, blz. 165.
 - (3) Brown, D., Hitz, H. R., en Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, blz. 245.
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, also described by:
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, blz. 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, blz. 247.
 - (7) OESO, Parijs, 1981, *Testrictlijn 209*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.
-

C. 12

BIOLOGISCHE AFBRAAK

GEWIJZIGDE SCAS-TEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Doel van de methode is te bepalen in hoeverre in water oplosbare, niet-vluchtige organische verbindingen uiteindelijk biologisch afbreekbaar zijn, wanneer zij gedurende lange tijd worden blootgesteld aan relatief hoge concentraties micro-organismen. De micro-organismen worden gedurende deze tijd in leven gehouden door dagelijkse toevoeging van voorbezonden rioolwater. (Voor gebruik tijdens het weekend kan het rioolwater bij 4 °C worden bewaard. Tevens kan het synthetisch rioolwater van de OESO-bevestigende test worden gebruikt.)

Er kan fysisch-chemische adsorptie aan de gesuspenderde deeltjes plaatsvinden; hiermee moet bij de interpretatie van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

Vanwege de lange verblijftijd van de vloeibare fase (36 uur) en de tussentijdse toevoeging van nutriënten worden bij de test niet de omstandigheden in een rioolwaterzuiveringsinstallatie gesimuleerd. De resultaten met verschillende verbindingen wijzen erop dat de potentiële biologische afbraak bij de test hoog is.

De testomstandigheden zijn zeer gunstig voor de selectie en/of adaptatie van micro-organismen die de te testen verbinding kunnen afbreken.

(De procedure kan ook worden gebruikt voor het verkrijgen van geadapteerde inocula voor andere tests).

Bij deze methode wordt de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van de te testen verbindingen beoordeeld door meting van de concentratie opgelost organisch koolstof (Concentration Dissolved Organic Carbon = DOC concentration). Het verdient de voorkeur de DOC-concentratie na aanzuren en zuiveren te bepalen en niet als het verschil van $C_{\text{totaal}} - C_{\text{anorg}}$.

Wanneer tegelijkertijd een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kan tevens worden nagegaan in hoeverre primaire afbraak van de verbinding plaatsvindt (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur).

De methode kan alleen worden toegepast bij die organische verbindingen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- in water oplosbaar zijn (ten minste 20 mg opgelost organisch koolstof per liter),
- een verwaarloosbare dampspanning hebben,
- niet remmend werken op bacteriën,
- binnen het testsysteem niet in belangrijke mate worden geadsorbeerd,
- niet door schuimvorming uit de oplossing verdwijnen.

Het gehalte aan organisch koolstof van het testmateriaal moet worden bepaald.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name als de gevonden waarden laag of zeer laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

1.2. Definities en eenheden

C_T = concentratie van de testverbinding uitgedrukt in organisch koolstof, zoals deze aan het begin van de beluchtingsperiode in het bezonken rioolwater aanwezig is of daaraan wordt toegevoegd (mg/l),

C_t = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het testmengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l),

C_c = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het controlemengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l).

Bij deze methode wordt biologische afbraak gedefinieerd als het verdwijnen van organisch koolstof. De biologische afbraak kan worden uitgedrukt als:

1. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de per dag toegevoegde hoeveelheid verbinding (D_{da}):

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

D_{da} = afbraak/dagelijks toegevoegd („degradation/daily addition“).

2. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de aan het begin van elke dag aanwezige hoeveelheid verbinding (D_{ssd}):

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

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

D_{ssd} = afbraak/begin dag aanwezig („degradation/substance start of day“),

de indexen i en $(i + 1)$ verwijzen naar de dag van meting.

Vergelijking 2 a) wordt aanbevolen wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag verschilt, terwijl vergelijking 2 b) kan worden gebruikt wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag relatief constant blijft.

1.3. Referentieverbindingen

In sommige gevallen kan bij het onderzoek van een nieuwe verbinding het gebruik van referentieverbindingen nuttig zijn; hier worden echter geen specifieke referentieverbindingen aanbevolen.

Er worden gegevens verschaft over een aantal verbindingen waarvoor een ringonderzoek is uitgevoerd (zie aanhangsel 1), voornamelijk om de methode zo nu en dan te kunnen ijken en om bij gebruik van een andere methode de resultaten te kunnen vergelijken.

1.4. Principe van de testmethode

Actief slib uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie wordt in een semi-continue actief-slibinstallatie (SCAS) gebracht. De te testen verbinding en voorbezonden rioolwater worden toegevoegd en het mengsel wordt gedurende 23 uur belucht. Vervolgens wordt de beluchting gestopt, laat men het slib bezinken en wordt het supernatans verwijderd.

Het in de beluchtungskamer achtergebleven slib wordt vervolgens vermengd met een nieuwe hoeveelheid van de te testen verbinding en rioolwater en de cyclus wordt herhaald.

De biologische afbraak wordt gemeten door bepaling van de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans. Deze waarde wordt vergeleken met de waarde die wordt verkregen voor het supernatans van controleslib, waaraan alleen voorbezonden rioolwater is toegevoegd.

Wanneer een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kunnen ook veranderingen in de concentratie van de uitgangsstof ten gevolge van biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van deze methode, gebaseerd op het verdwijnen van opgelost organisch koolstof, is nog niet aangetoond. (Wanneer rekening wordt gehouden met primaire biologische afbraak, worden zeer nauwkeurige gegevens verkregen voor materiaal dat in hoge mate afbreekbaar is.)

De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de variatie in de blanco-bepaling en in mindere mate door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgelost organisch koolstof en de concentratie van de te testen verbinding in de vloeistof aan het begin van elke cyclus.

1.6. Beschrijving van de testprocedure

1.6.1. Voorbereidingen

Voor elke te testen verbinding en voor de blanco-bepalingen moet een voldoende aantal schone beluchtungskamers (de oorspronkelijke SCAS-testopstelling van 1,5 l kan tevens worden gebruikt) worden opgesteld, voorzien van luchtinlaatbuizen (figuur 1). De perslucht voor de testopstelling wordt gefiltreerd door een grof filter met watten, mag geen organisch koolstof bevatten en moet vooraf worden verzadigd met water om verliezen door verdamping zoveel mogelijk te voorkomen.

Uit een actief-slibinstallatie, waar voornamelijk huishoudelijk afvalwater wordt gereinigd, wordt een monster actief-slibsuspensie genomen, dat 1 tot 4 g gesuspendeerde stoffen/l bevat.

Voor elke beluchtingskamer is ongeveer 150 ml van de gemengde vloeistof nodig.

Er worden voorraadoplossingen van de te testen verbinding in gedestilleerd water gemaakt; onder normale omstandigheden is een concentratie van 400 mg/l berekend als organisch koolstof nodig, zodat de concentratie van de te testen verbinding, als er geen biologische afbraak optreedt, aan het begin van elke beluchtingscyclus 20 mg koolstof/l is.

Hogere concentraties zijn mogelijk als de toxiciteit voor micro-organismen dit toelaat.

De concentratie organisch koolstof in de voorraadoplossingen wordt gemeten.

1.6.2. *Testomstandigheden*

De test dient te worden uitgevoerd bij 20 tot 25 °C.

Er wordt een hoge concentratie aerobe micro-organismen gebruikt (1 tot 4 g gesuspenseerd materiaal per liter) en de effectieve verblijftijd is 36 uur. Het koolstofhoudend materiaal in het rioolwater wordt in hoge mate geoxideerd, onder normale omstandigheden binnen acht uur na het begin van elke beluchtingscyclus. Daarna is de ademhaling in het slib gedurende de rest van de beluchtingsperiode endogeen; gedurende deze periode is de te testen verbinding het enige beschikbare substraat, tenzij ook deze snel wordt gemetaboliseerd. Deze kenmerken, alsmede het feit dat het testmengsel bij gebruik van huishoudelijk afvalwater als medium elke dag opnieuw wordt geënt, leveren zeer gunstige omstandigheden op voor zowel adaptatie als een hoge mate van biologische afbraak.

1.6.3. *Uitvoering van de test*

Uit een actief-slibinstallatie voor in hoofdzaak huishoudelijk afvalwater of een laboratoriuminstallatie wordt een gemengd vloeistofmonster genomen en tot gebruik in het laboratorium aerob bewaard. Elke beluchtingskamer (ook die voor de blanco-bepaling) wordt gevuld met 150 ml van de gemengde vloeistof (wanneer de oorspronkelijke SCAS-testapparatuur wordt gebruikt, moeten de genoemde volumes met 10 worden vermenigvuldigd) en de beluchting wordt gestart. Na 23 uur wordt de beluchting gestopt en laat men het slib gedurende 45 minuten bezinken. De kraan wordt opengedraaid en uit elke beluchtingskamer tapt men 100 ml van het supernatans af. Vlak voor gebruik wordt een hoeveelheid voorbezonden rioolwater genomen; 100 ml daarvan wordt toegevoegd aan het in elke beluchtingskamer achtergebleven slib. De beluchting wordt opnieuw gestart. In deze fase wordt geen testmateriaal toegevoegd; elke dag wordt uitsluitend huishoudelijk afvalwater in de beluchtingskamer gebracht, tot er na bezinken een helder supernatans wordt verkregen. Dit duurt meestal maximaal twee weken; de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans aan het eind van elke beluchtingscyclus benadert dan een constante waarde.

Aan het eind van deze periode wordt het bezonken slib uit de verschillende kamers gemengd en wordt in elke kamer 50 ml van dit gemengde slib gebracht.

In het testvat voor de blanco-bepaling worden 95 ml voorbezonden rioolwater en 5 ml water gebracht. In de overige testvaten wordt 95 ml voorbezonden rioolwater en 5 ml van de voorraadoplossing (400 mg/l) van de te testen verbinding gebracht. De beluchting wordt opnieuw gestart en 23 uur later stopgezet. Vervolgens laat men het slib 45 minuten bezinken; het supernatans wordt afgetapt en de hoeveelheid opgeloste organische koolstof wordt bepaald.

Deze vul- en aftapprocedure wordt gedurende de hele test elke dag herhaald.

Het is wellicht nodig vóór het bezinken de wanden van de kamers schoon te maken, om te voorkomen dat zich hierop boven het vloeistofniveau vaste deeltjes gaan afzetten. Om onderlinge verontreiniging te voorkomen wordt voor elke kamer een afzonderlijke schraper of borstel gebruikt.

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans wordt bij voorkeur elke dag bepaald, hoewel het toelaatbaar is de analyse minder vaak uit te voeren. Vóór analyse wordt de vloeistof gefilterd door gewassen membraanfilters van 0,45 µm of gecentrifugeerd. Membraanfilters kunnen worden gebruikt, als vaststaat dat deze tijdens de filtratie geen koolstof afgeven en ook de testverbinding niet adsorberen. De temperatuur van het monster mag in de centrifuge niet hoger zijn dan 40 °C.

Er zijn geen vaste regels voor de tijdsduur van de test voor verbindingen die niet of nauwelijks biologisch worden afgebroken, maar de ervaring leert dat deze in het algemeen minimaal 12 weken en maximaal 26 weken moet zijn.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans bij de testbepalingen en de blanco-bepalingen worden tegen de tijd uitgezet.

Naarmate de biologische afbraak ten einde loopt, zullen de waarden voor de testbepalingen in de buurt komen te liggen van de blanco-waarden. Wanneer het verschil tussen de twee waarden bij drie opeenvolgende metingen constant blijft, worden er nog zoveel metingen uitgevoerd dat statistische behandeling van de gegevens mogelijk is en wordt het percentage van de te testen verbinding dat biologisch wordt afgebroken berekend (D_{da} of D_{ssd} , zie 1.2).

3. RAPPORTAGE

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- alle gegevens over de aard van het rioolwater en de gebruikte proefopstelling en de resultaten van de bepalingen met de te testen verbinding en met de eventueel gebruikte referentieverbinding en de resultaten van de blanco-bepalingen,
- de temperatuur,
- de afbraakcurve met een beschrijving en de berekeningswijze (zie 1.2),
- datum en plaats van monsterneming van het actief slib en het rioolwater en gegevens over adaptatie daarvan, concentratie, enz.,
- wetenschappelijke motivering voor veranderingen in de testprocedure,
- handtekening en datum.

3.2. Interpretatie van de resultaten

Aangezien de via deze methode te testen verbinding niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar zal zijn, zal een verlaging van de DOC-concentratie uitsluitend ten gevolge van biologische afbraak onder normale omstandigheden geleidelijk plaatsvinden in de loop van dagen of weken, behalve in gevallen waar een plotselinge adaptatie optreedt, hetgeen blijkt uit een abrupte concentratieverlaging na enkele weken.

Fysisch-chemische adsorptie kan echter soms een belangrijke rol spelen; in dat geval verdwijnt het toegevoegde DOC reeds in het begin volledig of gedeeltelijk. Wat er vervolgens gebeurt, is afhankelijk van factoren als de mate van adsorptie en de concentratie van gesuspendeerde deeltjes in het afgetapte effluent. Meestal is het verschil in DOC-concentratie in het supernatans tussen de blanco-bepaling en de testbepaling aanvankelijk gering en neemt dit geleidelijk toe tot een nieuwe waarde die gedurende de rest van het experiment constant blijft, tenzij adaptatie optreedt.

Om onderscheid te kunnen maken tussen biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie moeten andere tests worden uitgevoerd. Dit kan op een aantal manieren gebeuren, maar het meest ondubbelzinnig is het supernatans of het slib als inoculum te gebruiken bij een elementair (bij voorkeur respirometrisch) experiment.

Testverbindingen, waarbij in dit experiment een grote verlaging van de DOC-concentratie optreedt, welke verlaging niet wordt veroorzaakt door adsorptie, moeten worden beschouwd als eventueel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verlaging wijst erop dat de verbinding althans enigermate biologisch wordt afgebroken.

Een geringe of in het geheel geen verlaging van de DOC-concentratie kan worden veroorzaakt door inhibitie van de micro-organismen door de te testen verbinding; dit kan ook blijken uit afbraak en verlies van slib, waarbij een troebel supernatans ontstaat. In dit geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van de te testen verbinding.

Door het gebruik van specifieke analysemethoden of van met ^{14}C gelabelde testverbindingen kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. In het geval van ^{14}C -testverbindingen wordt de biologische afbraak aangetoond door het ontstaan van $^{14}\text{CO}_2$.

Wanneer er bij de resultaten ook gegevens worden vermeld over primaire biologische afbraak, moet, indien mogelijk, worden verklaard door welke verandering in de chemische structuur een geringere hoeveelheid van de oorspronkelijke testverbinding wordt aangetroffen.

De bruikbaarheid van de analysemethode moet worden aangetoond en de resultaten van de blanco-bepaling moeten worden vermeld.

4. REFERENTIES

- (1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302 A*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

Aanhangsel 1

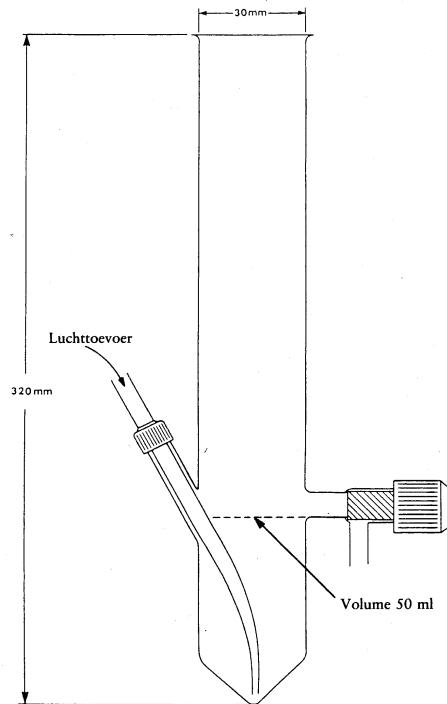
SCAS-test: voorbeeld van resultaten

Chemische stof	C_T (mg/l)	$C_0 - C_c$ (mg/l)	Percentage biodegradatie, D_{da}	Testduur (dagen)
4-acetyl aminobenzeen sulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropeenbenzeen sulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diëthyleenglycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentaan tetracarboxylaar	17,9	3,2	81,1	120

Aanhangsel 2

Voorbeeld van testopstelling

Figuur 1



C.13 BIOCONCENTRATIE: DOORSTROOMTEST MET VISSEN

1. METHODE

Deze methode voor het meten van de bioconcentratie stemt overeen met OESO-methode TG 305 (1996)

1.1 INLEIDING

Deze methode betreft een procedure voor de bepaling van het bioconcentratiegedrag van stoffen in vissen in een "flow-through"-situatie (doorstromend water). Hoewel een doorstroomtest veruit te verkiezen is, mag eventueel ook in semi-statische omstandigheden worden gewerkt voorzover aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De beschrijving van de methode omvat alle bijzonderheden die nodig zijn om de test te kunnen uitvoeren; er blijft voldoende ruimte om de proefopzet aan te passen aan de omstandigheden in het betrokken laboratorium en de specifieke karakteristieken van de teststof. De methode is bij uitstek geschikt voor stabiele organische verbindingen met een $\log P_{ow}$ -waarde tussen 1,5 en 6,0 (1), maar mag niettemin ook worden toegepast op superlipofiele stoffen (met een $\log P_{ow} > 6,0$). De voorlopige (a priori) schatting van de bioconcentratiefactor ("BCF" of ook wel "K_B") zal voor dergelijke superlipofiele stoffen meestal hoger zijn dan de met behulp van laboratoriumexperimenten bepaalde bioconcentratiefactor in de stationaire situatie (BCF_{ss}). Een preliminaire schatting van de bioconcentratiefactor van organische stoffen met een $\log P_{ow}$ -waarde die 9,0 of minder bedraagt, kan worden verkregen door toepassing van de vergelijking van Bintein et al. (2). De parameters die het bioconcentratiegedrag karakteriseren, omvatten de opnamesnelheidsconstante (k_1), de deuratiesnelheidsconstante (k_2) en de BCF_{ss}.

Het gebruik van radioactief gemerkte teststoffen kan de analyse van de water- en vismonsters vergemakkelijken en laat ook toe te bepalen of het noodzakelijk is eventuele afbraakstoffen te identificeren en te kwantificeren. Indien de totale hoeveelheid radioactieve residu's wordt gemeten (bijvoorbeeld door verbranding of weefseloplossing), heeft de gemeten BCF betrekking op de oorspronkelijke verbinding, de eventueel achterblijvende metabolieten daarvan en de geassimileerde koolstof. BCF-waarden die worden bepaald op basis van de totale hoeveelheid radioactieve residu's zijn derhalve niet zonder meer vergelijkbaar met BCF-waarden die worden verkregen door een specifieke chemische bepaling van (uitsluitend) de oorspronkelijke verbinding.

In studies met radioactieve merkers kan eventueel door toepassing van zuiveringstechnieken de BCF-waarde voor de oorspronkelijke verbinding worden bepaald; desgewenst kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd. Ook kan door analyse en identificatie van de residuen in de weefsels een studie van het metabolisme van de vissen met een bioconcentratieonderzoek worden gecombineerd.

1.2 DEFINITIES EN EENHEDEN

Bioconcentratie/bioaccumulatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme (of bepaalde weefsels daarvan) ten opzichte van de concentratie van die stof in het omringende medium.

De bioconcentratiefactor (BCF of K_B) op enig moment van de opnamefase van deze accumulatie-test, is de verhouding van de concentratie van de teststof in of op de vis of bepaalde weefsels daarvan (C_f in $\mu\text{g/g}$ (ppm)) en de concentratie van die stof in het omringende medium (C_w in $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

De bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{ss} of K_B) ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium constant blijft.

Een plateau (stationaire toestand) wordt bereikt wanneer in een grafiek van de concentratie van de teststof in de vissen (C_f) als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijd en drie opeenvolgende bepalingen van C_f op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan 20% van elkaar verschillen en er bovendien geen significant verschil bestaat tussen de waarden verkregen op de drie bemonsteringstijdstippen. Wanneer de analyse op samengevoegde monsters wordt uitgevoerd, zijn ten minste vier opeenvolgende bepalingen vereist. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken.

Een bioconcentratiefactor die rechtstreeks uit de snelheidsconstanten (k_1/k_2) wordt berekend, wordt kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) genoemd.

De octanol-water-partiticoëfficiënt (P_{ow} of K_{ow}) is de verhouding van de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en in water bij evenwicht (methode A.8). De logaritme van P_{ow} is een indicator van de neiging tot bioconcentratie van een chemische stof in aquatische organismen.

De blootstellings- of opnamefase is de periode gedurende welke de vissen aan de teststof worden blootgesteld.

De opnamesnelheidsconstante (k_1) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de proefdieren (of bepaalde weefsels daarvan) toeneemt wanneer de vissen aan die stof worden blootgesteld (k_1 wordt uitgedrukt in dag^{-1}).

De op de blootstellingsfase volgende deparatiefase (eliminatiefase) is de periode die begint op het moment dat de proefdieren van een medium dat de teststof bevat, worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de deparatie (of netto eliminatie) van de teststof uit de vis (of bepaalde weefsels daarvan) wordt bestudeerd.

De deparatie- (of eliminatie-)snelheidsconstante (k_2) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in het proefdier (of bepaalde weefsels daarvan) afneemt nadat de vis is overgebracht van een medium dat de teststof bevat naar een medium dat die stof niet bevat (k_2 wordt uitgedrukt in dag^{-1}).

1.3

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De test omvat twee fasen: de blootstellingsfase (opnamefase) en de daaropvolgende deparatiefase. Gedurende de opnamefase worden afzonderlijke groepen vissen van dezelfde soort blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof. Met de overbrenging van de vissen naar een medium dat de teststof niet bevat, wordt de deparatiefase ingeluid. Een deparatiefase is altijd noodzakelijk, tenzij er zich tijdens de blootstellingsfase nauwelijks enige opname van de stof heeft voorgedaan (d.w.z. als de BCF minder dan 10 bedraagt). De concentratie van de teststof in of op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) wordt systematisch gedocumenteerd gedurende de beide fasen van de test. Naast de groepen vissen die aan de twee testconcentraties worden blootgesteld, wordt ook een controlegroep vissen gehouden onder - afgezien van de afwezigheid van de teststof - identieke omstandigheden. Op die manier kunnen de schadelijke effecten die eventueel in de bioconcentratietest worden waargenomen, worden gerelateerd aan waarnemingen op een passende controlegroep en kan een "nuleffectbepaling" van de concentraties van de teststof worden uitgevoerd.

De opnamefase duurt 28 dagen tenzij wordt aangetoond dat de evenwichtstoestand eerder wordt bereikt. Een raming van de duur van de opnamefase en de tijd die nodig is om de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) te bereiken, kan worden verkregen met behulp van de vergelijking in aanhangsel 3. Vervolgens wordt de deparatiefase aangevat: de vissen worden overgebracht naar een nieuwe, schone bak die hetzelfde medium, maar zonder de teststof, bevat. Zo mogelijk wordt de bioconcentratiefactor op twee manieren berekend: als bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{SS}), d.w.z. als de verhouding van de concentratie in de vissen (C_f) en in het water (C_w) bij kennelijk dynamisch evenwicht, en als kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K), d.w.z. als de verhouding van de snelheidsconstanten k_1 (opname) en k_2 (deparatie), uitgaande van een eerste-ordekinetiek. Als duidelijk is dat het proces niet door een eerste-ordekinetiek kan worden beschreven, moet een complexer model worden gebruikt (zie aanhangsel 5).

Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand (dynamisch evenwicht) is bereikt, dient de opnamefase te worden verlengd met 60 dagen, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; dan wordt de deparatiefase aangevat.

De opnamesnelheidsconstante, de deparatie- (eliminatie-)snelheidsconstante (of -constanten, indien een complexer model vereist is), de bioconcentratiefactor en, zo mogelijk, een betrouwbaarheidsinterval voor elk van deze parameters worden berekend aan de hand van het model dat de gemeten concentraties van de teststof in de vissen en het water het beste beschrijft.

De BCF wordt berekend aan de hand van het totale versgewicht van de vis. Voor bepaalde doeleinden mogen evenwel ook specifieke weefsels of organen (bijvoorbeeld spieren, lever) worden gebruikt als de vissen groot genoeg zijn of als zij kunnen worden opgedeeld in een eetbaar ("filet") en een niet-eetbaar ("ingewanden") gedeelte. Aangezien er voor veel organische stoffen een duidelijk verband bestaat tussen neiging tot bioconcentratie en lipofilie, bestaat er een overeenkomstig verband tussen het vetgehalte van de in de proeven gebruikte vissen en de waargenomen bioconcentratie van die stoffen. Om deze bron van variatie in de testresultaten voor stoffen met een goede oplosbaarheid in vetten (d.w.z. met $\log P_{ow} > 3$) te verkleinen, dient de mate van bioconcentratie niet alleen te worden berekend op basis van de totale lichaamsmassa maar ook op basis van de vetfractie.

Het vetgehalte dient, voor zover mogelijk, te worden bepaald op hetzelfde biologisch materiaal waarop ook de concentratie van de teststof wordt bepaald.

1.4 GEGEVENS BETREFFENDE DE TESTSTOF

Alvorens met de bioconcentratietest wordt begonnen, moeten de volgende gegevens over de teststof bekend zijn:

- a) oplosbaarheid in water
- b) octanol-water-partiticoëfficiënt (deze wordt met P_{ow} of ook wel met K_{ow} aangegeven en wordt bepaald met de HPLC-methode overeenkomstig A.8)
- c) hydrolyse
- d) fotochemische omzetting in water onder invloed van natuurlijk of gesimuleerd zonlicht alsmede in de belichtingsomstandigheden waaronder ook de bioconcentratietest zal worden uitgevoerd (3)
- e) oppervlaktespanning (namelijk voor stoffen waarbij $\log P_{ow}$ niet kan worden bepaald)
- f) dampspanning
- g) biologische afbreekbaarheid (voorzover relevant).

Eveneens vereist zijn gegevens over de toxiciteit van de teststof voor de in de test gebruikte vissoort, bij voorkeur in de vorm van de asymptotische (tijd-onafhankelijke) LC_{50} . Er dient een passende analytische methode, met bekende nauwkeurigheid, precisie en gevoeligheid, voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in de testoplossingen en in het biologisch materiaal beschikbaar te zijn, evenals een protocol voor de voorbereiding en de opslag van de monsters. De analytische aantoonbaarheidsgrens van de teststof, zowel in water als in visweefsel, dient eveneens bekend te zijn. Wanneer een met ^{14}C gemerkte teststof wordt gebruikt, moet bekend zijn welke percentage van de radioactiviteit met onzuiverheden is geassocieerd.

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Voor een valide test moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan:

- de temperatuurschommelingen dienen kleiner te zijn dan $\pm 2^{\circ}C$;
- de concentratie van de opgeloste zuurstof mag nooit minder bedragen dan 60% van het verzadigingsniveau;
- de concentratie van de teststof in de bakken is gedurende de opnamefase nooit meer dan 20% hoger of lager dan het gemiddelde van de gemeten waarden;
- de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren (ziekte) dienen aan het einde van de test zowel in de behandelde groep als in de controlegroep minder dan 10% te bedragen; indien de test gedurende verscheidene weken of maanden wordt voortgezet, mogen de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren in elk van beide groepen vissen niet meer bedragen dan 5% per maand en 30% in het totaal.

1.6 REFERENTIESTOFFEN

Het gebruik van referentiestoffen waarvan het bioconcentratiegedrag bekend is, kan in sommige gevallen nuttig zijn om de experimentele procedure te toetsen. Vooralsnog kunnen evenwel geen specifieke stoffen worden aanbevolen.

1.7 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.7.1 Apparatuur

Voor alle onderdelen van de installatie moet het gebruik van materialen die oplossen of sorberen, waardoor stoffen in het water worden vrijgegeven of waardoor enig ander schadelijk effect op de vissen kan worden veroorzaakt, zoveel mogelijk worden vermeden. Er kunnen normale, uit een chemisch inert materiaal vervaardigde rechthoekige of cilindervormige bakken worden gebruikt die voldoende ruimte bieden, gegeven de beoogde populatiedichtheid (aantal vissen per liter water). Het gebruik van slangen uit zacht plastic moet zoveel mogelijk worden vermeden. Bij voorkeur dienen verbindingsbuizen van teflon (R), roestvrij staal en/of glas te worden gebruikt. De ervaring wijst uit dat het voor stoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroiden, noodzakelijk kan zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In een dergelijk geval moet de apparatuur na gebruik worden verwijderd (geen hergebruik).

1.7.2 Water

Voor de test wordt normaliter water van natuurlijke oorsprong gebruikt dat wordt verkregen uit een niet verontreinigde bron van uniforme kwaliteit. Het voor de verdunningen gebruikte water moet zodanig zijn dat de gekozen vissoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan overleven zonder dat de specimens een abnormaal aspect of gedrag gaan vertonen. In het ideale geval wordt aangetoond dat de gekozen vissoort in het verdunningswater kan overleven, groeien en zich voortplanten (bijvoorbeeld in een laboratoriumkweek of in een toxiciteitstest die de hele levenscyclus omvat). Van het water moeten tenminste de pH, de hardheid, het totaalgehalte aan vaste stof en het totaalgehalte aan organische koolstof worden bepaald, alsmede, zo mogelijk, het ammonium- en nitrietgehalte en de alkaliniteit en, voor mariene soorten, het zoutgehalte. De parameters die belangrijk zijn voor het optimale welzijn van de vissen zijn genoegzaam bekend; niettemin worden in aanhangsel 1 aanbevelingen gedaan wat betreft de maximumconcentratie van een aantal stoffen in het voor de tests gebruikte zoet en zeewater.

Het water dient gedurende de test een constante kwaliteit te vertonen. De pH-waarde dient in het interval 6,0-8,5 te liggen en mag bovendien in de loop van de test niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen. Om te garanderen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexatie van de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de vissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit op een schaal van ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

Het natuurlijke gehalte aan zwevende deeltjes en het totaalgehalte aan organische koolstof (TOC) van het verdunningswater dienen zo laag mogelijk te zijn om te vermijden dat de teststof aan het organisch materiaal adsorbeert waardoor de biologische beschikbaarheid ervan zou afnemen (4). De maximale toelaatbare concentraties bedragen 5 mg/l voor deeltjes (droge stof, achterblijvend op een 0,45 µm filter) en 2 mg/l voor het totaal aan organische koolstof (zie aanhangsel 1). Desnoods moet het water vóór gebruik worden gefilterd. De bijdrage van de proefdieren zelf (excrementen) en van de voedselresiduen aan de hoeveelheid organische koolstof in het water dient zo klein mogelijk te worden gehouden. Gedurende de hele duur van de test mag het gehalte aan organische koolstof in de proefbakken, afgezien van de koolstof in de teststof zelf en, in voorkomend geval, het agens dat de oplosbaarheid daarvan dient te verhogen, niet meer bedragen dan 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3 Testoplossingen

Er wordt een stockoplossing met een passende concentratie van de teststof klaargemaakt. De stockoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (oplosbaarheidsbevorderende agentia) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stockoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Als oplosmiddelen mogen ethanol, methanol, ethyleenglycol-monomethylether, ethyleenglycol-dimethylether, demethylformamide en triëthyleenglycol worden gebruikt. Als dispergeermiddelen mogen Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% methylcellulose en HCO-40 worden gebruikt. Wanneer biologisch gemakkelijk afbreekbare stoffen worden gebruikt, moet in het bijzonder worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in het doorstroomsysteem kunnen voordoen. De teststof mag radioactief worden gemerkt en dient de hoogste zuiverheidsgraad (bij voorkeur meer dan 98%) te bezitten.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stockoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat in de bakken met de proefdieren de gewenste testconcentratie wordt gehandhaafd (bijvoorbeeld doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning, saturatorsysteem). Een verversingssnelheid van ten minste vijf bakvolumes per dag voor iedere proefbak is wenselijk. Het gebruik van een doorstroomsysteem is verkieslijk, maar als dit niet mogelijk is (bijvoorbeeld omdat de gebruikte proefdieren daarvan schade ondervinden) mag een semi-statisch systeem worden gebruikt op voorwaarde dat aan de validiteitscriteria wordt voldaan. De stroomsnelheid van de stockoplossingen en het verdunningswater moet 48 uur vóór het begin van de test en vervolgens (gedurende de test) ten minste eenmaal per dag worden gecontroleerd. Deze controle omvat eveneens de bepaling van de stroomsnelheid door iedere proefbak afzonderlijk; er moet op worden toegezien dat de verschillen, zowel per bak als tussen de bakken onderling, niet meer dan 20% bedragen.

1.7.4 Keuze van de vissoort

Belangrijke criteria bij de keuze van de soort zijn dat zij gemakkelijk verkrijgbaar is, dat exemplaren van de geschikte grootte beschikbaar zijn en dat de soort op een bevredigende manier in het laboratorium kan worden gehouden. Andere keuzecriteria zijn het recreatieve, commerciële of ecologische belang van de soort alsmede haar relatieve gevoeligheid, het succes waarmee zij in het verleden is gebruikt, enz.

In aanhangsel 2 wordt een aantal aanbevolen soorten opgesomd. Ook ander soorten mogen worden gebruikt, maar in dat geval kan het nodig zijn de testprocedure aan te passen om geschikte proefomstandigheden te creëren. In dit geval moeten de redenen waarom de soort werd gekozen en de bijzonderheden van de proefopzet worden gerapporteerd.

1.7.5 **Leefomstandigheden van de vissen**

Laat het visbestand gedurende ten minste twee weken acclimatiseren in water dat de temperatuur heeft waarbij de test zal worden uitgevoerd; verschaft continu voldoende voedsel van hetzelfde type als bij de test zal worden gebruikt.

Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

- sterfte groter dan 10% van de populatie in zeven dagen: de hele partij wordt afgekeurd;
- de sterfte bedraagt 5 tot 10% van de populatie in zeven dagen: verdere acclimatisatie gedurende zeven dagen;
- de sterfte bedraagt minder dan 5% van de populatie in zeven dagen: de partij wordt geaccepteerd, maar achteraf alsnog afgekeurd indien gedurende de volgende periode van zeven dagen meer dan 5% sterfte optreedt.

Zie erop toe dat de voor de test gebruikte vissen geen zichtbare ziekte-tekens of abnormaliteiten vertonen. Verwijder alle zieke vissen. De vissen mogen niet tegen ziekten worden behandeld gedurende de test of gedurende de twee weken die daaraan voorafgaan.

1.8 **UITVOERING VAN DE TEST**

1.8.1 **Verkenningstest**

Het verdient aanbeveling een verkennende proef uit te voeren om de proefomstandigheden bij de definitieve test (bijvoorbeeld teststofconcentraties, duur van de opname- en de deparatiefase) te optimaliseren.

1.8.2 **Blootstellingsomstandigheden**

1.8.2.1 *Duur van de opnamefase*

De duur van de opnamefase kan worden geschat op basis van bestaande praktijkervaring (bijvoorbeeld gegevens uit een eerdere studie of kennis van de accumulatiesnelheid van een verwante chemische stof) of op basis van bepaalde empirische relaties, stoevend op gegevens betreffende de oplosbaarheid in water of de octanol-water-partitiecoëfficiënt van de teststof (zie aanhangsel 3).

De opnamefase dient 28 dagen te duren, tenzij kan worden aangetoond dat reeds eerder een evenwicht wordt bereikt. Indien de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) na 28 dagen nog niet is bereikt, moet de opnamefase met 60 dagen worden verlengd, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; gedurende de hele voortzetting van de opnamefase worden ook de metingen voortgezet.

1.8.2.2 *Duur van de deparatiefase*

Een tijd die half zo lang is als de opnamefase is meestal voldoende voor een adequate reductie (bijvoorbeeld met 95 %) van de lichaamsconcentratie van de teststof (zie aanhangsel 3 voor een verklaring van deze raming). Indien de tijd die nodig is voor een vermindering met 95 % in de praktijk te lang is (bijvoorbeeld indien de deparatiefase dan meer dan twee keer zo lang als de normale duur van de opnamefase, dus meer dan 56 dagen, zou duren) mag een kortere periode worden gebruikt (bijvoorbeeld tot de concentratie van de teststof minder dan 10 % van de concentratie in de stationaire toestand bedraagt). Voor stoffen met een ingewikkelder opname- en deparatiepatroon dan kan worden beschreven met een ééncompartimentmodel dat een eerste-ordekinetiek vertoont, moet evenwel toch in een langere deparatiefase worden voorzien met het oog op de bepaling van de eliminatiesnelheidsconstanten. De duur van de deparatiefase kan in voorkomend geval overigens mede worden beperkt door de tijd dat de concentratie van de teststof in de vissen boven de analytische aantoonbaarheids grens blijft.

1.8.2.3 *Aantal proefdieren*

Kies het aantal vissen per testconcentratie zo dat bij iedere bemonstering ten minste vier vissen per monster beschikbaar zijn. Indien een groter statistisch onderscheidingsvermogen is vereist, dienen meer vissen per monster te worden gebruikt.

Als volwassen vissen worden gebruikt, moet worden gerapporteerd of mannelijke of vrouwelijke exemplaren, dan wel beide, werden gebruikt. In dit laatste geval moet voor het begin van de blootstelling worden aangetoond dat er tussen beide geslachten qua vetgehalte geen significant verschil bestaat. Het kan noodzakelijk zijn alle mannelijke en alle vrouwelijke exemplaren samen te voegen.

Voor elke test moeten vissen met een min of meer uniform lichaamsgewicht worden gebruikt: het gewicht van de kleinste vis mag niet minder bedragen dan twee derde van dat van de grootste. Alle vissen moeten tot dezelfde jaarklasse behoren en dezelfde oorsprong hebben. Aangezien het gewicht en de leeftijd van een vis soms een significant effect op de BCF lijken te hebben (1), moeten deze gegevens nauwkeurig worden geregistreerd. Het verdient aanbeveling vóór de test een steekproef uit het vissenbestand te wegen om een schatting van het gemiddelde gewicht te verkrijgen.

1.8.2.4 *Aantal vissen per liter*

Gebruik een grote water/vis-verhouding om de vermindering van C_w door de introductie van de vissen bij het begin van de test zo klein mogelijk te houden en een afname van het gehalte aan opgeloste zuurstof te vermijden. Van belang is ook dat de dichtheid van de vissen op de biologische kenmerken van de gekozen soort wordt afgestemd. De aanbevolen dichtheid bedraagt normaliter 0,1-1,0 gram vis (versgewicht) per liter water per dag. Een grotere dichtheid is toelaatbaar als wordt aangetoond dat de schommelingen van de concentratie van de teststof de $\pm 20\%$ -grenzen niet overschrijden en het gehalte aan opgeloste zuurstof nooit minder bedraagt dan 60% van het verzadigingspunt.

Bij de keuze van de geschikte vissendichtheid dient rekening te worden gehouden met de normale biotoop van de betrokken vissoort. Zo kunnen demersale vissen bij eenzelfde watervolume in het aquarium een grote bodemoppervlakte verlangen dan pelagische soorten.

1.8.2.5 *Voeding*

Gedurende de acclimatisatie- en de testperiode wordt de vissen geschikt voer met een bekend vet- en totaal eiwitgehalte verstrekt in een voldoende hoeveelheid om ze gezond te houden en hun lichaamsgewicht op peil te houden. De vissen krijgen gedurende de acclimatisatie- en de testperiode dagelijks ongeveer 1 à 2% van hun lichaamsgewicht te eten; bij een dergelijk regime blijft het vetgehalte bij de meeste vissoorten min of meer constant gedurende de test. De hoeveelheid voer moet bijvoorbeeld eens per week worden herberekend teneinde het lichaamsgewicht en het vetgehalte constant te houden. Voor die berekening kan het gewicht van de in iedere testbak overblijvende vissen worden geschat aan de hand van het gewicht van de vissen in de laatste uit die testbak getrokken steekproef. Het gewicht van de achterblijvende vissen zelf wordt niet bepaald.

Niet opgegeten voer en uitwerpselen worden dagelijks, korte tijd (30 minuten tot 1 uur) na de voeding, met behulp van een hevel uit de testbakken verwijderd. Die bakken worden in de loop van de test zo schoon mogelijk gehouden om de concentratie van organische stoffen zo laag mogelijk te houden, aangezien de aanwezigheid van organische koolstof de biologische beschikbaarheid van de teststof negatief kan beïnvloeden (1).

Aangezien vele visvoerders uit vismeel worden vervaardigd, moet het voeder op de aanwezigheid van de teststof worden onderzocht. Het verdient ook aanbeveling het voeder op de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen en zware metalen te onderzoeken.

1.8.2.6 *Licht en temperatuur*

De belichtingsperiode belooft meestal 12 à 16 uur en de temperatuur ($\pm 2^\circ\text{C}$) dient geschikt te zijn voor de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 2). Het type belichting en de karakteristieken daarvan dienen bekend te zijn. Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de teststof bij de gebruikte belichting fotochemisch in andere stoffen wordt omgezet. Door een passende belichting moet worden vermeden dat de vissen aan onnatuurlijke fotochemische omzettingen worden blootgesteld. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn de UV-straling met een golflengte van minder dan 290 nm weg te filteren.

1.8.2.7 *Testconcentraties*

Er worden vissen blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof in doorstromend water. Normaliter wordt de hoogste concentratie van de teststof zo gekozen dat zij ongeveer 1% bedraagt van de acute asymptotische LC_{50} en ten minste tien keer zo hoog is als de aantoonbaarheidsgrens van de stof in water voor de gebruikte analysemethode.

De hoogste testconcentratie kan ook worden bepaald door de acute 96h-LC₅₀ te delen door een passende omzettingcoëfficiënt (de verhouding tussen de acuut letale en de chronisch letale concentratie, die voor diverse chemische stoffen kan variëren tussen ongeveer 3 en 100). Kies zo mogelijk de andere concentratie(s) zo dat zij een factor 10 van elkaar verschillen. Indien dit in het licht van de andere criteria (“1% van LC₅₀” en “boven de analytische aantoonbaarheidsgrens”) niet mogelijk is, kan een kleinere meetkundige reden worden gekozen of kan het gebruik van een met ¹⁴C gemerkte teststof worden overwogen. Gebruik geen concentraties die hoger zijn dan die van de verzadigde oplossing.

Wanneer een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, mag de concentratie daarvan niet meer bedragen dan 0,1 ml per liter en dient deze dezelfde te zijn in alle testbakken. De bijdrage van agens en teststof samen aan het totale organische-koolstofgehalte in het water in de testbakken moet bekend zijn. Het gebruik van dergelijke agentia moet hoe dan ook tot elke prijs worden vermeden.

1.8.2.8 *Controles*

Naast de experimentele reeksen dient een controlegroep te worden behandeld met het verdunningswater of, in voorkomend geval, met dat water en het oplosbaarheidsbevorderend agens, voorzover vaststaat dat dat agens geen effect heeft op de vissen. Zoniet zijn beide controlebehandelingen noodzakelijk.

1.8.3 **Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit**

In de loop van de test moeten het gehalte aan opgeloste zuurstof, TOC, pH en temperatuur in alle bakken worden gemeten. De totale hardheid en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in een bak met de hoogste teststofconcentratie. De zuurstofconcentratie en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten ten minste drie keer worden gemeten tijdens de opnamefase - aan het begin, omstreeks het midden en aan het einde van die fase - en vervolgens om de week gedurende de depuratiefase. De TOC moet worden bepaald bij het begin van de opnamefase (24 uur en 48 uur vóór de vissen in de bakken worden geïntroduceerd) en vervolgens ten minste wekelijks, zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten, de pH aan het begin en aan het einde van elke periode en de hardheid eenmaal in de loop van de test. Het is wenselijk de temperatuur in ten minste één bak continu te registreren.

1.8.4 **Bemonstering en analyse van de vissen en het water**

1.8.4.1 *Bemonsteringsschema voor vissen en water*

Met het oog op de bepaling van de teststofconcentratie wordt het water in de testbakken bemonsterd vóór de vissen worden geïntroduceerd en voorts zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. Het water moet ten minste even vaak als en tegelijk met de vissen worden bemonsterd, en wel vóór de voeding. Gedurende de opnamefase wordt de concentratie van de teststof bepaald om te controleren of aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De vissen worden ten minste vijfmaal in de loop van de opnamefase en ten minste viermaal in de loop van de depuratiefase bemonsterd. Omdat het in bepaalde gevallen moeilijk is op basis van dit aantal monsters een voldoende precieze schatting van de BCF-waarde te berekenen, met name wanneer er aanwijzingen bestaan dat een andere dan een simpele eerste-ordede puratiekinetiek wordt gevolgd, is het raadzaam gedurende beide periodes een hogere bemonsteringsfrequentie aan te houden (zie aanhangsel 4). De extra monsters worden bewaard en worden slechts geanalyseerd indien de resultaten van de eerste reeks analyses niet blijken te volstaan om de BCF met de gewenste precisie te berekenen.

Aanhangsel 4 bevat een voorbeeld van een goed bemonsteringsschema. Uitgaande van andere hypothetische P_{ow}-waarden ter bepaling van de blootstellingstijd die nodig is voor 95% opname, kunnen probleemloos andere bemonsteringsschema's worden doorgerekend.

De bemonstering wordt tijdens de opnamefase voortgezet. Die fase duurt 28 dagen, tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand is bereikt, wordt de bemonstering gedurende 60 dagen voortgezet tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Voor de start van de depuratiefase worden de vissen naar schone bakken overgebracht.

1.8.4.2 *Monsterneming en toebereiding van de monsters*

De te analyseren watermonsters worden bijvoorbeeld verkregen door afheveling uit het midden van de testbak met behulp van een slang uit inert materiaal. Aangezien kennelijk noch filtratie, noch centrifugatie in alle omstandigheden een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garanderen (met name niet voor superlipofiele stoffen, d.w.z. stoffen met een log P_{ow}>5) (1) (5), dienen deze bewerkingen niet op de monsters te worden toegepast.

In plaats daarvan moeten maatregelen worden getroffen om de bakken zo schoon mogelijk te houden en moet het TOC-gehalte zowel gedurende de opnamefase als gedurende de deparatiefase bestendig worden gecontroleerd.

Bij iedere bemonstering wordt een adequaat aantal vissen (meestal ten minste 4) uit de testbakken verwijderd, kortstondig met water gespoeld, door afbetten "gedroogd", onverwijld op de meest geschikte en humane manier gedood en gewogen.

Het verdient de voorkeur de vissen en het water onmiddellijk na de monsterneming te analyseren om afbraakprocessen en andere verliezen te vermijden. Bovendien kunnen op deze wijze naar gelang de test vordert een benaderde opname- en deparatiesnelheid worden berekend. Indien de analyse meteen wordt uitgevoerd, wordt ook vermeden dat te veel tijd voorbijgaat alvorens het bereiken van het plateau wordt geconstateerd.

Indien de analyse niet onmiddellijk wordt uitgevoerd, worden de monsters in geschikte omstandigheden opgeslagen. In dit geval moeten, vooraleer de studie wordt aangevat, gegevens worden vergaard over de geschikte wijze van bewaring voor de teststof in kwestie - bijvoorbeeld diepvriezen of bewaren bij 4°C, duur van de opslag, wijze van extractie, enz..

1.8.4.3 *Kwaliteit van de analysemethode*

Aangezien de nauwkeurigheid, de precisie en de gevoeligheid van de analysemethode ten aanzien van de teststof bepalend zijn voor de kwaliteit van de hele procedure, moet experimenteel worden gecontroleerd of de precisie en de reproduceerbaarheid van de chemische analyse alsmede de terugvinding van de teststof in de water- en vismonsters bevredigend zijn voor de gekozen methode. Vergewis u eveneens van het feit dat geen teststof aantoonbaar is in het verdunningswater.

Zo nodig worden de bij de test gemeten C_w - en C_f -waarden gecorrigeerd aan de hand van de terugvinding en de nuleffectmetingen bij de controlegroep(en). De vis- en watermonsters worden consequent behandeld op zodanige wijze dat contaminatie en verliezen (bijvoorbeeld als gevolg van adsorptie aan de bemonsteringsapparatuur) zoveel mogelijk wordt vermeden.

1.8.4.4 *Analyse van de vismonsters*

Indien in de test radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, kan hetzij de totale hoeveelheid radioactiviteit (d.w.z. in de oorspronkelijke stof én de metabolieten daarvan) worden gedoseerd, hetzij een zuivering worden uitgevoerd waardoor de oorspronkelijke stof afzonderlijk kan worden geanalyseerd. Ook kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd wanneer de stationaire toestand is bereikt c.q. aan het einde van de opnamefase (al naar gelang wat zich het eerste voordoet). Indien de BCF, gemeten op basis van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen, $\geq 1000\%$ is, is het raadzaam - en voor bepaalde categorieën chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen ten stelligste aan te bevelen - de afbraakproducten die in de stationaire toestand $\geq 10\%$ van de totale hoeveelheid residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, te identificeren en te kwantificeren. Indien de afbraakproducten die 10% of meer van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, worden geïdentificeerd en gekwantificeerd, verdient het aanbeveling de afbraakproducten in de geanalyseerde watermonsters op dezelfde wijze uit te splitsen.

De concentratie van de teststof dient normaliter voor iedere gewogen vis afzonderlijk te worden bepaald. Als zulks niet mogelijk is, mogen de gelijktijdig genomen vismonsters worden samengevoegd, maar een dergelijke samenvoeging houdt restricties in voor de statistische procedures die op de gegevens kunnen worden toegepast. Indien het belangrijk is dat een specifieke statistische procedure kan worden toegepast of een bepaald statistisch onderscheidingsvermogen wordt gehaald, moet de test, rekening houdend met die samenvoegingsprocedure en dat onderscheidingsvermogen, met een adequaat aantal proefdieren worden uitgevoerd (6) (7).

De BCF moet worden berekend in relatie tot het totale versgewicht en, voor zeer lipofiele stoffen, ook in relatie tot de vetfractie. Het vetgehalte van de vissen wordt zo mogelijk bij iedere bemonstering bepaald. Voor de bepaling van het vetgehalte moeten passende methoden worden gebruikt (ref. 8 en ref. 2 van aanhangsel 3). De chloroform/methanol-extractietechniek kan als standaardmethode worden aanbevolen (9). De verschillende methoden geven verschillende resultaten (10); derhalve is het van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt. De bepaling van het vet moet, als het kan, worden uitgevoerd op hetzelfde extract dat voor de bepaling van de teststof wordt gebruikt - de vetten moeten immers meestal toch worden verwijderd alvorens het extract chromatografisch kan worden geanalyseerd. Het vetgehalte van de vissen (in mg per kg versgewicht) behoort aan het einde van het experiment niet meer dan 25% meer of minder te bedragen dan bij het begin. Het droge-stofgehalte van het weefsel (in %) moet ook worden gerapporteerd met het oog op een mogelijke omrekening van het vetgehalte in termen van vers- respectievelijk drooggewicht.

2. GEGEVENS

2.1 VERWERKING VAN DE RESULTATEN

De opnamecurve van de teststof wordt verkregen door de concentratie in/op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) in de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een lineair coördinatenstelsel. Als de curve een plateau bereikt, d.w.z. asymptotisch evenwijdig gaat lopen met de tijd, wordt BCF_{ss} berekend als:

$$\frac{C_f \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}{C_w \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}$$

Als geen stationaire situatie wordt bereikt, kan niettemin BCF_{ss} met een voor de risico-evaluatie afdoende precisie worden berekend uit een benaderde "stationaire toestand" bij 80% ($1,6/k_2$) of 95% ($3,0/k_2$) van de evenwichtswaarde.

De kinetische concentratiefactor BCF_K wordt berekend als de verhouding k_1/k_2 van de twee eerste-ordensnelheidsconstanten. De depuratiesnelheidsconstante (k_2) wordt meestal bepaald op de depuratiecurve, dit is de grafiek van de afname van de teststofconcentratie in de vissen in de loop van de tijd. De opnamesnelheidsconstante (k_1) wordt dan berekend uit k_2 en een waarde voor C_f die wordt gehaald uit de opnamecurve (zie ook aanhangsel 5). Het verdient de voorkeur BCF_K en de snelheidsconstanten k_1 en k_2 te berekenen met behulp van een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechniek (11). Is dit onmogelijk, dan kunnen k_1 en k_2 grafisch worden bepaald. Indien de depuratiecurve duidelijk geen eerste-ordekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 3) en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststofoplossingen in de buurt liggen van de analytische aantoonbaarheidsgrens.

Bioconcentratiegegevens van goede kwaliteit resulteren in scherp afgetekende opname- en eliminatiecurven. Het verschil tussen de waarden voor de opname- resp. de depuratieconstante als bepaald voor de twee testconcentraties behoort niet meer te bedragen dan 20%. Indien tussen de gemeten waarden van de opname- c.q. de depuratiesnelheidsconstante voor de twee gebruikte testconcentraties een significant verschil bestaat, moet dit worden genoteerd en moeten mogelijke verklaringen worden gesuggereerd. Bij goed opgezette studies is het betrouwbaarheidsinterval voor de BCF in het algemeen niet veel ruimer dan [puntschatting \pm 20%].

3. RAPPORTAGE

In het verslag over de test moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

3.1 TESTSTOF:

- voorkomen en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische karakteristieken (eventueel met inbegrip van het organische-koolstofgehalte);
- indien radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, de precieze positie van het radioactieve atoom (de radio-actieve atomen) en het percentage van de radioactiviteit dat met onzuiverheden is geassocieerd;

3.2 PROEFDIERSOORT:

- wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, grootte-interval, enz..

3.3 PROEFOMSTANDIGHEDEN:

- gebruikte testprocedure (bijvoorbeeld doorstroomsysteem of semi-statisch systeem);
- aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en lichtregime (L:D);

- proefopzet (bijvoorbeeld aantal en grootte van de testbakken, verversingssnelheid van het water, aantal replicaties, aantal vissen per replicatie, aantal testconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase, frequentie van de bemonstering van vissen en water);

- wijze waarop de stockoplossingen worden bereid en vervangingsfrequentie (indien een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, moeten de aard, de concentratie en de bijdrage daarvan tot het organische-koolstofgehalte van het water in de testbakken worden vermeld);

- de nominale testconcentraties, de gemiddelden en standaardafwijkingen van de desbetreffende in de testbakken gemeten waarden en de methode waarmee zij zijn bepaald;

- de oorsprong van het verdunningswater, een beschrijving van de eventuele voorafgaande behandeling daarvan, de resultaten van eventuele proeven betreffende het vermogen van de proefdieren om in datwater te overleven en de kenmerken van dat water: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien bepaald), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) en zwevende deeltjes, zoutgehalte van het proefmedium (voor zover relevant) alsmede de resultaten van eventuele andere bepalingen;

- waterkwaliteit in de testbakken, pH, hardheid, TOC, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;

- nadere gegevens over het voer (bijvoorbeeld aard, herkomst,

samenstelling - zo mogelijk ten minste het vet- en het eiwitgehalte - ,

voederfrequentie en -hoeveelheid);

- gegevens over de behandeling van de vis- en watermonsters, met inbegrip van bijzonderheden over de voorbereiding, de opslag, de extractie en de procedures (met inbegrip van de precisie daarvan) voor de analytische bepaling van de teststof en, in voorkomend geval, het vetgehalte.

3.4 RESULTATEN:

- resultaten van eventuele voorbereidende experimenten;

- sterfte van de vissen in de controlegroep(en) en de vissen in iedere proefbak, alsmede eventuele waarnemingen van abnormaal gedrag;

- het vetgehalte van de vissen (indien dit ter gelegenheid van de bemonstering werd bepaald);

- grafieken van het verloop van de opname (inclusief het bereiken van de stationaire toestand) en de depuratie van de teststof door de vissen (met een weergave van alle meetwaarden);

- C_f en C_w (met standaardafwijking en, desgewenst, bereik) voor ieder bemonsteringstijdstip. C_f wordt uitgedrukt in μg per gram versgewicht (ppm) van het lichaam als geheel of van bepaalde weefsels, bijvoorbeeld het vetweefsel, en C_w in μg per ml (ppm). De C_w -waarden voor de controlegroepen en de nuleffectmetingen dienen eveneens te worden gerapporteerd;

- de bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{ss}) en/of de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) alsmede, in voorkomend geval, de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen voor de opname- en de depuratie- (eliminatie-) snelheidsconstante, alle berekend in relatie tot het totale lichaamsgewicht c.q. de totale vetfractie (in voorkomend geval) van het dier of van nader omschreven weefsels. Voor iedere beproefde concentratie van de teststof moeten de gemiddelden, betrouwbaarheidsintervallen en standaardafwijkingen (voor zover bekend) worden gerapporteerd. Geef aan welke gegevensverwerkings- en rekenmethoden werden gebruikt;

- indien radioactief gemerkt materiaal werd gebruikt en voor zover daartoe aanleiding bestaat: gegevens over de eventuele accumulatie van metabolieten;
- alle ongewone verschijnselen die zich in de loop van de test hebben voorgedaan, alle afwijkingen van voornoemde procedures en alle andere relevante gegevens.

Aangezien metingen die resulteren in de conclusie “niet aantoonbaar bij de gegeven aantoonbaarheidsgrens” onbruikbaar zijn voor het berekenen van de snelheidsconstanten, moet door aanpassingen van de proefopzet in het licht van de gegevens van voorbereidende experimenten dat type uitkomst zoveel mogelijk worden vermeden.

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

AANHANGSEL 1

CHEMISCHE KARAKTERISTIEKEN VAN AANVAARDBAAR VERDUNNINGSWATER

	STOF	DREMPEL- CONCENTRATIE
1	Deeltjes	5 mg/l
2	Totaal organische koolstof	2 mg/l
3	Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
4	Residueel chloor	10 µg/l
5	Totaal organofosfor-pesticiden	50 ng/l
6	Totaal organochloor-pesticiden plus polychloorbifenylen	50 ng/l
7	Totaal organische chloorverbindingen	25 ng/l
8	Aluminium	1µg/l
9	Arseen	1µg/l
10	Chroom	1µg/l
11	Kobalt	1µg/l
12	Koper	1µg/l
13	IJzer	1µg/l
14	Lood	1µg/l
15	Nikkel	1µg/l
16	Zink	1µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Kwik	100 ng/l
19	Zilver	100 ng/l

AANHANGSEL 2

VOOR DE TESTS GESCHIKTE VISSOORTEN

	Aanbevolen soort	Aanbevolen temperatuur bereik (°C)	Aanbevolen grootteklasse (totale lichaamslengte in cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) "Fathead minnow"	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karper	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck et Schlegel) Japans rijstvisje	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) "Bluegill" - zonnebaars	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regenboogforel	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Driedoornige stekelbaars	18 - 20	3,0 ± 1,0

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

In diverse landen zijn ook verschillende estuariene en mariene soorten gebruikt, bijvoorbeeld;

<i>Leiostomus xanthurus</i>	(Puntombervis)
<i>Cyprinodon variegatus</i>	(Edelsteentandkarper)
<i>Menidia beryllina</i>	("Silverside")
<i>Cymatogaster aggregata</i>	("Shiner perch")
<i>Parophrys vetulus</i>	("English sole")
<i>Leptocottus armatus</i>	("Staghorn sculpin")
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	(Driedoornige stekelbaars)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	(Zeebaars)
<i>Alburnus alburnus</i>	(Alver)

HERKOMST

De in de tabel genoemde zoetwatervissen zijn gemakkelijk te kweken en/of het hele jaar door vlot verkrijgbaar; de beschikbaarheid van de mariene en estuariene soorten verschilt van land tot land. De genoemde soorten kunnen in viskwekerijen of in het laboratorium vrij van ziekten en parasieten worden opgekweekt en tot voortplanting gebracht, zodat voor de test gezonde dieren van bekende afstamming kunnen worden gebruikt. Dergelijke vissen zijn in vele delen van de wereld verkrijgbaar.

AANHANGSEL 3

VOORSPELLING VAN DE DUUR VAN DE OPNAME- EN DE DEPURATIEFASE

1. Voorspelling van de duur van de opnamefase

Alvorens de test wordt uitgevoerd, kan een schatting van k_2 en derhalve van de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken, worden verkregen uit het empirisch verband dat is aangetoond tussen k_2 en de n-octanol-water-partitiecoëfficiënt (P_{ow}) en tussen k_2 en de oplosbaarheid in water (s).

Een schatting van k_2 (dag^{-1}) kan bijvoorbeeld worden verkregen uit het volgende empirisch verband (1):

$$\log_{10} k_2 = -0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47 \quad (r^2=0.95) \quad [\text{vergelijking 1}]$$

Voor andere verbanden, zie ref. (2).

Indien de waarde van de partitiecoëfficiënt (P_{ow}) niet bekend is, kan een schatting worden verkregen (3) uit de oplosbaarheid van de stof in water (s), aan de hand van:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710 \quad (r^2 = 0.994) \quad [\text{vergelijking 2}]$$

waarin s = oplosbaarheid (mol/l) : (n=36)

Deze verbanden zijn alleen geldig voor stoffen waarvoor de waarde van $\log P_{ow}$ ligt tussen 2 en 6,5 (4).

De tijd die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken, kan worden geraamd met behulp van de schatting van k_2 en de algemene vergelijking die de opname- en depuratie-kinetiek beschrijft (eerste-ordekinetiek):

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

of, indien C_w constant is:

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

Bij het naderen van de stationaire toestand ($t \rightarrow \infty$), kan vergelijking 3 worden vereenvoudigd (5) (6) tot:

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

De grootte $(k_1 / k_2) \cdot C_w$ is dan een benadering van de concentratie van de stof in de vissen in de stationaire toestand ($C_{f,s}$)

Vergelijking 3 kan dan worden herschreven als:

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

Door toepassing van vergelijking 4 kan de tijd worden geschat die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken, voorzover een voorlopige schatting van k_2 op basis van vergelijking 1 of vergelijking 2 beschikbaar is.

Als vuistregel geldt dat de optimale duur van de opnamefase voor het verkrijgen van statistisch aanvaardbare gegevens wat betreft BCF_K , overeenstemt met de tijd die nodig is opdat de concentratie van de teststof in de vissen, uitgezet tegen de niet-getransformeerde tijd, ten minste het middelpunt $1.6/k_2$ bereikt, oftewel 80% van de stationaire concentratie, maar niet meer dan $3.0/k_2$ of 95% van de stationaire concentratie.

De tijd die nodig is om 80% van de stationaire concentratie te bereiken, bedraagt (vergelijking 4):

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{of} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{vergelijking 5}]$$

Op dezelfde wijze kan worden berekend dat 95% van de stationaire concentratie wordt bereikt na:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad [\text{vergelijking 6}]$$

Bijvoorbeeld bedraagt de duur van de opnamefase (t_{op}) voor een teststof met $\log P_{ow} = 4$ bij benadering (op basis van de vergelijkingen 1,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (4) + 1.47 & k_2 &= 0.652 \text{ d}^{-1} \\ t_{op} = t_{80} &= 1.6/0.652, \text{ d.w.z. } 2.45 \text{ d (59 h)} \\ \text{of} \quad t_{op} = t_{95} &= 3.0/0.652, \text{ d.w.z. } 4.60 \text{ d (110 h)} \end{aligned}$$

Op analoge wijze kan voor een teststof waarvoor $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = -5.0$), de duur van de opnamefase met behulp van vergelijkingen 1,2,5,6 als volgt worden berekend:

$$\begin{aligned} \log_{10}(P_{ow}) &= -0.862(-5.0) + 0.710 = 5.02 \\ \log_{10} k_2 &= -0.414(5.02) + 1.47 \\ k_2 &= 0.246 \text{ d}^{-1} \\ t_{op} = t_{80} &= 1.6/0.246, \text{ d.w.z. } 6.5 \text{ d (156 h)} \\ \text{of} \quad t_{op} = t_{95} &= 3.0/0.246, \text{ d.w.z. } 12.2 \text{ d (293 h)} \end{aligned}$$

Als alternatief kan de uitdrukking :

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31 \text{ h}$$

worden gebruikt om de tijd te berekenen die nodig is voor het daadwerkelijk bereiken van de stationaire situatie (4).

2. Voorspelling van de duur van de deparatiefase

Een schatting van de tijd die nodig is om de lichaamsconcentratie van een stof tot een bepaald percentage van de aanvankelijke concentratie terug te brengen, kan eveneens worden verkregen aan de hand van de algemene vergelijking van de opname- en deparatiekinetiek (eerste-ordekinetiek) (1) (8).

Voor de deparatiefase wordt C_w gelijkgesteld aan 0. De vergelijking wordt dan gereduceerd tot:

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

waarin $C_{f,o}$ de concentratie is bij het begin van deparatiefase. Vijftig procent deparatie wordt verkregen na t_{50} , die als volgt wordt berekend:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{of} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

Zo ook wordt 95% deparatie bereikt na

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

Als de opnamefase wordt afgesloten wanneer 80% van de stationaire concentratie is bereikt ($1.6/k_2$) en de deparatiefase wanneer de eliminatie 95% belooft ($3.0/k_2$), bedraagt de duur van de deparatiefase ongeveer het dubbele van de duur van de opnamefase.

Het is belangrijk hierbij op te merken dat al deze schattingen gebaseerd zijn op de onderstelling dat het opname- en het depuratieproces kunnen worden beschreven door een eerste-ordekinetiek. Als duidelijk is dat een eerste-ordekinetiek niet van toepassing is, dienen complexere modellen te worden gebruikt (zie bijvoorbeeld ref. (1)).

LITERATUUR (ad Aanhangsel 3)

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

AANHANGSEL 4

THEORETISCH VOORBEELD VAN EEN BEMONSTERINGSSCHEMA VOOR EEN

BIOCONCENTRATIE TEST MET EEN STOF WAARVOOR $\log P_{ow} = 4$.

Bemonstering vissen	Bemongsteringsschema		Aantal watermonsters	Aantal vissen per monster
	Minimale bemonstering: tijdstip (in dagen)	Extra monsternemingen		
Opnamefase	-1 0		2* 2	Introductie van 45-80 vissen
1e	0,3	0,4	2 (2)	
2e	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3e	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4e	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5e	4,7		2	6
Depuratiefase				Vissen overbrengen naar water zonder de teststof
6e	5,0	5,3		4 (4)
7e	5,9	7,0		4 (4)
8e	9,3	11,2		4 (4)
9e	14,0	17,5		6 (4)

* Bemonster het water nadat ten minste reeds drie bakvolumes zijn doorgestroomd.

De cijfers tussen haakjes zijn de aantallen extra monsters (van het water en de vissen) die worden genomen ingeval voor een aanvullende bemonstering werd geopteerd.

N.B: De preliminaire, aan de test voorafgaande schatting van k_2 op basis van $\log P_{ow} = 4.0$ bedraagt 0.652 dag^{-1} . De totale duur van het experiment wordt gelijkgesteld aan

$3 \times t_{op} = 3 \times 4.6$ dagen, d.w.z. 14 dagen. Voor de schatting van " t_{op} ", zie aanhangsel 3.

AANHANGSEL 5

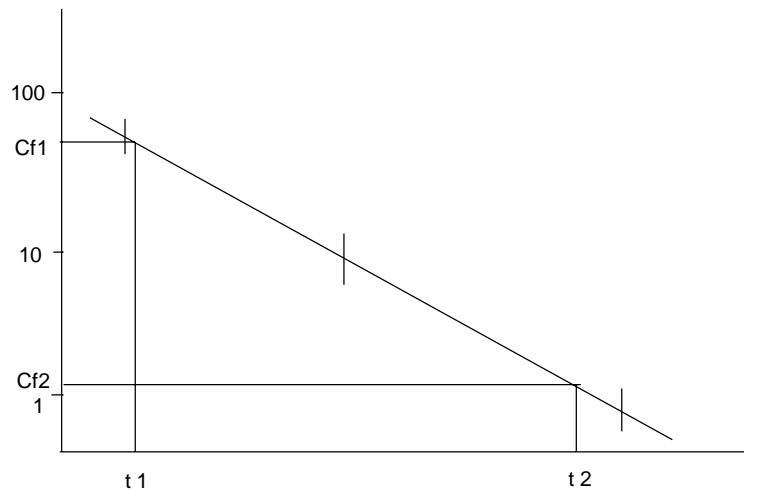
KEUZE VAN EEN MODEL

Er is van uitgegaan dat de meeste bioconcentratieprocessen op een “acceptabele” manier worden beschreven door een simpel twee-compartment/twee-parametermodel, wat zich vertaalt in een lineair verband wanneer de concentratie van de stof in de vissen tijdens de depuratiefase op semi-logaritmisch papier tegen de tijd wordt uitgezet. Wanneer de trend in de desbetreffende gegevens niet door een rechte kan worden beschreven, dient een complexer model te worden gebruikt. Zie daarvoor bijvoorbeeld de publicatie van Spacie en Hamelink (ref. 1 in aanhangsel 3).

GRAFISCHE METHODE VOOR DE BEPALING VAN DE DEPURATIE- (ELIMINATIE-) SNELHEIDSCONSTANTE k_2

Zet de concentratie van de teststof in ieder vismonster op semi-logaritmisch papier uit tegen het bemonsteringsstijdstip. De richtingscoëfficiënt van de trendlijn is $-k_2$.

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



Hou er rekening mee dat afwijkingen van een lineair verband tussen $\log C_f$ en t een aanwijzing kunnen vormen voor een complex depuratiepatroon dat niet door een eerste-ordekinetiek kan worden beschreven. Om depuratiepatronen door te rekenen die niet door een eerste-ordekinetiek worden gekenmerkt, kunnen eveneens grafische methoden worden gebruikt.

GRAFISCHE METHODE VOOR DE BEPALING VAN DE OPNAMESNELHEIDSCONSTANTE k_1

Als k_2 bekend is, kan k_1 als volgt worden berekend:

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

De waarde van C_f wordt afgelezen op de helft van de hoogte van de geëffende opnamecurve die wordt verkregen wanneer de concentratie van de stof in de vissen (op logaritmische schaal) wordt uitgezet tegen de tijd (op lineaire schaal).

COMPUTERMETHODE VOOR DE BEREKENING VAN DE OPNAME- EN DE DEPURATIE- (ELIMINATIE-) SNELHEIDSCONSTANTE

Voor de berekening van de bioconcentratiefactor en de snelheidsconstanten k_1 en k_2 verdient het de voorkeur gebruik te maken van gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechnieken. Deze programma's berekenen een waarde voor k_1 en k_2 op basis van de aan de tijd gerelateerde concentratiegegevens en het model:

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

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

waarin t_c = het moment waarop de opnamefase wordt afgebroken.

Met deze techniek wordt ook een schatting van de standaardafwijking van k_1 en k_2 verkregen.

Aangezien k_2 in de meeste gevallen met een vrij grote precisie uit de depuratiecurve kan worden geschat, en aangezien er tussen de parameters k_1 en k_2 een sterke correlatie bestaat als zij gelijktijdig worden geschat, kan het wenselijk zijn eerst, en uitsluitend aan de hand van de depuratiegegevens, k_2 te berekenen en vervolgens k_1 uit de opnamegegevens te schatten door middel van niet-lineaire regressie.

C.14. GROEITEST ONVOLWASSEN VISSEN

1. METHODE

Deze groei-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 215 (2000).

1.1 INLEIDING

Het doel van deze test is het beoordelen van de effecten van een langdurige blootstelling aan chemische stoffen op de groei van onvolwassen vissen. De test is gebaseerd op een methode, die binnen de Europese Unie is ontwikkeld en getest met de rondzendproef (1)(2), voor het beoordelen van de effecten van chemische stoffen op de groei van onvolwassen regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) in een doorstroomprocedure. Voor deze test mogen ook andere goed gedocumenteerde vissoorten worden gebruikt. In het verleden zijn bijvoorbeeld al eens groeitests uitgevoerd met zebrafissen (*Danio rerio*)¹ (3)(4) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Zie ook Algemene inleiding, deel C.

1.2 DEFINITIES

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ($p < 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

No Observed Effect Concentration (NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC.

EC_x: bij deze testmethode de concentratie van de teststof die x % variatie in de groeisnelheid van de vissen veroorzaakt vergeleken met de controlegroepen.

Densiteit: het natte gewicht van de vissen per volume water.

Bezettingsgraad: het aantal vissen per volume water.

Specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen: de groeisnelheid van één afzonderlijke vis met als uitgangspunt het begingewicht.

Gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak: de gemiddelde groeisnelheid van een bakpopulatie bij een bepaalde concentratie.

Pseudo-specifieke groeisnelheid: de afzonderlijke groeisnelheid van de vissen vergeleken met het gemiddelde begingewicht van de bakpopulatie.

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

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Onvolwassen vissen in exponentiële groeifasen worden, nadat ze zijn gewogen, in testkamers geplaatst en blootgesteld aan een reeks subletale concentraties van de teststof die is opgelost in water. Hierbij moet bij voorkeur de doorstroomprocedure worden gebruikt. Als dit niet mogelijk is, moet een geschikte semi-statische procedure (statisch-verversing) worden gebruikt. De test duurt 28 dagen. De vissen worden dagelijks gevoerd. Het voedselrantsoen is afhankelijk van het begingewicht van de vissen en kan indien gewenst na 14 dagen opnieuw worden berekend. Na afloop van de test worden de vissen opnieuw gewogen. De effecten op de groeisnelheid worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden geraamd welke concentratie x % variatie in de groeisnelheid kan veroorzaken, d.w.z. EC_x (bijvoorbeeld EC_{10} , EC_{20} of EC_{30}). De gegevens kunnen ook worden vergeleken met de controlewaarden, zodat de LOEC en NOEC kunnen worden bepaald.

1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C. 1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. Dit betekent dat de oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof bekend moeten zijn en dat er een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar is voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

Nuttige gegevens over de teststof zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in water en licht, pK_a , P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C. 4).

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

- het sterftecijfer in de controlegroep(en) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 10 %;
- het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroep(en) moet zodanig zijn toegenomen dat de minimumvariatie in groeisnelheid die als significant wordt beschouwd, kan worden gedetecteerd. Een rondzendproef (2) heeft aangetoond dat bij regenboogforel het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroepen binnen 28 dagen met minimaal de helft (d.w.z. 50 %) van hun gemiddelde begingewicht moet zijn toegenomen. Bijvoorbeeld: begingewicht 1 g/vis (= 100 %), eindgewicht na 28 dagen: $\geq 1,5$ g/vis (≥ 150 %);
- het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test minimaal 60 % van de verzadigingswaarde van lucht zijn geweest;
- het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan $\pm 1^\circ\text{C}$. Tevens mag de watertemperatuur niet meer dan 2°C hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 1).

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 Apparatuur

Standaard-laboratoriumapparatuur, met name:

- a) zuurstof- en pH-meters;
- b) apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;
- c) geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;
- d) bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad (zie punt 1.8.5 en aanhangsel 1);
- e) weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op $\pm 0,5$ %).

1.6.2 Water

Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de test moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 en 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen. De aanbevolen hardheid is 140 mg/l (CaCO_3) of hoger. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof), moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en SO_4), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar. In aanhangsel 2 worden enkele chemische kenmerken van geschikt verdunningswater genoemd.

1.6.3 Testoplossingen

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt.

Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de groei en geen zichtbaar negatief effect hebben op de onvolwassen vissen, hetgeen blijkt uit de controlegroep met uitsluitend oplosmiddel.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Met een rondzendproef (2) is aangetoond dat, bij regenboogforel, een verversingsfrequentie tijdens de test van 6 liter/g vis per dag acceptabel is (zie punt 1.8.2.2).

Bij semi-statische (verversings)tests hangt de verversingsfrequentie af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80-120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest.

1.6.4 **Keuze van de vissoort**

Voor deze test wordt de regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) aanbevolen omdat hiermee met de rondzendproef de meeste ervaring is opgedaan (1)(2). Andere goed gedocumenteerde vissoorten mogen ook worden gebruikt, maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. In het verleden is bijvoorbeeld ook ervaring opgedaan met zebrafissen (*Danio rerio*) (3)(4) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

1.6.5 **Leefomstandigheden van de vis**

De testvissen worden geselecteerd uit een populatie van één stam, bij voorkeur van hetzelfde broedsel, dat bij het begin van de test minimaal twee weken oud is en in leven gehouden is onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test. Voor de gehele duur van hun verblijf en van de test moeten ze per dag een rantsoen van minimaal 2 % en bij voorkeur 4 % van hun lichaamsgewicht toegediend krijgen.

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt het sterftcijfer geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

- sterftcijfer van meer dan 10 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij afkeuren;
- sterftcijfer tussen 5 % en 10 % van de populatie: zeven dagen extra voor de aanpassing; als het sterftcijfer gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, de gehele partij afkeuren;
- sterftcijfer van minder dan 5 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij accepteren.

De vissen mogen in de twee weken voorafgaande aan de test of tijdens de test niet worden behandeld voor ziekten.

1.7 TESTOPZET

De 'testopzet' heeft betrekking op het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal bakken per concentratieniveau en het aantal vissen per bak. Idealiter moet bij de keuze van de testopzet rekening worden gehouden met:

- a) het doel van het onderzoek;
- b) de methode van statistische analyse die wordt toegepast;
- c) de beschikbaarheid en kosten van experimentele middelen.

De omschrijving van het doel van het onderzoek moet, indien mogelijk, de statistische power specificeren waarbij een bepaald verschil (bijvoorbeeld in groeisnelheid) moet worden gedetecteerd, of de nauwkeurigheid specificeren waarmee de EC_x (bijvoorbeeld met $x = 10, 20$ of 30 , en bij voorkeur niet minder dan 10) moet worden geraamd. Zonder deze gegevens kan geen goede omschrijving worden gegeven van de omvang van het onderzoek.

Het is belangrijk om te onderkennen dat een opzet die optimaal is (optimaal gebruik van de middelen) voor toepassing bij één methode voor statistische analyse, niet per definitie ook optimaal is voor een andere. De aanbevolen opzet voor de raming van een LOEC/NOEC is daardoor niet dezelfde als de opzet die wordt aanbevolen voor regressieanalyse.

In de meeste gevallen verdient regressieanalyse de voorkeur boven de variantieanalyse. De redenen daarvoor worden uiteengezet door Stephan en Rogers (8). Als er echter geen geschikt regressiemodel wordt gevonden ($r^2 < 0,9$), moet NOEC/LOEC worden gebruikt.

1.7.1 Opzet voor regressieanalyse

De belangrijke overwegingen bij het opzetten van een test die door middel van regressie wordt geanalyseerd, zijn:

- a) De effectconcentratie (bijvoorbeeld $EC_{10,20,30}$) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, moeten altijd begrepen zijn onder de concentraties die in de test worden gebruikt. De nauwkeurigheid waarmee de effectconcentraties kunnen worden geraamd, is optimaal wanneer de effectconcentratie zich in het midden bevindt van het bereik van geteste concentraties. Een voorbereidende test voor het vaststellen van het bereik kan nuttig zijn bij het selecteren van de juiste testconcentraties.
- b) Teneinde een goed statistisch model te verkrijgen, moet de test minimaal één bak met een controlegroep omvatten en vijf extra bakken met verschillende concentraties. Wanneer gebruik wordt gemaakt van een ontsluitingsmiddel, moet er naast de testreeks een controlegroep worden behandeld met de hoogste testconcentratie ontsluitingsmiddel (zie punt 1.8.3 en 1.8.4).
- c) Er mag worden gebruikgemaakt van een geschikte geometrische reeks of logaritmische reeks (9) (zie aanhangsel 3). De verdeling van de testconcentraties moet bij voorkeur logaritmisch zijn.
- d) Als er meer dan zes bakken beschikbaar zijn, moeten de extra bakken worden gebruikt als replicaatbakken of worden verdeeld over de reeks concentraties om zodoende een kleiner verschil tussen de niveaus te creëren. Beide mogelijkheden zijn even goed.

1.7.2 **Opzet voor de raming van een NOEC/LOEC met behulp van ANOVA (variantieanalyse)**

Het is wenselijk om voor elke concentratie een replicaatbak te hebben. De statistische analyse moet op bakniveau worden uitgevoerd (10). Zonder replicaatbakken kan, behalve met de variabiliteit die verband houdt met de afzonderlijke vissen, geen rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen de bakken. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (11) dat de variabiliteit tussen de bakken in een dergelijke test erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen). Als relatief aanvaardbaar alternatief kan de statistische analyse daarom op het niveau van de afzonderlijke vissen worden uitgevoerd.

Normaliter worden er minimaal vijf testconcentraties in een geometrische reeks met een factor van bij voorkeur ten hoogste 3,2 gebruikt.

Wanneer tests worden uitgevoerd met replicaatbakken, moet het aantal replicaatbakken voor controlegroepen en dus het aantal vissen over het algemeen het dubbele zijn van het aantal in elk van de testconcentraties, die van gelijke omvang moeten zijn (12)(13)(14). Als er geen replicaatbakken zijn, moet het aantal vissen in de controlegroep gelijk zijn aan dat in elke testconcentratie.

Als de ANOVA wordt gebaseerd op bakken in plaats van afzonderlijke vissen (wat zou betekenen dat elke vis afzonderlijk moet worden gemerkt of dat moet worden gebruikgemaakt van pseudo-specifieke groeisnelheden (zie punt 2.1.2)), moeten er voldoende replicaatbakken aanwezig zijn om de standaardafwijking van 'bakken met concentraties' te kunnen bepalen. Dit betekent dat de niveaus van fouttolerantie in de variantieanalyse minimaal 5 moeten zijn (10). Als er alleen replicaten worden gemaakt van de controlegroepen, bestaat het risico dat de foutvariabiliteit onzuiver is. Deze kan dan namelijk toenemen met de gemiddelde waarde van de groeisnelheid in kwestie. Omdat de groeisnelheid waarschijnlijk zal afnemen naarmate de concentratie hoger wordt, is het mogelijk dat de variabiliteit wordt overschat.

1.8 PROCEDURE

1.8.1 **Selectie en weging van de testvissen**

Het is belangrijk om de variatie in het gewicht van de vissen aan het begin van de test zoveel mogelijk te beperken. In aanhangsel 1 worden geschikte gewichtbereiken aangegeven voor de verschillende vissoorten die worden aanbevolen voor deze test. Voor de gehele partij vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht van de vissen aan het begin van de test idealiter binnen $\pm 10\%$, maar maximaal binnen 25% , van het rekenkundig gemiddelde blijft. Het verdient aanbeveling om voorafgaande aan de test een steekproef te nemen om het gemiddelde gewicht te bepalen.

De stampopulatie mag vanaf 24 uur voor het begin van de test niet worden gevoerd. De vissen moeten vervolgens willekeurig worden geselecteerd. De vissen krijgen een verdovingsmiddel toegediend (bijvoorbeeld een oplossing in water van 100 mg/l tricaine-methaansulfonaat (MS 222) geneutraliseerd met twee delen natriumbicarbonaat per deel MS 222) en worden afzonderlijk in natte toestand gewogen (drooggedept) zoals beschreven in aanhangsel 1. De vissen met een gewicht binnen het juiste bereik, moeten worden behouden en vervolgens willekeurig over de testbakken worden verdeeld. Het totale natte gewicht van alle vissen in een bak moet worden geregistreerd. Het gebruik van verdovingsmiddelen en het behandelen van de vissen (inclusief droogdeppen en wegen) kan stress en verwondingen veroorzaken bij de onvolwassen dieren, met name bij kleine soorten. Onvolwassen vissen moeten daarom uiterst voorzichtig worden behandeld om stress en verwondingen bij deze dieren te voorkomen.

Op dag 28 van de test worden de vissen opnieuw gewogen (zie punt 1.8.6). Als het echter noodzakelijk wordt geacht het rantsoen opnieuw te berekenen, mogen de vissen ook op dag 14 van de test opnieuw worden gewogen (zie punt 1.8.2.3). Er zijn ook andere methoden, zoals de fotografische methode, voor het vaststellen van veranderingen in de visgrootte aan de hand waarvan de rantsoenen kunnen worden aangepast.

1.8.2 **Blootstellingsomstandigheden**

1.8.2.1 *Duur*

De test duurt ≥ 28 dagen.

1.8.2.2 *Densiteit en bezettingsgraad*

Het is belangrijk dat de densiteit en bezettingsgraad worden afgestemd op de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 1). Als de bezettingsgraad te hoog is, zullen de vissen gestrest raken en daardoor minder hard groeien of zelfs ziek worden. Als de bezettingsgraad te laag is, kan territoriumgedrag ontstaan, dat de groei eveneens kan beïnvloeden. In elk geval moet de densiteit zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Een rondzendproef (2) heeft aangetoond dat bij regenboogforel een densiteit van 16 vissen van 3-5 g in een volume van 40 liter acceptabel is. De aanbevolen waterverversingsfrequentie tijdens de test is 6 liter/g vis per dag.

1.8.2.3 *Voeding*

De vissen moeten geschikt voedsel toegediend krijgen (aanhangel 1) in zodanige hoeveelheden dat een acceptabele groeisnelheid wordt bereikt. Bacteriegroei en troebelheid van het water moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Bij regenboogforel wordt waarschijnlijk aan deze voorwaarden voldaan als zij een rantsoen van 4 % van hun lichaamsgewicht per dag krijgen (2)(15)(16)(17). Het dagelijkse rantsoen kan worden verdeeld over twee gelijke porties met een tussenpoos van minimaal 5 uur. Het rantsoen is gebaseerd op het totale gewicht van de vissen in een testbak aan het begin van de test. Als de vissen op dag 14 opnieuw worden gewogen, moet het rantsoen opnieuw worden berekend. De vissen mogen vanaf 24 uur voordat ze worden gewogen, geen voedsel krijgen.

Niet gegeten voedsel en fecaal materiaal moeten dagelijks uit de testbakken worden verwijderd door de bodem van de bakken zorgvuldig schoon te maken met een zuiger.

1.8.2.4 *Licht en temperatuur*

De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangel 1).

1.8.3 **Testconcentraties**

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig, ongeacht de testopzet (zie punt 1.7.2). Eerder opgedane kennis over de toxiciteit van de teststof (bijvoorbeeld n.a.v. een acute test en/of onderzoeken voor het vaststellen van het bereik) helpt bij het kiezen van de juiste testconcentraties. Als minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. De hoogste geteste concentratie mag de oplosbaarheidsgrens van de teststof in water niet overschrijden.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van stamoplossingen, mag de uiteindelijke concentratie hiervan niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie bij voorkeur in alle bakken gelijk zijn (zie punt 1.6.3). Het gebruik van deze middelen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

1.8.4 **Controlegroepen**

Het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater hangt af van de testopzet (zie punten 1.7-1.7.2). Als er een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt, moet er een aantal controlegroepen met water waaraan een ontsluitingsmiddel is toegevoegd, worden opgenomen in de test. Dit aantal moet gelijk zijn aan het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater.

1.8.5 **Frequentie van de analytische bepalingen en metingen**

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten (zie hieronder).

Bij doorstroomtests moet de stroomsnelheid van het verdunningswater en de toxische stamoplossing regelmatig worden gecontroleerd, bij voorkeur dagelijks, en mag deze gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Als wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen $\pm 20\%$ van de nominale waarden blijft (d.w.z. binnen het interval van 80-120%; zie punt 1.6.2 en 1.6.3), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit aan het begin van de test en daarna eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen $\pm 20\%$ van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de teststof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Hierbij moet dezelfde procedure worden gevolgd als hierboven.

Bij semi-statische (verversings)tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen $\pm 20\%$ van de nominale waarden blijft, is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, bij het begin van de test en vervolgens eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen $\pm 20\%$ van de nominale concentratie blijft, moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd volgens dezelfde procedure als voor de stabielere stoffen.

Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen $\pm 20\%$ van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten waarden.

Monsters moeten mogelijk worden gefilterd (bijvoorbeeld met een $0,45\ \mu\text{m}$ poriëngrootte) of gecentrifugeerd. Centrifugatie verdient de voorkeur. Als het testmateriaal echter niet aan filters adsorbeert, is filtratie mogelijk een geschikt alternatief.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid, alkaliteit en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semi-statische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semi-statische (verversings) tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid en alkaliteit moeten per test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

1.8.6 Waarnemingen

Gewicht: Aan het eind van de test moet van alle overlevende vissen het natte gewicht (drooggedept) worden gewogen, hetzij per testbak of afzonderlijk. Het gezamenlijk wegen van alle vissen in een testbak verdient de voorkeur boven het afzonderlijk wegen van de vissen waarbij elke vis eerst moet worden gemerkt. Wanneer elke vis apart wordt gewogen om de specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen te kunnen bepalen, mag de toegepaste merkmethode geen stress veroorzaken bij de vissen (alternatieven voor koudmerken kunnen wenselijk zijn, bijvoorbeeld het gebruik van een fijne, gekleurde vislijn).

De vissen moeten gedurende de test dagelijks worden onderzocht. Als er een externe afwijking (zoals bloedingen of ontkleuring) of afwijkend gedrag wordt geconstateerd, moet dit worden genoteerd. Ook de sterfte moet worden geregistreerd en de dode vissen moeten zo snel mogelijk worden verwijderd. Dode vissen worden niet vervangen. Als de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad worden aangehouden, wordt namelijk voorkomen dat veranderingen in het aantal vissen per bak de groei beïnvloeden. Het rantsoen moet echter wel worden aangepast.

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1 BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het aantal vissen, enz. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

Als het sterftecijfer in een testbak hoger is dan 10 %, mag voor deze bak geen groeisnelheid worden berekend. Wel moet worden gerapporteerd wat het sterftecijfer per testconcentratie is.

Het belangrijkste concept van deze test is het bepalen van de specifieke groeisnelheid r tussen tijdstip t_1 en tijdstip t_2 , ongeacht de methode die wordt toegepast om de gegevens te analyseren. Deze snelheid kan op verschillende manieren worden gedefinieerd, afhankelijk van het feit of de vissen afzonderlijk gemarkeerd zijn dan wel of er een bakgemiddelde vereist is.

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

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

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

waarbij

r_1 = specifieke groeisnelheid van een afzonderlijke vis

r_2 = gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak

r_3 = pseudo-specifieke groeisnelheid

w_1, w_2 = gewicht van een bepaalde vis op het tijdstip t_1 respectievelijk t_2

$\log_e w_1$ = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het begin van de onderzoeksperiode

$\log_e w_2$ = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het eind van de onderzoeksperiode

$\overline{\log_e w_1}$ = gemiddelde van de logaritmen van de waarden w_1 voor de vissen in de bak aan het begin van de onderzoeksperiode

$\overline{\log_e w_2}$ = gemiddelde van de logaritmen van de waarden w_2 voor de vissen in de bak aan het eind van de onderzoeksperiode

t_1, t_2 = tijd (dag) bij het begin en eind van de onderzoeksperiode

r_1, r_2, r_3 kunnen voor de periode van dag 0-28 worden berekend en, indien van toepassing (d.w.z. als op dag 14 metingen zijn uitgevoerd), voor de periode van dag 0-14 en dag 14-28.

2.1.1 Analyse van de resultaten met de regressiemethode (concentratie-reactie-model)

Met deze analysemethode wordt een nuttig rekenkundig verband gelegd tussen de specifieke groeisnelheid en de concentratie, waardoor het mogelijk is de 'EC_x' te ramen, d.w.z. elke willekeurige EC-waarde. Deze analysemethode maakt de berekening van r voor afzonderlijke vissen (r_1) overbodig. In plaats daarvan kan de analyse worden gebaseerd op de gemiddelde waarde van r per bak (r_2). De voorkeur gaat uit naar de laatste methode, mede omdat deze geschikter is voor kleine vissoorten.

De gemiddelde specifieke groeisnelheden per bak (r_2) moeten grafisch worden uitgezet tegen de concentratie, zodat de concentratie-reactie-relatie tot uitdrukking komt.

Voor het uitdrukken van de relatie tussen r_2 en de concentratie moet een geschikt model worden gekozen. De keuze moet worden beargumenteerd.

Als elke bak een oneven aantal vissen bevat, moet de passingsprocedure, hetzij eenvoudig of niet-lineair, worden gewogen zodat rekening wordt gehouden met de oneven aantallen.

Met behulp van de passingsmethode voor het model moet een raming gemaakt kunnen worden van bijvoorbeeld de EC₂₀ en van de bijbehorende dispersie (hetzij standaardafwijking of betrouwbaarheidsinterval). De grafiek van het gepaste model moet worden weergegeven in relatie tot de gegevens zodat de mate waarin het model past, zichtbaar wordt (8)(18)(19)(20).

2.1.2 Analyse van de resultaten voor de raming van de LOEC

Als bij de test gebruik is gemaakt van replicaatbakken voor alle concentratieniveaus, kan de LOEC worden geraamd aan de hand van een variantieanalyse (ANOVA) van de gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak (zie punt 2.1), gevolgd door een geschikte methode (bijvoorbeeld de test van Dunnet of Williams (12)(13)(14)(21)) voor het vergelijken van de gemiddelde r voor elke concentratie met de gemiddelde r van de controlegroepen om de laagste concentratie vast te stellen waarbij dit verschil bij een waarschijnlijkheidsgrens van 0,05 significant is. Als niet wordt voldaan aan de vereiste voorwaarden voor parametermethoden - niet-normale verdeling (bijvoorbeeld de test van Shapiro-Wilk) of heterogene variantie (test van Barlett) - moet worden overwogen om de gegevens te transformeren om varianties te homogeniseren alvorens de ANOVA of een gewogen ANOVA uit te voeren.

Als bij de test niet voor elke concentratie een replicaatbak is gebruikt, zal een ANOVA gebaseerd op bakken ongevoelig of zelfs onmogelijk zijn. In dat geval kan er als tussenoplossing voor worden gekozen de ANOVA te baseren op de pseudo-specifieke groeisnelheid r_3 van afzonderlijke vissen.

De gemiddelde r_3 voor elke testconcentratie kan vervolgens worden vergeleken met de gemiddelde r_3 van de controlegroepen. Vervolgens kan de LOEC op dezelfde manier worden vastgesteld als hierboven is beschreven. Het is belangrijk dat wordt onderkend dat deze methode geen rekening houdt met, of bescherming biedt tegen, variabiliteit tussen de bakken, behalve die welke wordt veroorzaakt door de variabiliteit tussen de afzonderlijke vissen. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (8) dat de variabiliteit tussen de bakken erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen onderling). Als de vissen niet afzonderlijk worden geanalyseerd, moet de methode voor het vaststellen van de uitbijter worden vermeld samen met de reden waarom deze methode wordt gebruikt.

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectiegrens van de analysemethode, of, bij semi-statische tests, als de concentratie van de teststof afneemt in de periode na het bereiden van de oplossing en vóór het verversen.

2.3 TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.3.1 Teststof:

- fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken;
- chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de teststof.

2.3.2 **Diersoort:**

- wetenschappelijke naam, eventueel
- stam, grootte, leverancier, eventuele voorbehandelingen, enz.

2.3.3 **Testomstandigheden:**

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statisch/verversing, doorstroom, dichtheid, bezettingsgraad, enz.);
- testopzet (bijvoorbeeld het aantal testbakken, testconcentraties en replicaten, en het aantal vissen per bak);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moet de concentratie daarvan worden vermeld);
- de nominale testconcentraties, de gemiddelden van de in de testbakken gemeten waarden en de standaardafwijkingen, de methode waarmee zij zijn bepaald, en gegevens waaruit blijkt dat de resultaten van de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in de oplossing;
- kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, alkaliteit, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof, zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;
- waterkwaliteit in de testbakken: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;
- gedetailleerde gegevens over de voeding (bijvoorbeeld het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

2.3.4 **Resultaten:**

- gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan het validiteitscriterium voor overleving, en gegevens over de sterfte bij de verschillende testconcentraties;
- toegepaste technieken voor statistische analyse, statistieken gebaseerd op replicaten of vissen, verwerking van de gegevens en beweegredenen voor het gebruik van deze technieken;
- tabelgegevens over het afzonderlijke gewicht en het gemiddelde gewicht van de vissen op dag 0, 14 (indien gemeten) en 28, waarden met betrekking tot de gemiddelde of pseudo-specifieke groeisnelheid (afhankelijk van wat van toepassing is) per bak voor de periode van dag 0-28 of eventueel dag 0-14 en 14-28;
- resultaten van de statistische analyse (d.w.z. regressieanalyse of ANOVA), bij voorkeur in grafische en tabelvorm weergegeven en de LOEC ($p = 0,05$) en NOEC of EC_x met, indien mogelijk, de bijbehorende standaardafwijkingen;
- gevallen van abnormale reacties bij de vissen en zichtbare effecten die werden veroorzaakt door de teststof.

REFERENTIES

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

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

AANHANGSEL 1

AANBEVOLEN VISSOORTEN VOOR DE TEST EN GESCHIKTE TESTOMSTANDIGHEDEN

Vissoort	Aanbevolen bereik van de testtemperatuur (°C)	Fotoperiode (uren)	Aanbevolen bereik voor begingewicht van de vissen (g)	Aanbevolen meetnauwkeurigheid	Densiteit (g/l)	Bezettingsgraad per liter)	Voedsel	Testduur (dagen)
Aanbevolen vissoorten:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	tot op 100 mg	1,2 – 2,0	4	Droog merkvoer van zalmachtig broedsel	≥ 28
Andere goed gedocumenteerde vissoorten:								
<i>Danio rerio</i> Zebravis	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	tot op 1 mg	0,2 – 1	5 – 10	Levend voedsel (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> rijstvis (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	tot op 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Levend voedsel (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28

AANHANGSEL 2

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

STOF	CONCENTRATIES
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchlorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

AANHANGSEL 3

LOGARITMISCHE REEKS CONCENTRATIES DIE GESCHIKT ZIJN VOOR DE TOXICITEITSTEST (9)

Kolom (aantal concentraties tussen 100 en 10 of tussen 10 en 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

* Uit de kolom kan een reeks van vijf (of meer) opeenvolgende concentraties worden gekozen. De klassemiddenwaarden tussen de concentraties in kolom (x) worden verkregen uit kolom (2x + 1). De waarden in de tabel staan voor concentraties uitgedrukt in percentage per volume of in gewicht (mg/l of µg/l). De waarden kunnen waar nodig worden vermenigvuldigd met of gedeeld door elke tiende macht. Kolom 1 kan worden gebruikt als er veel onduidelijkheid bestaat over het toxiciteitsniveau.

C.15. VIS, KORTETERMIJN-TOXICITEITSTEST OP *EMBRYONALE*

EN LARVESTADIA (SAC-FRY)

1. METHODE

Deze kortetermijn-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 212 (1998).

1.1 INLEIDING

Deze kortetermijn-toxiciteitstest op de embryonale en larvestadia van de vis is een kortetermijntest waaraan de levensstadia vanaf het pasbevruchte ei tot en met de larvetijd worden blootgesteld. Tijdens de test wordt er geen voedsel toegediend. De test moet daarom worden beëindigd terwijl de larve zich nog voedt aan de dooierzak.

Het doel van de test is het bepalen van letale en, tot op zekere hoogte, subletale effecten van chemicaliën op de specifieke stadia van de geteste diersoort. De test kan nuttige informatie bieden omdat deze (a) een brug kan vormen tussen letale en subletale tests, (b) kan dienen als screeningtest voor een volledige test over de eerste levensfase of voor een chronische-toxiciteitstest en (c) kan worden gebruikt voor het testen van vissoorten waarbij de normale technieken die worden gebruikt niet voldoende geavanceerd zijn voor het testen van de overgangperiode van endogene tot exogene voeding.

Het is belangrijk om te weten dat alleen tests die alle stadia van de levenscyclus van een vis omvatten een betrouwbare schatting kunnen geven van de chronische toxiciteit van chemicaliën bij vissen. Tevens moet men zich realiseren dat een test die niet alle stadia omvat minder gevoelig is en dat daarmee ook de chronische toxiciteit kan worden onderschat. Daarom wordt verwacht dat de embryo- en larvetest minder gevoelig is dan een volledige test over de eerste levensfase, met name ten opzichte van zeer lipofiele chemicaliën ($\log P_{ow} > 4$) en chemicaliën met een bepaalde toxische werking. Kleinere verschillen in de gevoeligheid tussen de twee tests zijn echter te verwachten bij chemicaliën met een niet-specifieke, narcotische werking (1).

Vóór de publicatie van deze test is de meeste ervaring met deze embryo- en larvetest opgedaan met de zoetwatervis *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae - algemene naam: zebravis). Meer gedetailleerde informatie over het uitvoeren van tests met deze vissoort is te vinden in aanhangsel 1. Het gebruik van andere vissoorten waarmee ook ervaring is opgedaan, is echter ook toegestaan (tabel 1).

1.2 DEFINITIES

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ($p < 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

No Observed Effect Concentration (NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC.

1.3 PRINCIPE VAN DE TEST

De embryonale en larvestadia van de vis worden blootgesteld aan een reeks concentraties van de in water opgeloste teststof. Binnen het protocol kan men kiezen tussen een semi-statische procedure en een doorstroomprocedure. De keuze hangt af van het type teststof. De test begint met het plaatsen van de bevruchte eitjes in de testkamers en eindigt vlak voordat de dooierzak van welke larve dan ook in een van de testkamers volledig is verbruikt of voordat er sterfte optreedt door verhongering in de controlegroep. Vervolgens worden de letale of subletale effecten vastgesteld en vergeleken met de controlewaarden zodat de LOEC en NOEC kunnen worden vastgesteld. De effecten kunnen ook worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden ingeschat wat de concentratie is die een gegeven procentueel effect kan opleveren (d.w.z. LC/EC_x, waarbij x een bepaald % effect is).

1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C. 1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. De resultaten kunnen van pas komen bij het selecteren van de juiste reeks testconcentraties in de test die betrekking heeft op de eerste levensfase. De oplosbaarheid in water (inclusief de oplosbaarheid in testwater) en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare, analytische methode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

De gegevens over de teststof die nuttig zijn bij het bepalen van de testomstandigheden zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in licht, de stabiliteit onder de testcondities, pK_a, P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C. 4).

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Een test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

- het totale percentage bevruchte eitjes in de controlegroep en eventueel in de bakken met alleen het oplosmiddel dat de test overleeft, moet groter of gelijk zijn aan de minimale percentages in aanhangsel 2 en 3;
- het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test tussen 60 % en 100 % van de verzadigingswaarde van lucht liggen;
- het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers en tussen de opeenvolgende dagen mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan $\pm 1,5$ °C. Tevens mag de watertemperatuur niet hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2 en 3).

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 Testkamers

Voor de test mogen glazen bakken en bakken van ander chemisch inert materiaal worden gebruikt. De grootte van de bakken moet geschikt zijn voor de beoogde dichtheid (zie punt 1.7.1.2). Het is aan te bevelen de testkamers willekeurig in het testgebied te plaatsen. Als er systematische effecten in het laboratorium optreden die kunnen worden beheerst door het gebruik van blokken, verdient een willekeurig blokontwerp waarbij in elk blok alle behandelingen plaatsvinden de voorkeur boven een compleet willekeurig ontwerp. Als er wordt gebruikgemaakt van blokken, moet hier bij de gegevensanalyse rekening mee worden gehouden. De testkamers moeten worden beschermd tegen ongewenste invloeden van buitenaf.

1.6.2 **Keuze van de vissoort**

In tabel 1A staan de aanbevolen vissoorten. Dit sluit het gebruik van andere vissoorten niet uit (voorbeelden in tabel 1B), maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

1.6.3 **Leefomstandigheden van de broedvis**

Meer informatie over de relatief beste leefomstandigheden voor de broedvissen vindt u in OESO TG 210¹ en in de referenties (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4 **Omgaan met embryo's en larven**

Embryo's en larven kunnen binnen de hoofdbak worden onderverdeeld in kleinere bakken die zijn voorzien van gaaswanden waardoor de testoplossing vrij door de hoofdbak kan stromen. Een niet-turbulente stroming in deze kleine bakken kan worden verkregen door deze aan een arm te hangen die ze op en neer beweegt en tegelijkertijd de organismen onder water houdt. Ook kan worden gebruikgemaakt van een sifon-spoelsysteem. Bevruchte eitjes van zalmachtigen kunnen op een rek of gaas worden gelegd met gaten die zo groot zijn dat de larven, nadat ze zijn uitgekomen, er doorheen kunnen vallen. In semi-statische tests waarbij de organismen dagelijks moeten worden overgeplaatst, kan bij het verwijderen van embryo's en larven het best gebruik worden gemaakt van pasteurpipetten (zie paragraaf 1.6.6).

Indien er eihouders, roosters of gaaswerken zijn gebruikt om de eitjes in de hoofdbak op hun plaats te houden, moeten deze worden verwijderd zodra de larven uitkomen¹. Stukken gaas die voorkomen dat vissen ontsnappen, mogen niet worden verwijderd. Als larven moeten worden overgeplaatst, mogen ze niet worden blootgesteld aan lucht en mogen er geen netten worden gebruikt om de vissen uit de eihouders te halen (deze waarschuwing is mogelijk niet van toepassing op sommige minder fragiele vissoorten, zoals de karper). Het moment van overplaatsing is afhankelijk van de vissoort. Soms is overplaatsing niet nodig. Voor de semi-statische techniek mogen bekertjes of lage bakjes worden gebruikt. Indien nodig worden de bekertjes vlak boven de bodem voorzien van een stukje gaas. Als het volume van deze bakjes voldoet aan de dichtheitsvereisten (zie 1.7.1.2), is het overplaatsen van de embryo's of larven mogelijk niet nodig.

1.6.5 **Water**

Water dat voldoet aan de chemische kenmerken van geschikt verdunningswater zoals vermeld in aanhangsel 4 en waarin de gekozen vissoort minstens zo goed kan overleven als in het water dat wordt beschreven in de aanhangsels 2 en 3, is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde mag niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en SO₄), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

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

1.6.6 Testoplossingen

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn ethanol, methanol, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de overlevingskansen en geen zichtbaar negatief effect hebben op de vroege levensstadia, hetgeen blijkt uit de controle met uitsluitend oplosmiddel. Het gebruik van deze stoffen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

Voor de semi-statische techniek kunnen twee verschillende verversingsprocedures worden toegepast; (i) er worden nieuwe testoplossingen bereid in schone bakken en levende eitjes en larven worden in een kleine hoeveelheid oude oplossing voorzichtig naar de nieuwe schone bakken overgeplaatst waarbij blootstelling aan lucht moet worden vermeden, of (ii) de organismen blijven in de bakken terwijl een deel van het testwater (minimaal driekwart) wordt ververs. De verversingsfrequentie hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80 - 120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest. In elk geval moet erop worden toegezien dat de larven tijdens de verversingsprocedure geen stress ondervinden.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Een stroomsnelheid die overeenkomt met ten minste vijf testkamervolumes per 24 uur is wenselijk (2).

1.7 PROCEDURE

Voor informatie over de resultaten van de toxiciteitstest met visembryo's en -larven kunt u de bestaande literatuur raadplegen. De literatuurlijst van deze tekst bevat enkele voorbeelden (7)(8)(9).

1.7.1 Blootstellingsomstandigheden

1.7.1.1 Duur

De test moet bij voorkeur worden gestart binnen 30 minuten na de bevruchting van de eitjes. De embryo's worden in de testoplossing geplaatst vóór, of zo snel mogelijk na, het begin van het blastodiscus-stadium en altijd vóór het begin van het gastrulastadium. Als de eitjes afkomstig zijn van een commerciële leverancier, is het niet altijd mogelijk de test direct na de bevruchting te starten. Omdat de gevoeligheid van de test sterk kan worden beïnvloed door het uitstellen van de start, moet de test binnen 8 uur na de bevruchting worden gestart. Omdat de larven gedurende de periode van blootstelling niet worden gevoederd, moet de test worden beëindigd voordat een van de larven, ongeacht in welke testkamer, de dooierzak volledig heeft verbruikt of voordat er sterfte door verhongering optreedt binnen de controlegroep. De duur hangt af van de vissoort die wordt gebruikt. In aanhangsel 2 en 3 wordt voor een aantal vissoorten de aanbevolen testduur biologisch vermeld.

1.7.1.2 *Densiteit*

Het aantal bevruchte eitjes aan het begin van de test moet toereikend zijn om te kunnen voldoen aan de statistische vereisten. De eitjes moeten willekeurig worden verdeeld over de verschillende behandelingen. Daarbij moeten minimaal 30 bevruchte eitjes, gelijk of zo gelijk mogelijk (bij bepaalde vissoorten is het namelijk moeilijk om een gelijk aantal per groep te verkrijgen) over ten minste drie replicaat-testkamers verdeeld, per concentratie worden gebruikt. De densiteit (biomassa per volume testoplossing) moet zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Bij doorstroomtests wordt een densiteit van maximaal 0,5 g/l per 24 uur en maximaal 5 g/l oplossing op een willekeurig moment(2) aanbevolen.

1.7.1.3 *Licht en temperatuur*

De fotoperiode en testwatertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangel 2 en 3). Gebruik voor het controleren van de temperatuur desgewenst een extra testbak.

1.7.2 **Testconcentraties**

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig die een constante factor van maximaal 3,2 van elkaar verschillen. Bij het selecteren van de reeks concentraties moet rekening worden gehouden met de curve van LC_{50} tegen blootstellingsperiode tijdens het acute toxiciteitsonderzoek. In bepaalde situaties mogen minder dan vijf concentraties worden gebruikt, bijvoorbeeld bij een limiettest, en kan het interval tussen de concentraties worden verkort. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. Er mogen geen concentraties van de stof worden gebruikt die hoger zijn dan de LC_{50} over 96 uur of, indien dit lager is, 100 mg/l. Tevens mogen stoffen niet boven hun oplosbaarheids grens in het testwater worden getest.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van testoplossingen (zie punt 1.6.6), mag de uiteindelijke concentratie hiervan in de testbakken niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie in alle bakken gelijk zijn.

1.7.3 **Controles**

Naast de testreeks moet er een controlegroep worden behandeld met alleen het verdunningswater (eventueel met replicaat) en, indien van toepassing, een controlegroep met water waaraan het ontsluitingsmiddel is toegevoegd (eventueel met replicaat).

1.7.4 **Frequentie van de analytische bepalingen en metingen**

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten.

In semi-statische tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft (d.w.z. binnen het interval van 80 - 120 %; zie punt 1.4 en 1.6.6), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, en ten minste drie keer, verspreid over de test (d.w.z. dat monsters van dezelfde oplossing moeten worden geanalyseerd - vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen).

Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de stof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Doe dit vlak na het bereiden en vlak vóór het verversen en volgens dezelfde procedure als hierboven (d.w.z. ten minste drie keer, verspreid over de test). Deze bepaling van de concentratie van de teststof vóór het verversen van de oplossing hoeft voor elke testconcentratie slechts bij de oplossing van één replicaat-bak te gebeuren. Het interval tussen deze metingen mag niet meer dan zeven dagen bedragen. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen ± 20 % van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten oorspronkelijke waarden.

Bij doorstroomtests is een soortgelijke procedure als hierboven van toepassing (maar de meting van 'oude' oplossingen is niet van toepassing). Als de testduur echter langer is dan zeven dagen, is het mogelijk verstandig het aantal monsternemingen tijdens de eerste week te verhogen (bijvoorbeeld drie meetreeksen), zodat men zeker weet dat de testconcentraties stabiel blijven.

Monsters moeten mogelijk worden gecentrifugeerd of gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45 µm poriëngrootte). Omdat echter kennelijk noch centrifugatie noch filtratie een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garandeert, kunnen deze behandelingen wellicht niet altijd op de monsters worden toegepast.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semi-statische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semi-statische tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid moet gedurende de test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten en bij voorkeur in één testbak continu worden gecontroleerd.

1.7.5 **Waarnemingen**

1.7.5.1 *Stadium van embryonale ontwikkeling*

Het embryonale stadium (d.w.z. het gastrulastadium) bij het begin van de blootstelling aan de teststof moet zo nauwkeurig mogelijk worden vastgesteld. Hiervoor kan een representatief monster van eitjes worden gebruikt die afdoende zijn gefixeerd en geklaard. Voor een beschrijving en afbeeldingen van de embryonale stadia kan ook de literatuur worden geraadpleegd (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2 *Uitkomen en overleven*

Minimaal één keer per dag moet uitkomen en overleven worden geobserveerd en de aantallen geregistreerd. Het is mogelijk wenselijk om aan het begin van de test vaker te kijken (bijvoorbeeld elke 30 minuten gedurende de eerste drie uur), omdat in sommige gevallen de overlevingstijden relevanter zijn dan het aantal dode diertjes (bijvoorbeeld als er sprake is van acute toxische effecten). Dode embryo's en larven moeten direct nadat ze worden opgemerkt, worden verwijderd, omdat ze snel kunnen ontbinden. Het verwijderen van dode organismen moet zeer voorzichtig gebeuren om aanstoten en beschadigen van naastgelegen eitjes/larven te voorkomen. Deze zijn namelijk uitermate fragiel en gevoelig. De criteria voor 'dood' variëren per stadium:

- **eitjes:** met name in de eerste stadia duidelijk minder doorzichtig en een verandering van kleur als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk
- **embryo's:** geen embryonale beweging en/of geen hartslag en/of ontkleuring en afname van doorzichtigheid bij soorten die als embryo gewoonlijk doorzichtig zijn;
- **larven:** onbeweeglijkheid en/of geen ademhaling en/of geen hartslag en/of witte ondoorschijnende kleur van het centrale zenuwstelsel en/of geen reactie op een mechanische prikkel.

1.7.5.3 *Afwijkend uiterlijk*

Het aantal larven met een afwijkende lichaamsvorm en/of pigmentatie en de fase van het verbruik van de dooierzak moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test en de aard van de afwijking, worden gerapporteerd. Embryo's en larven met een afwijking kunnen van nature voorkomen en bij sommige vissoorten kan het aantal oplopen tot enkele procenten van de controlegroep(en). Dieren met een afwijking mogen alleen uit de testbakken worden verwijderd als ze dood zijn.

1.7.5.4 *Afwijkend gedrag*

Afwijkingen, zoals hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen en atypische onbeweeglijkheid, moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test, worden gerapporteerd. Hoewel het moeilijk is deze effecten te kwantificeren, kunnen ze (indien waargenomen) helpen bij de interpretatie van de sterftecijfers doordat ze informatie geven over de toxische werking van de teststof.

1.7.5.5 *Lengte*

Het is wenselijk om aan het eind van de test de lengte van elk organisme te meten. Hierbij kunnen de standaardlengte, de vorklengte en de totale lengte worden gemeten. Als er echter vinrot in de staart of vinerosie is opgetreden, moet de standaardlengte worden gemeten. Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor de lengte van replicaat-organismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test $\leq 20\%$ zijn.

1.7.5.6 *Gewicht*

Aan het eind van de test kan van elk organisme het gewicht worden gemeten; het droge gewicht (24 uur bij 60 °C) heeft de voorkeur boven het natte gewicht (drooggedept). Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor het gewicht van replicaat-organismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test $\leq 20\%$ zijn.

Deze waarnemingen resulteren in de volgende gegevens die alle voor een deel kunnen worden gebruikt voor een statistische analyse:

- cumulatieve sterfte;
- aantal gezonde larven aan het eind van de test;
- tijd van begin uitkomen eitjes tot eind uitkomen eitjes (d.w.z. 90 % van de eitjes in elke replicaatbak);
- aantal larven dat per dag uitkomt;
- lengte (en gewicht) van overlevende organismen aan eind van de test;
- aantal larven dat misvormd is of een afwijking vertoont;
- aantal larven dat afwijkend gedrag vertoont.

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1 BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het oorspronkelijk aantal bevruchte eitjes en de gemeten parameters. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

Als de LOEC/NOEC wordt bepaald, moet de variatie binnen elke set replicaatbakken worden geanalyseerd met behulp van ANOVA (variantie-analyse) of kruistabellen. Bij het maken van een meervoudige vergelijking tussen de resultaten van de afzonderlijke concentraties en de resultaten van de controlegroepen, komt de methode van Dunnett mogelijk goed van pas (12)(13). Er zijn ook andere bruikbare methoden beschikbaar (14)(15). De omvang van het effect dat met ANOVA of een andere methode kan worden vastgesteld, (d.w.z. het onderscheidingsvermogen van de test) moet worden berekend en gerapporteerd. Overigens zijn niet alle waarnemingen die worden vermeld in punt 1.7.5.6 geschikt voor statistische analyse met ANOVA. De cumulatieve sterfte en het aantal gezonde larven aan het eind van de test kunnen bijvoorbeeld worden geanalyseerd met probitmethoden.

Als de LC/EC_x wordt bepaald, moet er een geschikte curve (of meerdere curven), zoals de logistische curve, worden bepaald voor de gegevens met behulp van een statistische methode, zoals de kleinste kwadraten-methode of de niet-lineaire kleinste kwadratenmethode. De curven moeten worden geparmetriseerd zodat LC/EC_x en de standaardafwijking direct kunnen worden bepaald. Hierdoor wordt het berekenen van de betrouwbaarheidsgrenzen van de LC/EC_x een stuk eenvoudiger. Tenzij er goede redenen zijn om andere betrouwbaarheidsniveaus te hanteren, moet een betrouwbaarheid van 95 % aan beide zijden worden aangehouden. De passingsprocedure moet bij voorkeur een middel bieden waarmee de significantie van de mate waarin de curve niet past, kan worden berekend. Voor het maken van de curven kunnen grafische methoden worden gebruikt. Regressieanalyse is geschikt voor alle waarnemingen in punt 1.7.5.6.

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectie van de analysemethode. De resultaten voor concentraties die de oplosbaarheids grens van de teststof in water overschrijden, moeten ook voorzichtig worden geïnterpreteerd.

2.3 TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.3.1 Teststof:

- fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken;
- chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de hoeveelheid van de teststof.

2.3.2 Diersoort:

- wetenschappelijke naam, stam, aantal moedervissen (d.w.z. het aantal vrouwtjes dat werd gebruikt voor het produceren van het benodigde aantal eitjes in de test), herkomst en de methode waarop de bevruchte eitjes werden verzameld en vervolgens werden behandeld.

2.3.3 Testomstandigheden

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statische test of doorstroomtest, tijdsduur vanaf bevruchting tot start van de test, densiteit, enz.);
- fotoperiode(n);
- testopzet (bijvoorbeeld het aantal testkamers en replicaten, het aantal embryo's per replicaat);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld);
- de nominale testconcentraties, de in de testbakken gemeten waarden met gemiddelden en standaardafwijkingen en de methode waarmee zij zijn bepaald, en, indien de teststof bij een lagere concentratie dan in de testsituatie oplosbaar is in water, moet worden aangetoond dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de stof in de testoplossing;
- kenmerken van het verdunningswater; pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC), zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;
- waterkwaliteit in de testbakken: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof.

2.3.4 Resultaten:

- resultaten van eventuele voorbereidende onderzoeken naar de stabiliteit van de teststof;
- gegevens waaruit blijkt dat de totale overleving in de controlegroepen voldeed aan de aanvaardbaarheidsnorm voor het gebruikte proefdier (aanhangsel 2 en 3);
- gegevens over de sterfte/overleving tijdens de embryonale en larvestadia en de totale sterfte/overleving;
- aantal dagen waarbinnen de eitjes zijn uitgekomen en aantal uitgekomen eitjes;
- gegevens over lengte (en gewicht);
- gevallen en beschrijving van morfologische afwijkingen (indien aanwezig);
- gevallen en beschrijving van effecten op het gedrag (indien aanwezig);
- statistische analyse en verwerking van de gegevens;
- bij tests die zijn geanalyseerd met ANOVA, de LOEC bij $p = 0,05$ en de NOEC voor elke reactie die is vastgesteld, met inbegrip van een beschrijving van de statistische procedures die zijn gebruikt en een indicatie van de omvang van het waar te nemen effect;
- bij tests die zijn geanalyseerd met regressietechnieken, de LC/EC_x en betrouwbaarheidsintervallen, en een grafiek van het aangepaste model dat werd gebruikt voor de berekening;
- beweegredenen voor eventuele afwijkingen van deze testmethode.

REFERENTIES

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

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

TABEL 1A: AANBEVOLEN VISSOORTEN VOOR DE TEST

ZOETWATERVISSSEN
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Zebravis (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Karper (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Japanse rijstvis/Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> “Fathead minnow” (8)(22)

TABEL 1B: VOORBEELDEN VAN ANDERE GOED-GEDOCUMENTEERDE VISSOORTEN DIE AL EENS ZIJN GEBRUIKT

ZOETWATERVISSSEN	ZOUTWATERVISSSEN
<i>Carassius auratus</i> Goudvis (8)	<i>Menidia pensilvanica</i> “Tidewater silverside” (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Zonnebaars (8)	<i>Clupea harengus</i> Haring (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Kabeljauw (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteen tandkarper (23)(24)(25)

AANHANGSEL 1

RICHTLIJNEN BIJ HET UITVOEREN VAN EEN TOXICITEITSTEST MET EMBRYO'S EN LARVEN (SAC-FRY) VAN DE ZEBRAVIS (*Brachydanio rerio*)

INLEIDING

De zebravis komt oorspronkelijk voor in de snelstromende rivieren in het gebied van de Kust van Coromandel in India. De vis wordt vaak gebruikt in aquaria en behoort tot de karperachtigen. Voor informatie over het kweken en verzorgen van zebravissen kunnen de standaard-naslagwerken over tropische vissen worden geraadpleegd. De biologie van de vis en zijn gebruik in visgerijonderzoek is bestudeerd door Laale (1).

De vis wordt zelden langer dan 45 mm. De romp is cilindrisch en heeft 7 - 9 donkerblauwe, horizontale, zilverachtige strepen. Deze strepen lopen tot aan de anale en staartvinnen. De rug is olijfgroen. De mannetjes zijn dunner dan de vrouwtjes. De vrouwtjes zijn zilveriger en hebben een opgezwollen buik, met name vlak voor het kuitschieten.

De volwassen vissen zijn bestand tegen grote schommelingen in de temperatuur, pH en hardheid. Om de vissen echter gezond te houden, zodat de eitjes die worden geproduceerd van goede kwaliteit zijn, moeten optimale omstandigheden worden gecreëerd.

Bij het kuitschieten wordt het vrouwtje door het mannetje achtervolgd en aangestoten. Zodra de eitjes worden uitgestoten, worden ze bevrucht. De eitjes, die doorzichtig en niet-klevend zijn, vallen op de bodem, waar ze soms door de ouders worden opgegeten. Het kuitschieten wordt beïnvloed door licht. Als er 's ochtends voldoende licht is, vindt het kuitschieten gewoonlijk in de eerste uren na zonsopgang plaats.

Een vrouwtje kan met tussenpozen van een week wel honderden eitjes per keer produceren.

LEEFOMSTANTIGHEDEN VAN DE OUDERVISSSEN, REPRODUCTIE EN VROEGE LEVENSTADIA

Selecteer een geschikt aantal gezonde vissen en plaats deze ten minste twee weken voor het geplande kuitschieten in het juiste water (zie aanhangsel 4). De vissen moeten zich minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat ze de eitjes produceren die voor de test worden gebruikt. De dichtheid van de vissen mag in deze periode niet groter zijn dan 1 gram vis per liter. Als het water regelmatig wordt verversd of er wordt gebruikgemaakt van zuiveringssystemen, is het mogelijk de dichtheid te verhogen. In de bakken moet een temperatuur van 25 ± 2 °C worden gehandhaafd. De vissen moeten gevarieerd voedsel krijgen, bijvoorbeeld geschikt commercieel verkrijgbaar droogvoer, pas uitgekomen arthemida, chironomiden, daphnia en enchytraeën.

Hieronder worden twee procedures beschreven. In het verleden hebben deze geleid tot een groep gezonde bevruchte eitjes, die groot genoeg was om er een test mee uit te voeren.

- i. Acht vrouwtjes en zestien mannetjes worden in een aquarium met 50 liter verdunningswater geplaatst. Ze worden afgeschermd van direct licht en minimaal 48 uur zo min mogelijk gestoord. Op de middag vóór de dag dat de test van start gaat, wordt onderin het aquarium een kuitbak geplaatst. Deze bestaat uit een frame (plexiglas of ander geschikt materiaal) van 5-7 cm hoog met een grof net van 2 - 5 mm bovenin en een fijn net van 10 - 30 µm onderin. Aan het grove net van het frame wordt een aantal 'kuitbomen' bevestigd. Deze zijn gemaakt van uit nylon touw dat is losgedraaid. Nadat de vissen 12 uur in het donker hebben doorgebracht, wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Twee tot vier uur na het kuitschieten, wordt de kuitbak verwijderd en worden de eitjes verzameld. De kuitbak zorgt ervoor dat de vissen de eitjes niet kunnen opeten en dat de eitjes gemakkelijk kunnen worden verzameld. De groep vissen moet zich al minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat de eitjes worden geproduceerd die voor de test worden gebruikt.

- ii. Vijf tot tien vrouwtjes- en mannetjesvissen worden minimaal twee weken voor het geplande kuitschieten in aparte bakken ondergebracht. Na 5 - 10 dagen zijn de buikjes van de vrouwtjes opgezwollen en zijn hun genitale papillen zichtbaar. Bij mannetjesvissen ontbreken deze. Het kuitschieten vindt plaats in een speciaal aquarium dat onderin is voorzien van een gaaswerk (zie boven). Het aquarium wordt tot 5 - 10 cm boven dit gaaswerk gevuld met verdunningswater. Op de dag voordat het kuitschieten moet plaatsvinden, worden er één vrouwtje en twee mannetjes in geplaatst. De watertemperatuur wordt geleidelijk verhoogd totdat het water één graad warmer is dan de acclimatiseringstemperatuur. Het licht wordt gedoofd en het aquarium moet vervolgens zoveel mogelijk met rust worden gelaten. 's Ochtends wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Na 2 - 4 uur worden de vissen verwijderd en de eitjes verzameld. Als er meer eitjes nodig zijn dan het aantal dat één vrouwtje kan produceren, kunnen er meerdere aquaria tegelijk worden gebruikt. Als vóór de test wordt vastgelegd wat de voortplantingsresultaten van de afzonderlijk vrouwtjes zijn (aantal eitjes en kwaliteit), kunnen de vrouwtjes die het hoogst scoren, worden gebruikt voor het kuitschieten.

De eitjes moeten in glazen zuigbuisjes (inwendige diameter minimaal 4 mm) met een flexibele ballon worden overgeplaatst naar de testbakken. De hoeveelheid water waarin de eitjes worden vervoerd moet zo klein mogelijk zijn. De eitjes zijn zwaarder dan water en zakken uit het buisje. Zorg ervoor dat de eitjes (en larven) niet in contact komen met lucht. Om er zeker van te zijn dat er in de eerste ontwikkelingsstadia geen onregelmatigheden voordoen, moet er een microscopisch onderzoek worden verricht op een monster (of meerdere monsters) van de eitjes. De eitjes mogen niet worden gedesinfecteerd.

Het sterftecijfer onder de eitjes is het hoogst binnen 24 uur na de bevruchting. In deze periode is een sterfte van 5 - 40 % niet uitzonderlijk. Eitjes sterven af door een mislukte bevruchting of door stoornissen in de ontwikkeling. De kwaliteit van de eitjes lijkt afhankelijk te zijn van de vrouwtjesvis die ze heeft geproduceerd. Sommige vrouwtjes produceren namelijk altijd eitjes van een goede kwaliteit en andere nooit. Ook het ontwikkelingstempo en de snelheid waarmee de eitjes uitkomen, verschillen per groep eitjes. De eitjes die met succes zijn bevrucht en de larven hebben hoge overlevingskansen, gewoonlijk 90 % of hoger. Bij 25 °C komen de eitjes 3 - 5 dagen na de bevruchting uit. De dooierzak is ongeveer 13 dagen na de bevruchting volledig verbruikt.

De ontwikkeling van het embryo is goed beschreven door Hisaoka en Battle (2). Doordat de eitjes en de uitgekomen larven doorzichtig zijn, kan de ontwikkeling van de vis worden gevolgd en kunnen misvormingen worden waargenomen. Ongeveer 4 uur na kuitschieten, kunnen de niet-bevruchte eitjes worden onderscheiden van de bevruchte eitjes (3). Om dit te kunnen zien, worden de eitjes en larven in een kleine testbak geplaatst en bestudeerd onder een microscoop.

De testomstandigheden voor de vroege levensstadia worden genoemd in aanhangsel 2. De optimale waarden voor de pH en de hardheid van het verdunningswater zijn respectievelijk 7,8 en 250 mg CaCO₃/l.

BEREKENINGEN EN STATISTIEKEN

Hiervoor wordt een tweefasige aanpak aanbevolen. Eerst worden de gegevens over sterfte, abnormale ontwikkeling en de duur van het uitkomen van de eitjes statistisch geanalyseerd. Vervolgens wordt in concentraties waarbij geen negatieve effecten op een van deze parameters werd geconstateerd, de lengte van de visjes statistisch bepaald. Deze aanpak wordt aanbevolen omdat de stof selectief kleinere visjes kan doden, de duur van het uitkomen kan vertragen en zware misvormingen kan veroorzaken, waardoor de lengtemetingen een vertekend beeld kunnen geven. Bovendien wordt er per behandeling ongeveer hetzelfde aantal vissen gemeten en kan zodoende de betrouwbaarheid van de teststatistieken worden gegarandeerd.

BEPALEN VAN LC₅₀ EN EC₅₀

Het percentage overlevende eitjes en larven wordt berekend en gecorrigeerd voor de sterfte in de controlegroepen volgens de formule van Abbott (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

waarbij

P = gecorrigeerd % overleving

P' = % overleving waargenomen bij testconcentratie

C = % overleving in controlegroep

Indien mogelijk wordt aan het eind van de test met een passende methode de LC₅₀ bepaald.

Als het wenselijk is ook de morfologische afwijkingen in de statistische EC₅₀ op te nemen, kan hiervoor Stephan (5) worden geraadpleegd.

VASTSTELLEN VAN DE LOEC EN NOEC

Eén doel van een embryo- en larvetest is de testgroepen te vergelijken met de controlegroep, d.w.z. het bepalen van de LOEC. Hiertoe moeten verschillende vergelijkingsprocedures worden toegepast (6)(7)(8)(9)(10).

REFERENTIES

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

AANHANGSEL 2

TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR AND OVERLEVINGSCRITERIA VOOR AANBEVOLEN VISSOORTEN

VISSOORT	TEMP (°C)	ZOUT- GEHALTE (0/00)	FOTOPERIODE (in uren)	DUUR VAN DE STADIA (in dagen)		NORMALE DUUR VAN TEST	OVERLEVING BINNEN CONTROLEGROEP (MINIMUM %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebravis	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-10 dagen)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 20 dagen na het uitkomen van de eitjes (50-55 dagen)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Karper	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japanse rijstvis/ Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (13-16 dagen)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> "Fathead minnow"	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	60	70

⁽¹⁾ Voor embryo's

⁽²⁾ Voor larven

^(a) Duisternis voor embryo's en larven tot een week nadat de eitjes zijn uitgekomen, behalve wanneer ze worden geïnspecteerd. Daarna zwak licht tot het eind van de test.

AANHANGSEL 3

TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR AND OVERLEVINGSCRITERIA VOOR ANDERE GOED GEDOCUMENTEERDE VISSOORTEN

VISSOORT	TEMP (°C)	ZOUT- GEHAL- TE (0/00)	FOTOPERIODE (in uren)	DUUR VAN DE STADIA (in dagen)		NORMALE DUUR VAN EMBRYO EN LARVETEST	OVERLEVING BINNEN CONTROLEGROEP (MINIMUM %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
<i>Carassius auratus</i> Goudvis	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	–	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Zonnebaars	21 ± 1	–	16	3	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	–	75
ZOUTWATER								
<i>Menidia peninsulae</i> "Tidewater silverside"	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (6-7 dagen)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Haring	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (23-27 dagen)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Kabeljauw	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (18 dagen)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteentandkarper	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrulastadium) tot 4/7 dagen na het uitkomen van de eitjes (28 dagen)	> 75	80

AANHANGSEL 4

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

STOF	CONCENTRATIE
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchlorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

C.16. HONINGBIJEN - ACUTE-TOXICITEITSTEST (ORAAAL)

1. METHODE

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 213 (1998).

1.1 INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute orale toxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute orale toxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute orale toxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

1.2 DEFINITIES

Acute orale toxiciteit: omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de orale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

Dosis: is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht (μg) van de teststof per proefdier ($\mu\text{g}/\text{bij}$). De werkelijke dosis voor elke bij kan niet worden berekend, omdat de bijen gezamenlijk worden gevoerd, maar een schatting van de gemiddelde dosis is wel mogelijk (totaal verbruikte teststof/aantal proefbijen in één korf).

LD₅₀ (mediaan letale dosis) oraal: is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis oraal hebben ontvangen, de dood intreedt. The LD₅₀-waarde wordt uitgedrukt in μg teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klare product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

Sterfte: een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen (*Apis mellifera*) worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof gedispergeerd in een sacharoseoplossing. Vervolgens wordt aan de bijen hetzelfde voer toegediend, zonder de teststof. Gedurende ten minste 48 uur wordt de sterfte dagelijks geregistreerd en vergeleken met de controlewaarden. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z. $\leq 10\%$, is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De resultaten worden geanalyseerd om de LD₅₀ bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer het onderzoek wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

1.4 VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

- aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen;
- de LD₅₀ van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

1.5 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1 **Verzameling van de bijen**

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen van hetzelfde ras gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond vóór de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met “bijenbrood” (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.

1.5.2 **Huisvestings- en voedingsomstandigheden**

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van 25 ± 2 °C worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l (50 % g/v) gebruikt. Na de toediening van de testdoses moet *ad libitum* voedsel worden verstrekt. Het voedselsysteem moet registratie van het voedselverbruik voor elke korf mogelijk maken (zie 1.6.3.1). Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

1.5.3 **Vorbereiding van de bijen**

De verzamelde bijen worden willekeurig in de testkorven ingedeeld, die op hun beurt willekeurig in de laboratoriumruimte worden geplaatst.

De bijen mag maximaal 2 uur vóór aanvang van de proef voedsel worden onthouden. Het wordt aanbevolen de bijen vóór de behandeling voedsel te onthouden, zodat alle bijen qua darminhoud aan het begin van de proef aan elkaar gelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

1.5.4 **Vorbereiding van de doses**

Wanneer de teststof met water kan worden gemengd, kan deze direct in een 50 % sacharoseoplossing worden dispergeerd. Bij technische producten en stoffen met een geringe oplosbaarheid in water kunnen media zoals organische oplosmiddelen, emulgators of dispergeermiddelen die een laag toxisch effect op bijen hebben (bv. aceton, dimethylformamide, dimethylsulfoxide), worden gebruikt. De concentratie van het medium is afhankelijk van de oplosbaarheid van de teststof en moet gelijk zijn voor alle onderzochte concentraties. Een mediumconcentratie van 1 % is algemeen geschikt en mag niet worden overschreden.

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. oplossingen waarbij een oplos- of dispergeermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er moeten twee aparte controlegroepen worden gebruikt: een oplossing in water en een sacharoseoplossing waarbij het oplosmiddel/de drager de bij de dosering van de oplossing gebruikte concentratie heeft.

1.6 PROCEDURE

1.6.1 **Test- en controlegroepen**

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de LD₅₀ met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de LD₅₀ omvatten. Toch moeten de verdunningsfactor en het aantal concentraties voor dosering worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste concentraties voor de dosering worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke testgroepen, elk bestaande uit tien bijen. Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Ook bij de gebruikte oplosmiddelen/dragers moet gebruik worden gemaakt van controlegroepen (zie 1.5.4).

1.6.2 **Toxische standaard**

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte LD₅₀-waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Als toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale LD₅₀-24 uur tussen 0,10 en 0,35 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathion).

1.6.3 **Blootstelling**

1.6.3.1 *Toediening van de doses*

Aan elke testgroep bijen moet een dosis van 100-200 µl van een 50 % sacharoseoplossing in water worden toegediend met de juiste concentratie van de teststof. Bij producten met een geringe oplosbaarheid, lage toxiciteit of lage concentratie in de samenstelling moeten grotere hoeveelheden worden gebruikt, omdat in de sacharoseoplossing hogere verhoudingen gebruikt moeten worden. Er moet worden bijgehouden hoeveel behandeld voedsel elke groep verbruikt. Zodra het voedsel is verbruikt (meestal binnen 3-4 uur), moet de voedselhouder uit de korf worden verwijderd en vervangen worden door een houder met uitsluitend de sacharoseoplossing. De sacharoseoplossingen worden dan *ad libitum* verstrekt. Voor sommige mengsels, bij hogere concentraties, kan een weigering van de testdosis ertoe leiden dat weinig of geen voedsel wordt verbruikt. Na uiterlijk 6 uur moet het niet-verbruikte behandelde voedsel worden vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. De verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel wordt bepaald (bv. meting van volume/gewicht van het resterende behandelde voedsel).

1.6.3.2 *Duur*

De proef duurt bij voorkeur 48 uur, te beginnen nadat de testoplossing is vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. Indien de sterfte na de eerste 24 uur met meer dan 10% blijft stijgen, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10% bedraagt.

1.6.4 **Waarnemingen**

De sterfte wordt 4 uur na aanvang van de test en vervolgens na 24 uur en 48 uur (d.w.z. na de toediening van de dosis) geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

De verbruikte hoeveelheid voedsel per groep moet worden geschat. Een vergelijking van de verbruikte hoeveelheden behandeld en onbehandeld voedsel binnen de genoemde 6 uur kan informatie opleveren over de smakelijkheid van het behandelde voedsel.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

1.6.5 **Limiettest**

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD₅₀ hoger is dan deze waarde. Dezelfde procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1 **GEGEVENS**

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien: het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftecijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3)(4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD₅₀) met de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4)(5). Wanneer het behandelde voedsel niet volledig wordt verbruikt, moet per groep worden bepaald welke dosis van de teststof is verbruikt. De LD₅₀ wordt uitgedrukt in µg teststof per bij.

2.2 **VERSLAG VAN HET ONDERZOEK**

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.2.1 **Teststof:**

- fysieke aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning);
- chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stof(fen)).

2.2.2 **Diersoort:**

- wetenschappelijke naam, stam, bij benadering de leeftijd (in weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling;
- informatie over de volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

2.2.3 **Proefomstandigheden:**

- temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte;
- huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven;
- methoden voor de bereiding van de stam- en testoplossingen (wanneer gebruikt moet zowel het oplosmiddel als de concentratie daarvan worden vermeld);
- proefopzet, bv. aantal en gebruikte testconcentraties, aantal controlegroepen; voor elke testconcentratie en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf;
- datum van de proef.

2.2.4

Resultaten:

- wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek;
- ruwe gegevens: sterfte bij elke geteste dosis op elk observatietijdstip;
- grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test;
- LD₅₀-waarden met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard;
- statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD₅₀;
- sterfte in de controlegroepen;
- andere waargenomen of gemeten biologische effecten, bv. abnormaal gedrag van de bijen (inclusief weigering van de testdosis), hoeveelheid verbruikt voedsel in behandelde en onbehandelde groepen;
- elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

3.

LITERATUUR

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

C.17. HONINGBIJEN - ACUTE-TOXICITEITSTEST (CONTACT)

1. METHODE

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 214 (1998).

1.1 INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute contacttoxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute contacttoxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute contacttoxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

1.2 DEFINITIES

Acute contacttoxiciteit: omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de lokale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

Dosis: is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht (μg) van de teststof per proefdier ($\mu\text{g}/\text{bij}$).

LD₅₀ (mediaan letale dosis) contact: is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis door contact hebben ontvangen, de dood intreedt. The LD₅₀-waarde wordt uitgedrukt in μg teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klaar product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

Sterfte: een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen (*Apis mellifera*) worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof opgelost in een geschikte drager, door rechtstreekse toediening aan de thorax (druppeltjes). De test duurt 48 uur. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z. $\leq 10\%$, is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De sterfte wordt dagelijks geregistreerd en met de controlewaarden vergeleken. De resultaten worden geanalyseerd om de LD₅₀ bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer de studie wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

1.4 VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

- aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen;
- de LD₅₀ van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

1.5 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1 **Verzameling van de bijen**

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus, stam enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond vóór de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met "bijenbrood" (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.

1.5.2 **Huisvestings- en voedingsomstandigheden**

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van 25 ± 2 °C worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l (50 % g/v) gebruikt, dat gedurende de testperiode met behulp van een voedselhouder *ad libitum* wordt verstrekt. Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

1.5.3 **Vorbereiding van de bijen**

Voor de toediening van de teststof kunnen de verzamelde bijen met kooldioxide of stikstof worden verdoofd. De hoeveelheid gebruikt anestheticum en de blootstellingsduur moeten zo gering mogelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

1.5.4 **Vorbereiding van de doses**

De teststof moet als oplossing in een drager worden toegediend, d.w.z. een organisch oplosmiddel of een oplossing in water met een bevochtigingsmiddel. Als organisch oplosmiddel verdient aceton de voorkeur, maar er kunnen ook andere organische oplosmiddelen met een lage toxiciteit voor bijen worden gebruikt (bv. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Voor kant-en-klare producten die in water gedispergeerd zijn en voor hoogpolaire organische stoffen die niet oplosbaar zijn in dragers van organische oplosmiddelen, kunnen oplossingen wellicht gemakkelijker worden toegediend wanneer ze worden voorbereid in een zwakke oplossing van een in de handel verkrijgbaar bevochtigingsmiddel (bv. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. waarbij een oplos- of disperseermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er worden twee aparte controlegroepen gebruikt, één behandeld met water en één behandeld met het oplos-/disperseermiddel.

1.6 PROCEDURE

1.6.1 **Test- en controlegroepen**

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de LD₅₀ met de 95-% betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de LD₅₀ omvatten. Toch moet het aantal doses worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste doses worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke testgroepen, elk bestaande uit tien bijen.

Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Indien een organisch oplosmiddel of een bevochtigingsmiddel wordt gebruikt, moeten drie extra controlegroepen van elk tien bijen voor het oplos- of bevochtigingsmiddel worden opgenomen.

1.6.2 **Toxische standaard**

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte LD₅₀-waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Als toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale LD₅₀-24 uur tussen 0,10 en 0,30 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathion).

1.6.3 **Blootstelling**

1.6.3.1 *Toediening van de doses*

De verdoofde bijen worden individueel met de teststof behandeld (lokale toediening). De bijen worden willekeurig in de verschillende testdosis- en controlegroepen ingedeeld. Met een microapplicator wordt 1 µl van een oplossing met de teststof en de juiste concentratie in de dorsale zijde van de thorax van elke bij ingebracht. Ook andere volumes mogen gebruikt worden, maar moeten gerechtvaardigd worden. Na de toediening van de oplossing worden de bijen in de testkorven ingedeeld en voorzien van sacharoseoplossingen.

1.6.3.2 *Duur*

De proef duurt bij voorkeur 48 uur. Indien de sterfte in de periode van 24 uur tot 48 uur meer dan 10 % stijgt, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10 % bedraagt.

1.6.4 **Waarnemingen**

De sterfte wordt 4 uur na de toediening van de dosis en vervolgens na 24 uur en 48 uur geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

1.6.5 **Limiettest**

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD₅₀ hoger is dan deze waarde. Dezelfde procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1 GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien: het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftecijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3)(4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip (d.w.z. 24 uur, 48 uur en, wanneer van toepassing, 72 uur en 96 uur) en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD_{50}) met de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4)(5). De LD_{50} wordt uitgedrukt in μg teststof per bij.

2.2 VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.2.1 Teststof:

- fysieke aard en fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning);
- chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stof(fen)).

2.2.2 Diersoort:

- wetenschappelijke naam, stam, bij benadering de leeftijd (in weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling;
- informatie over de volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

2.2.3 Proefomstandigheden:

- temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte;
- huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven;
- methoden voor de toediening van de teststof, bv. gebruikte drager, gebruikt volume van de testoplossing en het gebruikte anestheticum;
- proefopzet, bv. aantal en gebruikte testdoses, aantal controlegroepen; voor elke testdosis en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf;
- datum van de proef.

2.2.4 Resultaten:

- wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek;
- ruwe gegevens: sterfte bij elke geteste concentratie op elk observatietijdstip;
- grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test;
- LD_{50} -waarden, met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard;
- statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD_{50} ;
- sterfte in de controlegroepen;
- andere waargenomen of gemeten biologische effecten en elke abnormale respons van de bijen;
- elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

3.

LITERATUUR

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

C.18: BEPALING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIE MET BEHULP VAN EEN BATCH-EVENWICHTSMETHODE

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 106 van de OESO: bepaling van de adsorptie/desorptie met behulp van een batch-evenwichtsmethode (2000).

1.1 INLEIDING

In de methode is rekening gehouden met een rondzendproef en een workshop voor bodemselectie voor de ontwikkeling van een adsorptietest (1)(2)(3)(4) en met bestaande richtsnoeren op nationaal niveau (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Adsorptie/desorptie-onderzoek is nuttig om essentiële informatie te verkrijgen over de mobiliteit van chemische stoffen en hun verdeling in de compartimenten bodem, water en lucht van de biosfeer (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). De informatie kan worden gebruikt bij de prognose of raming van bijvoorbeeld de beschikbaarheid van een stof voor afbraak (22)(23), omzetting en opname door organismen (24); uitloging door het bodemprofiel (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28); vluchtigheid vanuit de bodem (21)(29)(30); afspoeling van het landoppervlak naar natuurlijke wateren (18)(31)(32). Adsorptiegegevens kunnen worden gebruikt voor vergelijkende en modelberekeningen (19)(33)(34)(35).

De verdeling van een chemische stof tussen bodem- en waterfase is een complex proces dat wordt bepaald door verschillende factoren: de chemische aard van de stof (12)(36)(37)(38)(39)(40), de kenmerken van de bodem (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) en klimaatfactoren zoals regenval, temperatuur, zonlicht en wind. De talloze verschijnselen en mechanismen die een rol spelen bij de adsorptie van een stof door de bodem kunnen dan ook niet volledig worden opgenomen in een eenvoudig laboratoriummodel zoals de hier beschreven methode. Ook al is deze methode een benadering waarin niet alle mogelijkheden in het milieu worden bestreken, toch levert zij voldoende informatie op over de relevantie van de adsorptie van een stof vanuit milieuoogpunt.

Zie ook de algemene inleiding.

1.2 TOEPASSINGSGEBIED

Met deze methode wordt getracht een raming van het adsorptie/desorptiegedrag van een stof ten opzichte van de bodem te bepalen. Het is de bedoeling een sorptiewaarde te verkrijgen die kan worden gebruikt om een prognose te doen omtrent de verdeling onder een scala van milieumomstandigheden; daartoe wordt de adsorptiecoëfficiënt bij evenwicht voor een chemische stof bij verschillende bodemtypes bepaald als functie van de bodemkenmerken (gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur, pH enz.). Er moeten verschillende bodemtypes worden gebruikt om de interactie van een bepaalde stof met in de natuur voorkomende bodemtypes zo breed mogelijk te kunnen bestrijken.

Bij deze methode wordt onder adsorptie het bindingsproces van chemische stoffen aan het bodemoppervlak verstaan; er wordt geen onderscheid gemaakt tussen verschillende adsorptieprocessen (fysische en chemische adsorptie) en bijvoorbeeld oppervlak-gekatalyseerde afbraak, bulkadsorptie of chemische reacties. Er wordt geen rekening gehouden met de adsorptie aan colloïd-deeltjes (diameter < 0,2 µm) die uit het bodemmonster ontstaan.

Als belangrijkste bodemparameters voor de adsorptie worden beschouwd: het gehalte aan organische koolstof (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48); het gehalte aan klei en de bodemtextuur (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) en de pH voor ioniseerbare verbindingen (3)(4)(42). Ook de effectieve capaciteit voor kationuitwisseling, het gehalte aan amorf ijzer en aluminiumoxides, met name voor vulkanische en tropische bodemtypes (4) en het specifieke oppervlak (49) kunnen een rol spelen.

De test is bedoeld om de adsorptie van een chemische stof aan verschillende bodemtypes met een uiteenlopend gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH te bepalen en bestaat uit drie fasen:

- Fase 1:** Voorbereidend onderzoek voor de bepaling van:
- de verhouding bodemmonster/oplossing;
 - de voor de instelling van het adsorptie-evenwicht benodigde tijd en de hoeveelheid geadsorbeerde stof bij evenwicht;
 - de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de gebruikte buizen of potten en de stabiliteit van de teststof gedurende de uitvoering van de test.
- Fase 2:** Screening: de adsorptie wordt bij vijf verschillende bodemtypes onderzocht aan de hand van de adsorptiekinetiek bij één concentratie en de bepaling van de verdelingscoëfficiënt K_d en K_{oc} .
- Fase 3:** Bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich om na te gaan wat de invloed van de concentratie op de mate van adsorptie aan de bodem is.
- Onderzoek van de desorptie aan de hand van de desorptiekinetiek/ desorptie-isothermen volgens Freundlich (zie bijlage I).

1.3

DEFINITIES EN EENHEDEN

Symbol	Definitie	Eenheid
A_{t_i}	adsorptiepercentage op het tijdstip t_i	%
A_{eq}	adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	aan het bodemmonster geadsorbeerde massa teststof bij het adsorptie-evenwicht	μg
m_0	massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de adsorptietest	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa van de teststof, gemeten in een monster (v_a^A) op het tijdstip t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht	μg
m_{soil}	hoeveelheid van het bodemmonster, uitgedrukt in droge massa	g
C_{st}	massaconcentratie van de stockoplossing van de stof	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip $t=0$	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	volume van de waterfase die tijdens de adsorptietest in contact met het bodemmonster is, op het tijdstip $t=0$	cm^3
v_a^A	volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald	cm^3
K_d	verdelingscoëfficiënt voor adsorptie	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	genormaliseerde verdelingscoëfficiënt voor organisch materiaal	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlich-exponent	
D_{t_i}	desorptiepercentage op het tijdstip t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptiepercentage gedurende het tijdsinterval Δt_i	%
K_{des}	schijnbare desorptiecoëfficiënt	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	totale massa van de gedesorbeerde teststof bij het desorptie-evenwicht	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa van de stof die na het tijdsinterval Δt_i aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft	μg
m_{aq}^A	massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht	μg
$C_s^{des}(eq)$	gehalte aan de stof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	massaconcentratie van de teststof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemmonster is	cm^3
V_R	volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume CaCl_2 -oplossing (0,01 M)	cm^3
v_a^D	volume van het monster dat op het tijdstip t_i tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analysedoeleinden wordt genomen	cm^3
V_r^i	volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment (parallele methode) voor de bepaling van de teststof uit buis (i) is genomen	cm^3

V_r^F	volume van de oplossing die voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen	cm^3
MB	massabalans	%
m_E	totale massa van de teststof die in twee stappen uit het bodemonmonster en de wanden van de proefbuis is geëxtraheerd	μg
V_{rec}	volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd	cm^3
P_{ow}	verdelingscoëfficiënt octanol/water	
pKa	dissociatieconstante	
S_w	oplosbaarheid in water	g l^{-1}

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Bekende volumes van oplossingen van de teststof, al dan niet radioactief gelabeld, met een bekende concentratie in 0,01 M CaCl_2 worden toegevoegd aan bodemonsters met een bekend drooggewicht die vooraf zijn geëquilibreerd in 0,01 M CaCl_2 . Het mengsel wordt gedurende een geschikte tijd geschud. De bodemsuspensie wordt vervolgens door centrifugeren en desgewenst filteren gescheiden en de waterfase wordt geanalyseerd. De hoeveelheid aan het bodemonmonster geadsorbeerde teststof wordt berekend als het verschil tussen de hoeveelheid aanvankelijk in de oplossing aanwezige teststof en de hoeveelheid die aan het eind van het experiment is overgebleven (indirecte methode).

Het is ook mogelijk de hoeveelheid geadsorbeerde teststof rechtstreeks door bodemanalyse te bepalen (directe methode). Deze procedure, waarbij de bodemfractie stapsgewijs wordt geëxtraheerd met een geschikt oplosmiddel, wordt aanbevolen voor gevallen waarin het verschil in de concentratie van de stof in de oplossing niet nauwkeurig kan worden bepaald. Voorbeelden van dergelijke gevallen zijn: adsorptie van de teststof aan de wanden van het proefvat, instabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van het experiment, een geringe adsorptie die slechts kleine concentratieveranderingen in de oplossing veroorzaakt en een sterke adsorptie die leidt tot een zo lage concentratie dat deze niet nauwkeurig kan worden bepaald. Als een radioactief gelabelde stof wordt gebruikt, kan in plaats van bodemextractie worden gekozen voor bodemanalyse door verbranding en vloeistofscintillatietelling. Vloeistofscintillatietelling is echter een specifieke techniek waarbij geen onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorspronkelijke stof en omzettingproducten; deze techniek mag dan ook alleen worden gebruikt als de teststof gedurende het hele onderzoek stabiel is.

1.5 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

De gebruikte reagentia moeten chemisch zuiver (p.a.) zijn. Aanbevolen wordt ongelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en bij voorkeur een zuiverheid van minimaal 95% of radioactief gelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en radioactieve zuiverheid te gebruiken. Wanneer tracers met een korte halveringstijd worden gebruikt, moet een vervalcorrectie worden uitgevoerd.

Voordat een adsorptie/desorptietest wordt uitgevoerd, moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn:

- de oplosbaarheid in water (A.6.);
- de dampspanning (A.4.) en/of de constante van de Wet van Henry;
- de niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH (C.7.);
- de verdelingscoëfficiënt (A.8.);
- de "gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid (C.4.) of de aerobe en anaerobe omzetting in de bodem;
- de pKa van ioniseerbare stoffen;
- de directe fotolyse in water (d.w.z. het UV/Vis-absorptiespectrum in water, kwantumopbrengst) en de fotodegradatie op de bodem.

1.6 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De test kan worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid beschikbaar is. Een belangrijke parameter die de betrouwbaarheid van de resultaten kan beïnvloeden, met name wanneer de indirecte methode wordt gebruikt, is de stabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van de test. Een eerste vereiste is dan ook dat de stabiliteit tijdens een voorbereidend onderzoek wordt gecontroleerd; als er binnen de tijdschaal van de test een omzetting wordt waargenomen, wordt aanbevolen bij het hoofdonderzoek zowel de bodem- als de waterfase te analyseren.

Bij de uitvoering van deze test kunnen er problemen ontstaan met stoffen die slecht oplosbaar zijn in water ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) en met stoffen met een hoge lading, aangezien de concentratie in de waterfase in dat geval niet met een voldoende nauwkeurigheid analytisch kan worden bepaald. In deze gevallen moeten er aanvullende maatregelen worden genomen. In de desbetreffende hoofdstukken van deze beschrijving wordt aangegeven hoe deze problemen kunnen worden aangepakt.

Bij het testen van vluchtige stoffen moet ervoor worden gezorgd dat verliezen tijdens de behandeling worden voorkomen.

1.7 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.7.1 Apparatuur en reagentia

Standaard-laboratoriumapparatuur, met name:

- a) Buizen of potten voor de uitvoering van de experimenten. Het is belangrijk dat deze buizen of potten;
 - direct in de centrifuge passen om fouten bij de behandeling en de overbrenging tot een minimum te beperken;
 - van een inert materiaal zijn vervaardigd, zodat de adsorptie van de teststof aan het oppervlak tot een minimum wordt beperkt.
- b) Schudapparaat: overhead-schudder of gelijkwaardige apparatuur; het schudapparaat moet het bodemonmonster tijdens het schudden in suspensie houden.
- c) Centrifuge: bij voorkeur met hoge snelheid, bijvoorbeeld $>3000 \text{ g}$, instelbare temperatuur, in staat om deeltjes met een diameter van meer dan $0,2 \mu\text{m}$ uit een waterige oplossing neer te slaan. De houders moeten tijdens het schudden en centrifugeren worden afgesloten om damp- en waterverlies te voorkomen; om adsorptie aan de dop tot een minimum te beperken moeten gedeactiveerde doppen worden gebruikt, zoals schroefdoppen met teflonbekleding.
- d) Facultatief: filterapparatuur; steriele wegwerpfilters met een porositeit van $0,2 \mu\text{m}$. Bij de keuze van het filtermateriaal moet goed worden opgelet, zodat verliezen van de teststof aan dit materiaal worden voorkomen; voor slecht oplosbare teststoffen wordt organisch filtermateriaal afgeraden.
- e) Analyse-instrumentarium dat geschikt is om de concentratie van de teststof te meten.
- f) Laboratoriumoven die kan worden ingesteld op een temperatuur van $103 \text{ }^\circ\text{C}$ tot $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.7.2 Karakterisering en selectie van de bodem

De bodem moet worden gekarakteriseerd aan de hand van drie parameters die worden geacht grotendeels bepalend voor de adsorptiecapaciteit te zijn: gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH. Zoals reeds is vermeld (zie "Toepassingsgebied"), kunnen ook andere fysisch-chemische eigenschappen van de bodem invloed hebben op de adsorptie/desorptie van een bepaalde stof en daarmee moet in die gevallen rekening worden gehouden.

De voor de karakterisering van de bodem gebruikte methoden zijn heel belangrijk en kunnen een significante invloed op de resultaten hebben. Daarom wordt aanbevolen de pH van de bodem in een 0,01 M CaCl₂-oplossing (de oplossing die bij de adsorptie/desorptietest wordt gebruikt) volgens de desbetreffende ISO-methode (ISO 10390-1) te bepalen. Tevens wordt aanbevolen de andere relevante bodemeigenschappen volgens de standaardmethoden (ISO-handboek voor bodemanalyse) te bepalen; in dat geval kunnen de sorptiegegevens op basis van algeheel gestandaardiseerde bodemparameters worden geanalyseerd. In de referenties (50-52) worden enige richtsnoeren gegeven voor bestaande standaardmethoden voor bodemanalyse en -karakterisering. Voor de kalibratie van bodemtestmethoden wordt het gebruik van referentiebodem aanbevolen.

Tabel 1 bevat richtsnoeren voor de selectie van bodemtypes voor adsorptie/desorptie-experimenten. De zeven vermelde bodemtypes bestrijken het scala dat in gematigde geografische zones voorkomt. Voor ioniseerbare teststoffen moeten de geselecteerde bodemtypes een breed pH-bereik beslaan om de adsorptie van de stof in geïoniseerde en niet-geïoniseerde vorm te kunnen bepalen. Onder punt 1.9 (“Uitvoering van de test”) worden richtsnoeren gegeven voor het aantal verschillende bodemtypes dat in de verschillende fasen van de test moet worden gebruikt.

Als de voorkeur wordt gegeven aan andere bodemtypes, moeten deze aan de hand van dezelfde parameters worden gekarakteriseerd en moet de spreiding van de eigenschappen vergelijkbaar zijn met die van tabel 1, ook al voldoen ze niet exact aan de criteria.

Tabel 1: Richtsnoeren voor de selectie van bodemmonsters voor adsorptie/desorptie

Bodemtype	pH-bereik (in 0,01 M CaCl ₂)	Organisch koolstofgehalte (%)	Kleigehalte (%)	Bodemtextuur*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	klei
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	kleileem
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	siltleem
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	leem
5	< 4,0 - 6,0 [§]	< 0,5 - 1,5 [‡]	< 10 - 15 [§]	lemig zand
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 [‡]	40 - 65	kleileem / klei
7	< 4,5	> 10	< 10	zand / lemig zand

* Volgens het systeem van de FAO en de VS (85).

§ De waarde van deze variabelen moet bij voorkeur binnen het vermelde bereik vallen. Als het echter moeilijk is geschikt bodemmateriaal te vinden, is ook een waarde beneden het vermelde minimum aanvaardbaar.

‡ Bodem met minder dan 0,3% organische koolstof kan de correlatie tussen het gehalte aan organisch materiaal en de adsorptie verstoren. Het verdient dan ook aanbeveling bodem met minimaal 0,3% organische koolstof te gebruiken.

1.7.3 Monsterneming en opslag van bodemmonsters

1.7.3.1 Monsterneming

Er worden geen specifieke technieken of gereedschappen voor monsterneming aanbevolen; de monsternemingstechniek is afhankelijk van het doel van het onderzoek (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Er moet rekening worden gehouden met de volgende overwegingen:

- a) Er moet gedetailleerde achtergrondinformatie over de veldlocatie zijn; daarbij gaat het bijvoorbeeld om de ligging, de vegetatie, behandelingen met pesticiden en/of kunstmest, biologische toevoegingen of onopzettelijke verontreiniging. De aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) moeten bij de beschrijving van de bemonsteringslocatie in acht worden genomen.

- b) De bemonsteringslocatie moet worden gespecificeerd met UTM (Universele Transversale Mercatorprojectie / European Horizontal Datum) of geografische coördinaten; daardoor kan een bepaalde bodem in de toekomst opnieuw worden bemonsterd of kan een betere specificatie van de bodem worden gegeven binnen de uiteenlopende classificatiesystemen die in de verschillende landen worden gebruikt. Tevens mogen monsters alleen in een A-horizont tot maximaal 20 cm diep worden genomen. Met name bij bodemtype nr. 7 moet een O_h-horizont, als deze in de bodem aanwezig is, in het monster worden opgenomen.

De houders waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat significante wijzigingen in de aanvankelijke bodemeigenschappen uitgesloten zijn.

1.7.3.2 *Opslag*

Het gebruik van verse bodemmonsters verdient de voorkeur. Alleen als dit niet mogelijk is, moeten de monsters bij kamertemperatuur en luchtdroog worden bewaard. Er is geen aanbevolen houdbaarheidstermijn, maar monsters die meer dan drie jaar zijn bewaard moeten vóór gebruik opnieuw worden geanalyseerd op hun gehalte aan organische koolstof, pH en capaciteit voor kationuitwisseling.

1.7.3.3 *Behandeling en voorbereiding van bodemmonsters voor de test*

De bodemmonsters worden bij kamertemperatuur (bij voorkeur 20-25 °C) aan de lucht gedroogd. Bij het losmaken moet zo weinig mogelijk kracht worden gebruikt om de oorspronkelijke textuur van de bodem zo veel mogelijk intact te houden. De monsters worden gezeefd tot een deeltjesgrootte ≤ 2 mm; bij het zeven moeten de aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) worden opgevolgd. Een zorgvuldige homogenisering wordt aanbevolen, aangezien de reproduceerbaarheid van de resultaten daardoor wordt bevorderd. Het vochtgehalte van de bodem wordt bij drie monsters bepaald door verhitting op 105 °C tot constant gewicht (ongeveer 12 uur). Bij alle berekeningen wordt onder de massa van het bodemmonster het drooggewicht verstaan, d.w.z. de voor het vochtgehalte gecorrigeerde massa.

1.7.4 **Vorbereiding van de teststof voor de toevoeging aan de bodemmonsters**

De teststof wordt opgelost in 0,01 M CaCl₂ in gedestilleerd of gedeïoniseerd water; de CaCl₂-oplossing wordt als waterfase gebruikt om het centrifugeren te vergemakkelijken en de kationuitwisseling tot een minimum te beperken. De concentratie van de stockoplossing moet bij voorkeur drie ordes van grootte hoger zijn dan de detectiegrens van de gebruikte analysemethode. Deze drempel vormt een waarborg voor nauwkeurige metingen bij de hier gevolgde methode; daarnaast moet de concentratie van de stockoplossing lager zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in water.

De stockoplossing moet bij voorkeur vlak voor de toevoeging aan het bodemmonster worden bereid en moet afgesloten in het donker bij 4 °C worden bewaard. De houdbaarheidstermijn is afhankelijk van de stabiliteit van de teststof en de concentratie in de oplossing.

Alleen bij slecht oplosbare stoffen ($S_w < 10^{-4} \text{ gl}^{-1}$) kan, als het moeilijk is de teststof op te lossen, een solubilisator nodig zijn. Deze solubilisator: (a) moet mengbaar zijn met water, zoals methanol of acetonitril; (b) mag niet in een hogere concentratie dan 1% van het totale volume van de stockoplossing aanwezig zijn en de concentratie in de oplossing van de teststof die met het bodemmonster in contact komt moet lager zijn (bij voorkeur lager dan 0,1%); en (c) mag geen oppervlakte-actieve stof zijn en geen solvolyse-reactie met de teststof aangaan. Het gebruik van een solubilisator moet bij de rapportage van de gegevens worden vermeld en gemotiveerd.

Slecht oplosbare stoffen kunnen ook door “spiking” aan het testsysteem worden toegevoegd: de teststof wordt opgelost in een organisch oplosmiddel en een hoeveelheid daarvan wordt toegevoegd aan het systeem met het bodemmonster en de 0,01 M CaCl₂-oplossing in gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Het gehalte van de waterfase aan organisch oplosmiddel moet zo laag mogelijk worden gehouden, normaal gesproken maximaal 0,1%. “Spiking” uit een organisch oplosmiddel kan als nadeel hebben dat de reproduceerbaarheid qua volume slecht is. Dit betekent dat er sprake is van een extra fout, aangezien de concentratie van de teststof en het co-oplosmiddel niet bij alle tests gelijk is.

1.8 VOORWAARDEN WAARAAN DE UITVOERING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIETEST MOET VOLDOEN

1.8.1 De analysemethode

De belangrijkste parameters die de nauwkeurigheid van de sorptiemetingen kunnen beïnvloeden zijn: de nauwkeurigheid van de analysemethode voor zowel de opgeloste als de geadsorbeerde fase, de stabiliteit en zuiverheid van de teststof, het bereiken van het sorptie-evenwicht, de omvang van de concentratieverandering in de oplossing, de verhouding bodemmonster/oplossing en de veranderingen in de bodemstructuur tijdens de instelling van het evenwicht (35)(59-62). Bijlage 2 bevat enkele voorbeelden die relevant zijn voor de nauwkeurigheid.

De betrouwbaarheid van de gebruikte analysemethode moet worden gecontroleerd op het concentratiebereik dat bij de test wordt verwacht. Het staat de experimentator volledig vrij een geschikte methode te ontwikkelen waarvan de nauwkeurigheid, de precisie, de reproduceerbaarheid, de detectiegrenzen en de recovery aan de eisen voldoen. In het volgende experiment worden richtsnoeren voor de uitvoering van een dergelijke test gegeven.

Een geschikt volume 0,01 M CaCl₂, bijvoorbeeld 100 cm³, wordt gedurende 4 uur geschud met een hoeveelheid, bijvoorbeeld 20 g, van een sterk adsorberend bodemtype, d.w.z. met een hoog gehalte aan organische koolstof en klei; het gebruikte gewicht en volume kan aan de behoefte worden aangepast, maar een verhouding bodemmonster/oplossing van 1:5 is een goed uitgangspunt. Het mengsel wordt gecentrifugeerd en de waterfase kan worden gefiltreerd. Aan deze fase wordt een bekend volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om te zorgen dat de nominale concentratie binnen het bereik ligt dat bij de test wordt verwacht. Om de aard van de oplossing zo weinig mogelijk te veranderen mag dit volume niet groter zijn dan 10% van het uiteindelijke volume van de waterfase. De oplossing wordt geanalyseerd.

Om artefacten in de analysemethode en matrixeffecten van de bodem op te sporen moet één blanco-bepaling met bodemmonster + CaCl₂-oplossing (zonder teststof) worden uitgevoerd.

Voor sorptiemetingen kunnen bijvoorbeeld de volgende analysemethoden worden gebruikt: gaschromatografie (GLC), hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC), spectrometrie (b.v. GC/massaspectrometrie of HPLC/massaspectrometrie) en vloeistofscintillatietelling (voor radioactief gelabelde stoffen). Onafhankelijk van de gebruikte analysemethode wordt deze geschikt geacht als de recovery tussen 90% en 110% van de nominale waarde ligt. Om detectie en evaluatie na de faseverdeling mogelijk te maken moeten de detectiegrenzen van de analysemethode tenminste twee ordes van grootte onder de nominale concentratie liggen.

De kenmerken en detectiegrenzen van de beschikbare analysemethode voor het adsorptie-onderzoek spelen een belangrijke rol bij de bepaling van de testomstandigheden en de hele praktische uitvoering van de test. In de hier gegeven beschrijving wordt een algemene route vermeld en worden aanbevelingen en richtsnoeren gegeven voor andere oplossingen wanneer de analysemethode en de omstandigheden in het laboratorium beperkingen opleggen.

1.8.2

De keuze van een optimale verhouding bodemonmonster/oplossing

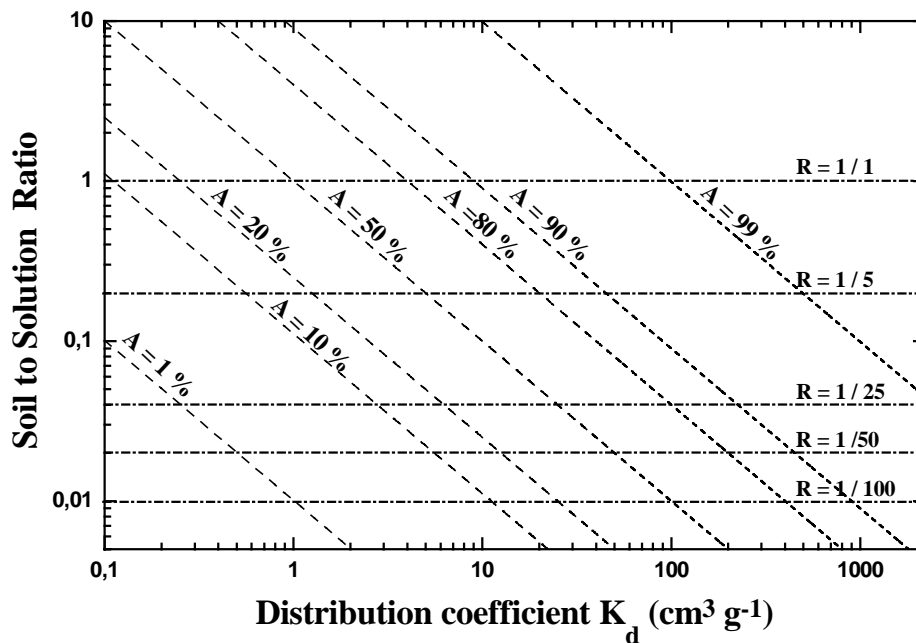
De keuze van een geschikte verhouding bodemonmonster/oplossing voor het sorptie-onderzoek wordt bepaald door de verdelingscoëfficiënt K_d en de gewenste relatieve adsorptie. De verandering van de concentratie van de stof in de oplossing bepaalt de statistische nauwkeurigheid van de meting op basis van de vorm van de adsorptievergelijking en de beperkingen van de analysemethode bij de bepaling van de concentratie van de stof. Daarom is het meestal verstandig een aantal vaste verhoudingen te kiezen waarbij de adsorptie hoger is dan 20% en liefst hoger dan 50% (62), terwijl erop moet worden gelet dat de concentratie van de teststof in de waterfase hoog genoeg blijft om nauwkeurig te kunnen worden gemeten. Dit is vooral belangrijk bij hoge adsorptiepercentages.

Een geschikte manier om de juiste verhouding bodemonmonster/waterfase te kiezen is op basis van een raming van de K_d -waarde door voorbereidend onderzoek of erkende schattingstechnieken (zie bijlage 3). Vervolgens kan een geschikte verhouding worden gekozen op basis van een grafiek waarin de verhouding bodemonmonster/oplossing bij vaste adsorptiepercentages is uitgezet tegen de K_d (zie figuur 1). In deze grafiek wordt uitgegaan van een lineaire adsorptievergelijking¹. Het verband wordt verkregen door vergelijking (4) voor de K_d te herschikken tot vergelijking (1):

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

of in de logaritmische vorm, uitgaande van $R = m_{soil}/V_0$ en $A_{eq}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

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



Figuur 1: Verband tussen de verhouding bodemonmonster/oplossing en K_d bij verschillende adsorptiepercentages.

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

Figuur 1 geeft een overzicht van de vereiste verhouding bodemmonster/oplossing als functie van K_d bij verschillende adsorptiepercentages. Zo wordt bij een verhouding 1:5 en een K_d van 20 ongeveer 80% van de teststof geadsorbeerd. Om bij dezelfde K_d een adsorptie van 50% te krijgen moet een verhouding van 1:25 worden gebruikt. Als de geschikte verhouding bodemmonster/oplossing op deze manier wordt gekozen, geeft dit de nodige flexibiliteit om aan de experimentele behoeften te voldoen.

De gevallen waarin de chemische stof sterk of nauwelijks wordt geadsorbeerd, leveren meer problemen op. Bij een geringe adsorptie wordt een verhouding bodemmonster/oplossing van 1:1 aanbevolen, hoewel bij sommige zeer organische bodemtypes een lagere verhouding nodig kan zijn om een suspensie te verkrijgen. Bij de meting van kleine veranderingen in de concentratie in de oplossing moet zorgvuldig naar de analysemethode worden gekeken om te voorkomen dat de adsorptiemeting onnauwkeurig wordt. Anderzijds kan bij een zeer hoge verdelingscoëfficiënt K_d de verhouding bodemmonster/oplossing worden opgevoerd tot wel 1:100 om ervoor te zorgen dat er een significante hoeveelheid van de stof in de oplossing achterblijft. Er moet echter voor een goede menging worden gezorgd en het systeem moet voldoende tijd krijgen voor de instelling van het evenwicht. Een andere aanpak is schatting van de K_d -waarde met behulp van ramingstechnieken op basis van bijvoorbeeld de P_{ow} -waarde (zie bijlage 3). Dit kan met name nuttig zijn bij slecht geadsorbeerde/polaire stoffen met een $P_{ow} < 20$ en lipofiele/sterk geadsorbeerde stoffen met een $P_{ow} > 10^4$.

1.9 UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1 Testomstandigheden

Alle experimenten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur en indien mogelijk bij een constante temperatuur tussen 20 °C en 25 °C.

Bij het centrifugeren moeten de omstandigheden zodanig zijn dat deeltjes groter dan 0,2 μm uit de oplossing kunnen worden verwijderd. Dit zijn de kleinste deeltjes die als vaste deeltjes worden beschouwd; beneden deze grenswaarde vallen ze in de categorie colloïd-deeltjes. Bijlage 4 bevat richtsnoeren om de centrifugeer-omstandigheden te bepalen.

Als het centrifugeren niet zodanig kan gebeuren dat de verwijdering van grotere deeltjes dan 0,2 μm wordt gewaarborgd, moet een combinatie van centrifugeren en filtreren met filters van 0,2 μm worden gebruikt. Deze filters moeten van een geschikt inert materiaal zijn vervaardigd om verliezen van de teststof daaraan te voorkomen. In elk geval moet worden aangetoond dat er bij het filtreren geen teststof verloren gaat.

1.9.2 Fase 1: Voorbereidend onderzoek

Het doel van de uitvoering van een voorbereidend onderzoek is al in het hoofdstuk “Toepassingsgebied” beschreven. In onderstaande beschrijving worden richtsnoeren gegeven voor de wijze waarop een dergelijk experiment kan worden opgezet.

1.9.2.1 *Selectie van de optimale verhouding bodemmonster/oplossing*

Er worden twee bodemtypes en drie verhoudingen bodemmonster/oplossing gebruikt (zes experimenten). Eén bodemtype heeft een hoog gehalte aan organische koolstof en een laag kleigehalte en het andere een laag gehalte aan organische koolstof en een hoog kleigehalte. De volgende verhoudingen worden aangeraden:

- 50 g bodemmonster en 50 cm^3 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:1);
- 10 g bodemmonster en 50 cm^3 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:5);
- 2 g bodemmonster en 50 cm^3 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:25).

De minimale hoeveelheid bodemmonster waarmee het experiment kan worden uitgevoerd, is afhankelijk van de mogelijkheden van het laboratorium en de gebruikte analysemethode. Om betrouwbare resultaten te krijgen wordt echter aangeraden minimaal 1 g en bij voorkeur 2 g te gebruiken.

Eén controlemonster met uitsluitend de teststof in 0,01 M CaCl_2 -oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan exact dezelfde behandeling onderworpen als de testsystemen om de stabiliteit van de teststof in de CaCl_2 -oplossing en de mogelijke adsorptie aan de wanden van het proefvat te controleren.

Voor elk bodemtype wordt één blanco-bepaling met dezelfde hoeveelheid bodemmonster en een totaalvolume van 50 cm^3 0,01 M CaCl_2 -oplossing (zonder teststof) op dezelfde wijze behandeld. Deze bepaling fungeert als achtergrond tijdens de analyse om storende stoffen of verontreinigde bodem te kunnen signaleren.

Alle experimenten, ook de controle- en blanco-bepalingen, moeten minimaal in duplo worden uitgevoerd. Het totale aantal monsters dat voor het onderzoek nodig is, kan aan de hand van de gevolgde methode worden bepaald.

In het algemeen worden voor het voorbereidend onderzoek en het hoofdonderzoek dezelfde methoden gebruikt. Uitzonderingen op deze regel worden waar nodig vermeld.

De aan de lucht gedroogde bodemmonsters worden geëquilibreerd door de nacht vóór de dag van het experiment (gedurende 12 uur) te schudden met een minimaal volume van 45 cm^3 0,01 M CaCl_2 -oplossing. Vervolgens wordt een bepaald volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om het uiteindelijke volume op 50 cm^3 te brengen. Dit toegevoegde volume stockoplossing: (a) mag niet groter zijn dan 10% van het uiteindelijke volume van de waterfase van 50 cm^3 om de aard van de oplossing vóór equilibreren zo weinig mogelijk te veranderen en (b) moet bij voorkeur leiden tot een beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster (C_0) die ten minste twee ordes van grootte hoger ligt dan de detectiegrens van de analysemethode; deze drempelwaarde waarborgt dat er ook bij een hoge adsorptie (> 90%) nauwkeurige metingen kunnen worden uitgevoerd en dat later de adsorptie-isothermen kunnen worden bepaald. Tevens wordt indien mogelijk een lagere beginconcentratie van de stof (C_0) dan de helft van de oplosbaarheids grens aanbevolen.

De concentratie van de stockoplossing (C_{st}) kan analoog aan het volgende voorbeeld worden berekend: Uitgaande van een detectiegrens van $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$ en een adsorptie van 90% moet de beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster bij voorkeur $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ zijn (twee ordes van grootte hoger dan de detectiegrens). Wanneer het maximale aanbevolen volume van de stockoplossing wordt toegevoegd, d.w.z. 5 cm^3 aan 45 cm^3 geëquilibreerde 0,01 M CaCl_2 -oplossing (=10% van de stockoplossing t.o.v. het totaalvolume van de waterfase van 50 cm^3), moet de concentratie van de stockoplossing $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ zijn; dit is drie ordes van grootte hoger dan de detectiegrens van de analysemethode.

De pH van de waterfase moet voor en na het contact met het bodemmonster worden gemeten, aangezien deze een belangrijke rol bij het hele adsorptieproces speelt, met name bij ioniseerbare stoffen.

Het mengsel wordt geschud totdat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. De daarvoor benodigde tijd varieert sterk, afhankelijk van de stof en het bodemmonster; meestal volstaat een periode van 24 uur (77). Aanbevolen wordt tijdens het voorbereidend onderzoek gedurende een schudperiode van 48 uur achtereenvolgens verschillende monsters te nemen (b.v. na 4, 8, 24 en 48 uur). De analysetijdstippen moeten echter gelet op het werkschema in het laboratorium flexibel worden gehanteerd.

Er zijn twee mogelijkheden voor de analyse van de teststof in de waterige oplossing: (a) de parallele methode en (b) de seriële methode. Met nadruk moet worden gesteld dat de parallele methode weliswaar experimenteel omslachtiger is, maar dat de mathematische behandeling van de resultaten eenvoudiger is (zie bijlage 5). De keuze van de gevolgde methode wordt echter aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

(a) parallele methode: per tijdsinterval waarvoor de adsorptiekinetiek wordt onderzocht, wordt een mengsel met dezelfde verhouding bodemmonster/oplossing bereid. Na bijvoorbeeld 4 uur wordt de waterfase na centrifugeren en desgewenst filteren zo volledig mogelijk uit de eerste buis verwijderd en vervolgens gemeten; na bijvoorbeeld 8 uur gebeurt dit voor de tweede buis, na 24 uur voor de derde buis enz.

(b) seriële methode: voor elke verhouding bodemmonster/oplossing wordt slechts één mengsel in duplo bereid. Op vooraf bepaalde tijdstippen wordt het mengsel gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd; vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Als na het centrifugeren wordt gefiltreerd, moet filtratie van kleine hoeveelheden waterige oplossing in het laboratorium mogelijk zijn. Om te zorgen dat de verhouding bodemmonster/oplossing niet significant verandert en de voor adsorptie beschikbare hoeveelheid oplossing tijdens de test niet afneemt, wordt aanbevolen in totaal niet meer dan 1% van het totale volume van de oplossing voor de analyses te gebruiken.

Het adsorptiepercentage A_{t_1} wordt op elk tijdstip t_1 berekend op basis van de nominale beginconcentratie en de gemeten concentratie op het bemonsteringstijdstip t_1 en gecorrigeerd voor de waarde van de blanco-bepaling. De A_{t_1} wordt uitgezet tegen de tijd (zie figuur 1 in bijlage 5) om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt². Tevens wordt de K_d -waarde bij evenwicht berekend. Op basis van deze K_d -waarde worden geschikte verhoudingen bodemmonster/oplossing uit figuur 1 gekozen, zodat het adsorptiepercentage hoger dan 20% en bij voorkeur hoger dan 50% is (61). Alle vergelijkingen en beginselen voor het tekenen van de curve worden vermeld in het hoofdstuk over Gegevens en rapportage en in bijlage 5.

1.9.2.2 *Bepaling van de equilibratietijd voor adsorptie en de bij evenwicht geadsorbeerde hoeveelheid teststof*

Zoals reeds is vermeld, kan aan de hand van curves waarin A_{t_1} of C_{aq}^{ads} tegen de tijd wordt uitgezet, worden bepaald wanneer het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld en hoeveel teststof bij evenwicht is geadsorbeerd. De figuren 1 en 2 in bijlage 5 zijn voorbeelden van dergelijke curves. De equilibratietijd is de tijd die het systeem nodig heeft om stationair te worden.

Indien bij een bepaald bodemmonster de curve niet horizontaal gaat lopen maar blijft stijgen, kan dit worden veroorzaakt door complicerende factoren zoals biologische afbraak of trage diffusie. Biologische afbraak kan worden aangetoond door het experiment te herhalen met een gesteriliseerd bodemmonster. Als zich ook in dat geval geen evenwicht instelt, moet er worden gezocht naar andere verschijnselen die zich in dat specifieke geval kunnen voordoen; dit kan gebeuren door de experimentele omstandigheden (temperatuur, schudtijd, verhouding bodemmonster/oplossing) te wijzigen. De experimentator moet zelf bepalen of het zinvol is de testprocedure verder uit te voeren, ook al zal zich wellicht geen evenwicht instellen.

1.9.2.3 *Adsorptie aan het oppervlak van het proefvat en stabiliteit van de teststof*

Enige informatie over de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de proefvaten en over de stabiliteit van de stof kan uit een analyse van de controlemonsters worden afgeleid. Als er meer stof verdwijnt dan de standaardafwijking van de analysemethode, kan er sprake zijn van niet-biologische afbraak en/of adsorptie aan het oppervlak van het proefvat. Deze verschijnselen kunnen van elkaar worden onderscheiden door de wanden van het proefvat grondig te wassen met een bekend volume van een geschikt oplosmiddel en de wasvloeistof op de teststof te analyseren. Als er geen adsorptie aan het oppervlak van het proefvat wordt waargenomen, wijst het verdwijnen van de teststof op niet-biologische afbraak. Als er wel adsorptie wordt geconstateerd, moeten er proefvaten van een ander materiaal worden gebruikt. De bij dit experiment verkregen gegevens over de adsorptie aan het oppervlak van de proefvaten kunnen echter niet rechtstreeks naar het experiment met bodemmonster/oplossing worden geëxtrapoleerd, aangezien deze adsorptie door de aanwezigheid van het bodemmonster wordt beïnvloed.

Aanvullende informatie over de stabiliteit van de teststof kan worden verkregen door de bepaling van de massabalans van de teststof in de loop van de tijd. Dit betekent dat de waterfase, bodemextracten en de wanden van het proefvat op de teststof worden geanalyseerd. Het verschil tussen de toegevoegde massa en de som van de hoeveelheden die in de waterfase en bodemextracten en aan de wanden van het proefvat worden teruggevonden, is gelijk aan de afgebroken en/of verdampte en/of niet-geëxtraheerde hoeveelheid. Om een massabalans te kunnen bepalen moet het adsorptie-evenwicht zich binnen de periode waarin het experiment wordt uitgevoerd, hebben ingesteld.

² Curves waarin de concentratie van de teststof in de waterfase (C_{aq}^{ads}) wordt uitgezet tegen de tijd, kunnen ook worden gebruikt om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt (zie figuur 2 in bijlage 5).

De massabalans wordt bepaald voor beide bodemtypes en één verhouding bodemmonster/oplossing per bodemtype waarbij de depletie bij evenwicht hoger is dan 20% en bij voorkeur hoger dan 50%. Wanneer het experiment om de verhouding te bepalen wordt afgerond met de analyse van het laatste monster van de waterfase na 48 uur, worden de fasen door centrifugeren en desgewenst filtreren gescheiden. De waterfase wordt zo volledig mogelijk verwijderd en aan de bodemfase wordt een geschikt oplosmiddel (een extractiecoëfficiënt van minimaal 95%) toegevoegd om de teststof te extraheren. Aanbevolen wordt deze extractie tenminste twee maal na elkaar uit te voeren. De hoeveelheid teststof in het bodem- en het proefvatextract wordt gemeten en de massabalans wordt bepaald (zie vergelijking 10 in het hoofdstuk Gegevens en rapportage). Als de massabalans lager is dan 90%, wordt de teststof geacht binnen de tijdschaal van de test instabiel te zijn. Het onderzoek kan dan wel worden voortgezet, mits echter rekening wordt gehouden met de instabiliteit van de teststof; in dit geval wordt aanbevolen in het hoofdonderzoek beide fasen te analyseren.

1.9.2.4 *Fase 2: Adsorptiekinetiek bij één concentratie van de teststof*

Er worden vijf bodemtypes gebruikt, die uit tabel 1 worden gekozen. Indien mogelijk verdient het aanbeveling enkele of alle bodemtypes uit het voorbereidende onderzoek te gebruiken, omdat in dat geval fase 2 voor deze bodemtypes niet hoeft te worden herhaald.

Op basis van de resultaten van het voorbereidend onderzoek worden de equilibratietijd, de verhouding bodemmonster/oplossing, het gewicht van het bodemmonster, het volume van de waterfase in contact met het bodemmonster en de concentratie van de teststof in de oplossing gekozen. Analyse moet bij voorkeur gebeuren na ongeveer 2, 4, 6, 8 (indien mogelijk ook 10) en 24 uur contacttijd; de schudtijd kan tot maximaal 48 uur worden verlengd, wanneer is gebleken dat een stof een langere equilibratietijd vergt. De analysetijdstippen kunnen echter met enige flexibiliteit worden bepaald.

Elk experiment (één bodemmonster en één oplossing) wordt tenminste in duplo uitgevoerd om de spreiding van de resultaten te kunnen bepalen. In elk experiment wordt één blanco-bepaling opgenomen. Daarbij worden dezelfde massa bodemmonster en hetzelfde volume 0,01 M CaCl₂-oplossing (zonder teststof) als bij het experiment gebruikt. Een controlemonster met alleen de teststof in 0,01 M CaCl₂-oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen om onverwachte afwijkingen te kunnen constateren.

Het adsorptiepercentage wordt op elk tijdstip (A_{t_1}) en/of over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t_1}$) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens worden de verdelingscoëfficiënt K_d bij evenwicht en de genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof K_{oc} (voor apolaire organische stoffen) berekend.

Resultaten van de bepaling van de adsorptiekinetiek

De lineaire K_d -waarde is meestal een nauwkeurige beschrijving van het sorptiegedrag in de bodem (35)(78) en geeft de inherente mobiliteit van chemische stoffen in de bodem aan. Zo worden chemische stoffen met een $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ in het algemeen als mobiel beschouwd. Ook op basis van de K_{oc} -waarden is een indelingssysteem voor de mobiliteit opgezet door MacCall *et al.* (16). Daarnaast zijn er indelingssystemen voor de uitloging op basis van een verband tussen K_{oc} en DT-50³ (32)(79).

Op basis van een foutenanalyse (61) is geconcludeerd dat K_d -waarden lager dan $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ niet nauwkeurig kunnen worden bepaald aan de hand van een afname van de concentratie in de waterfase, zelfs als de (met het oog op de nauwkeurigheid) gunstigste verhouding bodemmonster/oplossing, d.w.z. 1:1, wordt gebruikt. In dit geval wordt een analyse van beide fasen, zowel bodem als oplossing, aanbevolen.

³ DT-50: tijd waarin 50% van de teststof wordt afgebroken.

Gelet op bovenstaande opmerkingen wordt aanbevolen het onderzoek naar het adsorptiegedrag van een chemische stof in de bodem en zijn potentiële mobiliteit uit te breiden met een bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich, wanneer een nauwkeurige bepaling van K_d met het hier beschreven experimentele protocol mogelijk is. Een nauwkeurige bepaling is mogelijk als vermenigvuldiging van K_d met de verhouding bodemmonster/oplossing een getal groter dan 0,3 oplevert wanneer de daling van de concentratie in de waterfase wordt gemeten (indirecte methode) of een getal groter dan 0,1 wanneer beide fasen worden geanalyseerd (directe methode) (61).

1.9.2.5 *Fase 3: Adsorptie-isothermen en desorptiekinetiek/desorptie-isothermen*

1.9.2.5.1 Adsorptie-isothermen

Er worden vijf concentraties van de teststof gebruikt, die bij voorkeur twee ordes van grootte beslaan; bij de keuze van deze concentraties moet rekening worden gehouden met de oplosbaarheid in water en de resulterende evenwicht-concentraties in de waterfase. Per bodemmonster moet in het hele onderzoek dezelfde verhouding bodem/oplossing worden gebruikt. De adsorptietest wordt volgens bovenstaande methode uitgevoerd, met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal wordt geanalyseerd op het tijdstip waarop het evenwicht zich heeft ingesteld, zoals bepaald tijdens fase 2. De evenwichtsconcentraties in de oplossing worden bepaald en de geadsorbeerde hoeveelheid wordt aan de hand van de afname van de hoeveelheid teststof in de oplossing berekend of met de directe methode bepaald. De geadsorbeerde massa teststof per massa-eenheid bodemmonster wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage).

Resultaten van de bepaling van de adsorptie-isotherm

Van de tot op heden gesuggereerde mathematische modellen voor de adsorptie wordt voor de beschrijving van het adsorptieproces meestal de Freundlich-isotherm gebruikt. Gedetailleerdere informatie over de interpretatie en relevantie van adsorptiemodellen is te vinden in de referenties (41)(45)(80)(81)(82).

NB: Er dient te worden opgemerkt dat een vergelijking van de waarde van K_F (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) voor verschillende stoffen alleen mogelijk is als deze K_F -waarden in dezelfde eenheden worden uitgedrukt (83).

1.9.2.5.2 Desorptiekinetiek

Dit experiment is bedoeld om na te gaan of een chemische stof reversibel of irreversibel aan de bodem wordt geadsorbeerd. Deze informatie is belangrijk, aangezien het desorptieproces ook bij het gedrag van een stof in de praktijk situatie een belangrijke rol speelt. Bovendien kunnen desorptiegegevens goed worden gebruikt bij computermodellen voor uitloging en de simulering van de afspoeling van opgeloste stoffen. Als een desorptie-onderzoek gewenst wordt, wordt aanbevolen de hier beschreven methode te volgen voor elk systeem waarvoor een nauwkeurige bepaling van K_d bij de reeds beschreven methode ter bepaling van de adsorptiekinetiek mogelijk was.

Net als voor de bepaling van de adsorptiekinetiek zijn er twee mogelijkheden voor de uitvoering van het desorptiekinetiek-experiment: (a) de parallelle methode en (b) de seriële methode. De keuze van de gevolgde methode wordt aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

(a) parallele methode: voor elk bodemonmonster waarvoor het desorptie-onderzoek wordt uitgevoerd, wordt per tijdsinterval waarvoor de desorptiekinetiek wordt onderzocht, een mengsel met dezelfde verhouding bodemonmonster/oplossing bereid. Bij voorkeur dienen dezelfde tijdsintervallen als bij het adsorptiekinetiek-experiment te worden gebruikt; het totale tijdsinterval kan echter waar nodig worden verlengd om te zorgen dat het desorptie-evenwicht zich kan instellen. Voor elk experiment (één bodemonmonster, één oplossing) wordt één blanco-bepaling uitgevoerd met dezelfde hoeveelheid bodemonmonster en 0,01 M CaCl₂-oplossing (zonder teststof) als bij het experiment. Een controlemonster met de teststof in 0,01 M CaCl₂-oplossing (zonder bodemonmonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen. Alle mengsels van bodemonmonster met oplossing worden geschud totdat het adsorptie-evenwicht (zoals bepaald tijdens fase 2) zich instelt. Vervolgens worden de fasen door centrifugeren gescheiden en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl₂-oplossing zonder teststof en het nieuwe mengsel wordt opnieuw geschud. De waterfase van de eerste buis wordt na bijvoorbeeld 2 uur zo volledig mogelijk verwijderd en gemeten, van de tweede buis na 4 uur, van de derde buis na 6 uur enz., totdat het desorptie-evenwicht wordt bereikt.

(b) seriële methode: na het adsorptiekinetiek-experiment wordt het mengsel gecentrifugeerd en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl₂-oplossing zonder teststof. Het nieuwe mengsel wordt geschud totdat het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. Tijdens deze periode wordt het mengsel op vooraf bepaalde tijdstippen gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd; vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Het volume van elk monster voor de analyse mag niet groter zijn dan 1% van het totale volume. Om te zorgen dat de verhouding bodemonmonster/oplossing niet verandert wordt het mengsel aangevuld met hetzelfde volume verse 0,01 M CaCl₂-oplossing en vervolgens wordt het schudden hervat tot het volgende analysetijdstip.

Het desorptiepercentage wordt op elk tijdstip (D_{t_1}) en/of over elk tijdsinterval ($D_{\Delta t_1}$) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens wordt de desorptiecoëfficiënt K_{des} bij evenwicht berekend. Alle benodigde vergelijkingen zijn vermeld in het hoofdstuk Gegevens en rapportage en bijlage 5.

Resultaten van het desorptiekinetiek-experiment

Door het desorptiepercentage D_{t_1} en het adsorptiepercentage A_{t_1} in één figuur tegen de tijd uit te zetten kan de omkeerbaarheid van het adsorptieproces worden bepaald. Als het desorptie-evenwicht zich binnen uiterlijk twee maal de equilibratietijd voor de adsorptie instelt en in totaal meer dan 75% van de geadsorbeerde hoeveelheid wordt gedesorbeerd, wordt de adsorptie als reversibel beschouwd.

1.9.2.5.3 Desorptie-isothermen

Desorptie-isothermen volgens Freundlich worden bepaald voor de bodemonsters waarvoor ook de adsorptie-isothermen zijn bepaald. De uitvoering van het experiment gebeurt net als bij de bepaling van de desorptiekinetiek met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal, bij het desorptie-evenwicht, wordt geanalyseerd. De gedesorbeerde hoeveelheid teststof wordt berekend. De hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft, wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof in de oplossing (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage en bijlage 5).

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

De analysegegevens worden in de vorm van tabellen weergegeven (zie bijlage 6). De afzonderlijke metingen en de berekende gemiddelden worden vermeld. De adsorptie-isothermen worden grafisch weergegeven. De berekeningen worden volgens onderstaande voorschriften uitgevoerd.

In dit verband wordt ervan uitgegaan dat 1 cm³ waterige oplossing 1 g weegt. De verhouding bodemonmonster/oplossing kan in eenheden g/g of g/vol met hetzelfde getal worden weergegeven.

The adsorptie (A_{t_i}) wordt gedefinieerd als het percentage van de aan het begin van de test aanwezige stof dat onder de testomstandigheden aan het bodemmonster wordt geadsorbeerd. Als de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het vat wordt geadsorbeerd, wordt A_{t_i} op elk tijdstip t_i als volgt berekend:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

Hierbij is:

A_{t_i} = adsorptiepercentage op het tijdstip t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa van de op het tijdstip t_i aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof (μg);

m_0 = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test (μg).

Bijlage 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het adsorptiepercentage A_{t_i} voor de parallelle en seriële methode wordt berekend.

De verdelingscoëfficiënt K_d is de verhouding tussen het gehalte van de bodemfase aan de stof en de massaconcentratie van de stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het adsorptie-evenwicht is bereikt.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

Hierbij is:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = gehalte aan de geadsorbeerde stof in het bodemmonster bij het adsorptie-evenwicht ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massaconcentratie van de stof in de waterfase bij adsorptie-evenwicht ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Deze concentratie wordt door analyse bepaald, waarbij rekening wordt gehouden met het resultaat van de blanco-bepaling;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = bij adsorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerde massa teststof (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa van de stof in de oplossing bij adsorptie-evenwicht (μg);

m_{soil} = hoeveelheid van het bodemmonster, uitgedrukt in droge massa (g);

V_0 = volume van de waterfase die aan het begin van de test in contact met het bodemmonster is (cm^3).

Het verband tussen A_{eq} en K_d is:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

Hierbij is:

A_{eq} = adsorptiepercentage bij adsorptie-evenwicht in %.

De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof K_{oc} geeft het verband aan tussen de verdelingscoëfficiënt K_d en het gehalte van het bodemmonster aan organische koolstof:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

Hierbij is:

$\%OC$ = percentage organische koolstof in het bodemmonster (g g^{-1}).

K_{oc} is een coëfficiënt die vooral kenmerkend is voor de verdeling van apolaire organische stoffen over de organische koolstof in de bodem of het sediment en water. De adsorptie van deze stoffen is gecorreleerd aan het gehalte van de sorberende vaste stof aan organisch materiaal (7); K_{oc} is derhalve afhankelijk van de specifieke kenmerken van de humusfracties die door verschillen in onder andere herkomst en ontstaanswijze aanzienlijke verschillen in sorptiecapaciteit vertonen.

2.1.1 Adsorptie-isothermen

De vergelijking voor de adsorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de geadsorbeerde hoeveelheid teststof en de concentratie van de teststof in oplossing bij evenwicht (vergelijking 8).

De gegevens worden behandeld als onder “Adsorptie” en voor elke proefbuis wordt het gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof na de adsorptietest ($C_s^{ads}(eq)$), elders aangegeven als x/m) berekend.

Aangenomen wordt dat het evenwicht zich heeft ingesteld en dat $C_s^{ads}(eq)$ de waarde bij evenwicht vertegenwoordigt:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

De adsorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

of in de lineaire vorm:

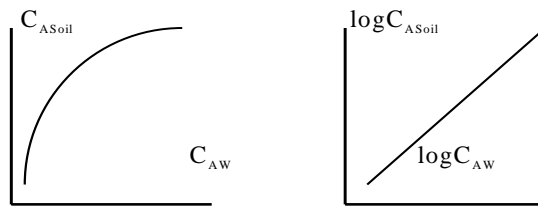
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

Hierbij is:

K_F^{ads} = de adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich; de dimensie is uitsluitend $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ als $1/n = 1$; in alle andere gevallen wordt de helling $1/n$ geïntroduceerd in de dimensie van K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$);

n = de regressieconstante; $1/n$ ligt meestal tussen 0,7 en 1,0 hetgeen aangeeft dat de sorptiegegevens vaak enigszins niet-lineair zijn.

De vergelijkingen (8) en (9) worden uitgezet en de waarden van K_F^{ads} en $1/n$ worden berekend door regressie-analyse met behulp van vergelijking (9). De correlatiecoëfficiënt r^2 van de log-vergelijking wordt ook berekend. Figuur 2 bevat een voorbeeld van dergelijke curves.



Figuur 2: Freundlich-adsorptiecurves, normaal en lineair

2.1.2

Massabalans

De massabalans (MB) wordt gedefinieerd als het percentage van een stof dat na een adsorptietest door analyse wordt teruggevonden in vergelijking met de nominale hoeveelheid stof aan het begin van de test.

De behandeling van de gegevens verschilt voor oplosmiddelen die al dan niet volledig mengbaar zijn met water. Voor met water mengbare oplosmiddelen kan de onder "Desorptie" beschreven behandeling van de gegevens worden gebruikt om de door oplosmiddelextractie teruggevonden hoeveelheid stof te bepalen. Als het oplosmiddel minder goed mengbaar is met water, moet de teruggevonden hoeveelheid apart worden bepaald.

De massabalans MB voor de adsorptie wordt als volgt berekend (aangenomen wordt dat de term (m_E) overeenkomt met de totale hoeveelheid teststof die met een organisch oplosmiddel uit het bodemmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd):

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

Hierbij is:

MB = massabalans (%);

m_E = totale hoeveelheid teststof die in twee stappen uit het bodemmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd (μg);

C_0 = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip $t=0$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd (cm^3).

2.2 DESORPTIE

De desorptie (D) wordt gedefinieerd als het percentage van de teststof dat onder de testomstandigheden wordt gedesorbeerd in vergelijking met de hoeveelheid stof die daarvoor was geadsorbeerd:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

Hierbij is:

D_{t_i} = desorptiepercentage op het tijdstip t_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa van de bij adsorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof (μg).

Bijlage 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het desorptiepercentage D_{t_i} voor de parallelle en de seriële methode wordt berekend.

De schijnbare desorptiecoëfficiënt (K_{des}) is de verhouding tussen het resterende gehalte van de bodemfase aan de stof en de massaconcentratie van de gedesorbeerde stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het desorptie-evenwicht is bereikt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

Hierbij is:

K_{des} = desorptiecoëfficiënt ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totale massa van de bij desorptie-evenwicht uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (μg);

V_T = totaalvolume van de waterfase die tijdens de desorptiekinetiek-test in contact met het bodemmonster is (cm^3).

In bijlage 5 worden in het hoofdstuk “Desorptie” richtsnoeren gegeven voor de berekening van $m_{aq}^{des}(eq)$.

Opmerking

Als de adsorptietest volgens de parallelle methode werd uitgevoerd, wordt het volume V_T in vergelijking (12) gelijkgesteld aan V_0 .

2.2.1 Desorptie-isothermen

De vergelijking voor de desorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de hoeveelheid teststof die aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft en de concentratie van de teststof in oplossing bij het desorptie-evenwicht (vergelijking 16).

Voor elke proefbuis wordt de hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft, als volgt berekend:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) wordt gedefinieerd als:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad (\mu\text{g}) \quad (14)$$

Hierbij is:

$C_{\text{s}}^{\text{des}}$ (eq) = gehalte aan de teststof dat bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}$ (eq) = analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht (μg);

m_{aq}^{A} = massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{F}^{F} = volume van de oplossing dat voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen (cm^3);

V_{R} = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis is verwijderd en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl_2 -oplossing (cm^3);

De desorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

of in de lineaire vorm:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

Hierbij is:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = de desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich;

n = de regressieconstante;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = de massaconcentratie van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

De vergelijkingen (16) en (17) kunnen worden uitgezet en K_F^{des} en $1/n$ worden berekend door regressie-analyse met behulp van vergelijking (17).

Opmerking:

Als de adsorptie- of desorptie-exponent volgens Freundlich ($1/n$) gelijk is aan 1, is de adsorptie- of desorptie-coëfficiënt volgens Freundlich (K_F^{ads} respectievelijk K_F^{des}) gelijk aan de adsorptie- of desorptie-evenwichtsconstante (K_d respectievelijk K_{des}) en is de curve van C_s tegen C_{aq} lineair. Als de exponent niet gelijk is aan 1, is de curve van C_s tegen C_{aq} niet lineair en varieert de adsorptie- en desorptieconstante over de isotherm.

2.2.2

TESTVERSLAG

In het testsverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

- Volledige identificatie van de gebruikte bodemmonsters met vermelding van:
 - geografische gegevens van de locatie (lengte en breedte);
 - datum van monsterneming;
 - gebruikspatroon (landbouw, bosbouw, ...);
 - diepte van monsterneming;
 - zand/silt/kleigehalte;
 - pH-waarden (in 0,01 M CaCl_2);
 - gehalte aan organische koolstof;
 - gehalte aan organisch materiaal;
 - stikstofgehalte;
 - C/N-verhouding;
 - kationuitwisselingscapaciteit (mmol/kg);
 - alle informatie over het verzamelen en de opslag van bodemmonsters;
 - indien van toepassing, alle relevante informatie voor de interpretatie van de adsorptie/desorptie van de teststof;
 - referentie van de methoden die voor de bepaling van de verschillende parameters zijn gebruikt;
- informatie over de teststof, indien van toepassing;
- temperatuur van de experimenten;
- omstandigheden bij het centrifugeren;
- analysemethode die voor de bepaling van de teststof is gebruikt;
- motivering voor een eventueel gebruik van een solubilisator bij de bereiding van de stockoplossing van de teststof;
- verklaring voor correcties bij de berekeningen, indien van toepassing;
- gegevens aan de hand van het formulier daarvoor (bijlage 6) en grafische afbeeldingen;
- alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de testresultaten.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzele O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

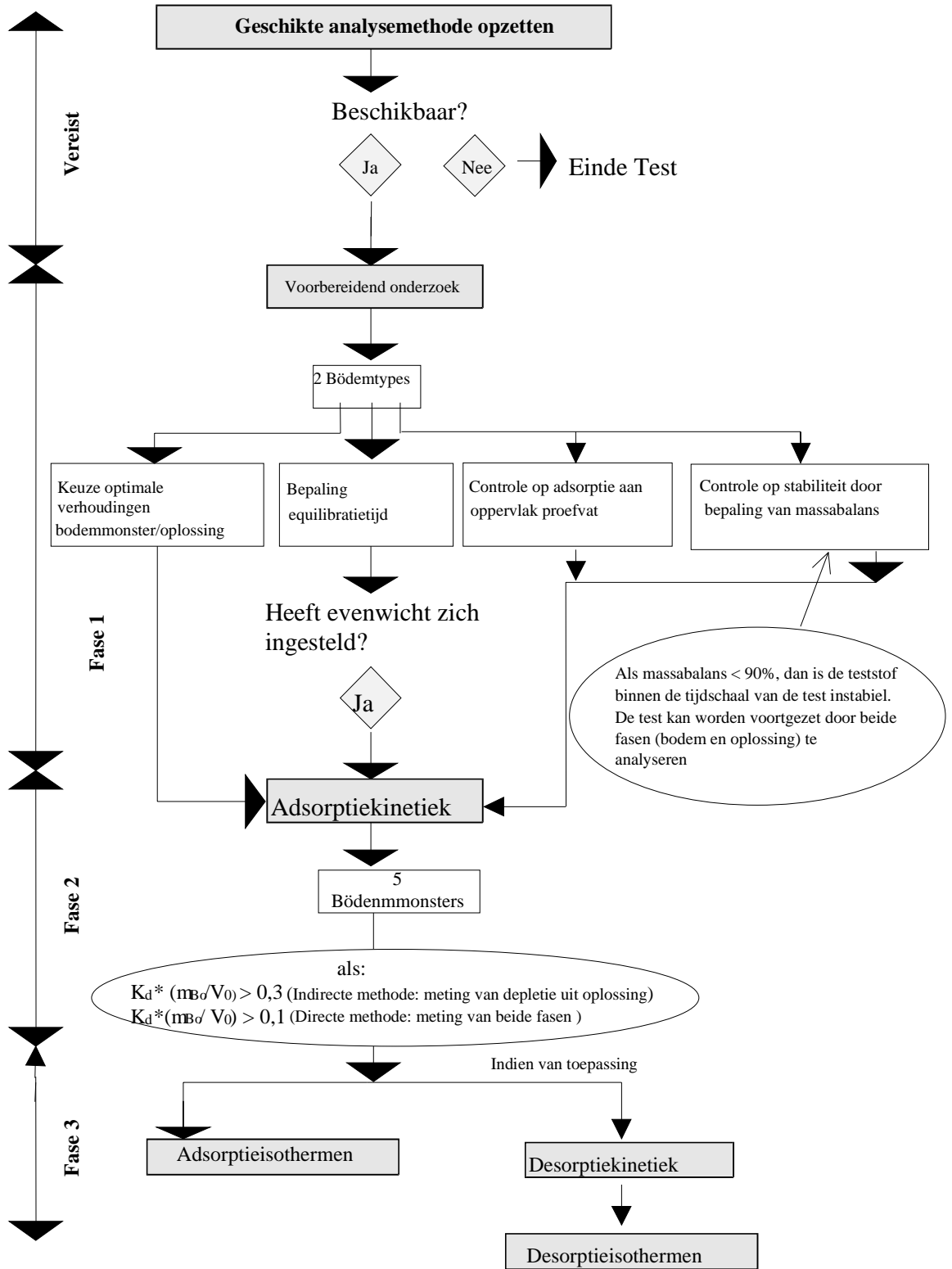
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. " Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), " Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

BIJLAGE I

Testschema



BIJLAGE 2

**INVLOED VAN DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ANALYSEMETHODE EN DE CONCENTRATIE-
VERANDERING OP DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ADSORPTIERESULTATEN**

Uit onderstaande tabel (84) blijkt duidelijk dat wanneer het verschil tussen de aanvankelijke massa ($m_0=110$ μg) en de evenwichtsmassa ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$) van de teststof in de oplossing heel klein is, een fout van 5% in de meting van de evenwichtsconcentratie leidt tot een fout van 50% bij berekening van het gehalte aan de stof dat aan het bodemonmonster is geadsorbeerd ($m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$) en van 52,4% bij de berekening van K_d .

Hoeveelheid bodemonmonster $m_{\text{soil}} = 10$ g
 Volume van de oplossing $V_0 = 100$ cm^3

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110$ μg of $C_0=1,100$ $\mu\text{g/cm}^3$	VOOR A = 9%							
	100	1,000	ware waarde	10	1,00	ware waarde	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
$m_0 = 110$ μg of $C_0=1,100$ $\mu\text{g/cm}^3$	VOOR A = 55%							
	50,0	0,500	ware waarde	60,0	6,00	ware waarde	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
$m_0 = 110$ μg of $C_0=1,100$ $\mu\text{g/cm}^3$	VOOR A = 99%							
	1,100	0,011	ware waarde	108,9	10,89	ware waarde	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa van de teststof in de bodemfase bij evenwicht (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa van de teststof in de waterfase bij evenwicht (μg);

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = gehalte van de bodemfase aan de teststof bij evenwicht ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massaconcentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

R = analysefout in de bepaling van $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R^\ddagger = fout in berekening ten gevolge van de analysefout R .

BIJLAGE 3

SCHATTINGSTECHNIKEN VOOR K_d

1. Schattingstechnieken maken een prognose van K_d mogelijk op basis van een correlatie met bijvoorbeeld P_{ow} -waarden (12)(39)(63-68), gegevens over de oplosbaarheid in water (12)(19)(21)(39)(68-73), of polariteitsgegevens die door HPLC bij omgekeerde fase zijn verkregen (74-76). K_{oc} of K_{om} wordt berekend met behulp van de vergelijkingen in de tabellen 1 en 2 en vervolgens wordt K_d berekend uit de vergelijkingen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Deze correlaties zijn gebaseerd op twee uitgangspunten: (1) de adsorptie van een stof wordt vooral bepaald door het organisch materiaal in de bodem en (2) de interacties daarbij zijn voornamelijk niet-polair. Dit betekent dat deze correlaties: (1) niet of slechts tot op zekere hoogte gelden voor polaire stoffen en (2) niet kunnen worden gebruikt wanneer het gehalte van de bodem aan organisch materiaal zeer laag is (12). Bovendien is de correlatie tussen P_{ow} en de adsorptie wel bevredigend gebleken (19), maar kan dit niet worden gezegd voor het verband tussen de oplosbaarheid in water en de adsorptie (19)(21); tot op heden zijn de resultaten van de studies zeer tegenstrijdig.

3. In de tabellen 1 en 2 worden enkele voorbeelden gegeven van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en respectievelijk de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de oplosbaarheid in water.

Tabel 1: Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de verdelingscoëfficiënt octanol/water; zie voor andere voorbeelden (12) en (68).

Stoffen	Correlaties	Auteurs
Gesubstitueerde ureum-verbindingen	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Gechlorideerde aromaten	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatische koolwaterstoffen	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabel 2: Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de oplosbaarheid in water; zie voor andere voorbeelden (68) en (69).

Stoffen	Correlaties	Auteurs
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Gechlorideerde alifaten en aromaten	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cyclische alifaten en aromaten	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Uiteenlopende stoffen	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

BIJLAGE 4

BEREKENINGEN VOOR DE BEPALING VAN DE CENTRIFUGEER-OMSTANDIGHEDEN

1. Voor de centrifugeertijd geldt, uitgaande van ronde deeltjes, de volgende formule:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln \left(\frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1)$$

Ter vereenvoudiging worden alle parameters in niet-SI-eenheden (g, cm) beschreven.

Hierbij is:

ω	=	rotatiesnelheid (= 2π rpm/60) in rad s^{-1} ;
rpm	=	aantal omwentelingen per minuut;
η	=	viscositeit van de oplossing in $\text{g s}^{-1} \text{cm}^{-1}$;
r_p	=	straal van de deeltjes in cm;
ρ_s	=	dichtheid van het bodemmonster in g cm^{-3} ;
ρ_{aq}	=	dichtheid van de oplossing in g cm^{-3} ;
R_t	=	afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en het vloeistofoppervlak in de centrifugebuis in cm;
R_b	=	afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en de bodem van de centrifugebuis in cm;
$R_b - R_t$	=	hoogte van het mengsel bodemmonster/oplossing in de centrifugebuis in cm.

Om een volledige scheiding te waarborgen moet in het algemeen het dubbele van de berekende tijd worden gebruikt.

2. Vergelijking (1) kan verder worden vereenvoudigd als we ervan uitgaan dat de viscositeit (η) en de dichtheid (ρ_{aq}) van de oplossing gelijk zijn aan de viscositeit en de dichtheid van water bij 25 °C, d.w.z. $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{cm}^{-1}$ en $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$.

In dat geval geldt voor de centrifugeertijd:

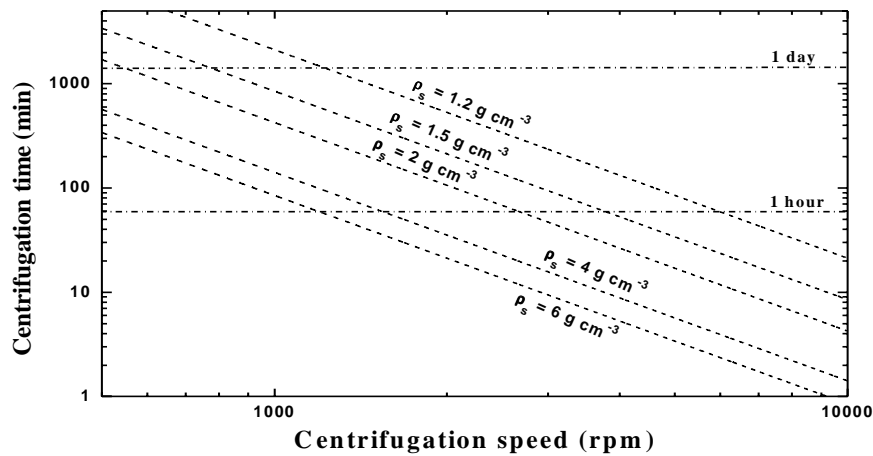
$$t = \frac{3,7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Uit vergelijking (2) blijkt dat voor een scheiding van deeltjes met een specifieke grootte (in ons geval een straal van 0,1 μm) twee parameters belangrijk zijn bij de bepaling van de centrifugeeromstandigheden (tijd en snelheid): (1) de dichtheid van het bodemmonster en (2) de hoogte van het mengsel in de centrifugebuis ($R_b - R_t$), d.w.z. de afstand die een bodemdeeltje van het vloeistofoppervlak van de oplossing naar de bodem van de buis moet afleggen; bij een vast volume wordt de hoogte van het mengsel in de buis uiteraard bepaald door het kwadraat van de straal van de buis.

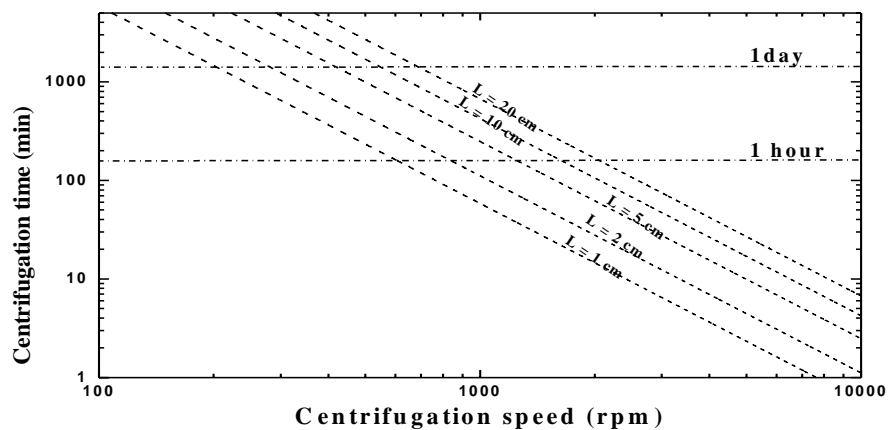
4. Figuur 1 geeft het verband tussen centrifugeertijd (t) en -snelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid (ρ_s) (figuur 1a) en uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis (figuur 1b). Uit figuur 1a blijkt duidelijk wat de invloed van de bodemdichtheid is: bij een gangbare centrifugeersnelheid van 3.000 rpm is de centrifugeertijd ongeveer 240 minuten bij een bodemdichtheid van 1,2 g cm^{-3} en slechts 50 minuten bij 2,0 g cm^{-3} . Figuur 1b levert voor een gangbare centrifugeersnelheid van 3.000 rpm ongeveer 50 minuten op bij een hoogte van het mengsel van 10 cm en slechts 7 minuten bij een hoogte van 1 cm. Het is echter belangrijk dat er een optimaal compromis wordt gevonden tussen zo kort mogelijk centrifugeren en optimaal gebruiksgemak bij de scheiding van de fasen na het centrifugeren.

5. Bovendien moet bij de bepaling van de experimentele omstandigheden bij het scheiden van bodemfase en oplossing worden bedacht dat er een derde “pseudofase” kan ontstaan: colloïden. Deze deeltjes met een grootte van minder dan $0,2 \mu\text{m}$ kunnen een belangrijke rol spelen bij het hele adsorptiemechanisme van een stof in een bodemsuspensie. Wanneer wordt gecentrifugeerd zoals hierboven is beschreven, blijven de colloïden in de waterfase en worden ze tegelijk met de waterfase geanalyseerd. Dit betekent dat de informatie over het effect van deze deeltjes verloren gaat.

Als het laboratorium beschikt over ultracentrifuges of ultrafiltratie-faciliteiten, kan de adsorptie/desorptie van een stof in de bodem diepgaander worden onderzocht en kan ook informatie worden verkregen over de adsorptie van de stof aan colloïden. In dit geval moet ultracentrifugatie bij 60.000 rpm of ultrafiltratie met een porositeit van 100.000 Dalton worden gebruikt voor een scheiding van de drie fasen bodem, colloïden en oplossing. Het testprotocol moet ook dienovereenkomstig worden gewijzigd, zodat de analyse van de stof bij alle drie fasen wordt uitgevoerd.



Figuur 1a: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bij $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

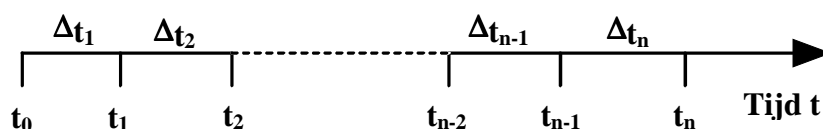


Figuur 1b: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bij $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

BIJLAGE 5

BEREKENING VAN DE ADSORPTIE A (%) EN DESORPTIE D (%)

Het tijdschema voor de procedure is:



Voor alle berekeningen wordt ervan uitgegaan dat de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het proefvat wordt geadsorbeerd.

ADSORPTIE A (%)

a) Parallele methode

Het adsorptiepercentage wordt voor elke proefbuis (i) op elk tijdstip t_i berekend volgens de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

De factoren in deze vergelijking worden als volgt berekend:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

Hierbij is:

A_{t_i} = adsorptiepercentage (%) op het tijdstip t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa van de aan het bodemonmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd (μg);

m_0 = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test (μg);

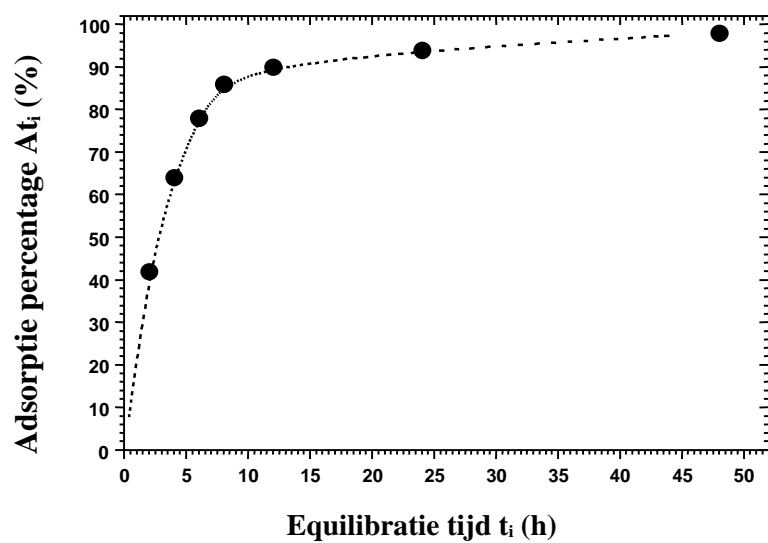
C_0 = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemonmonster op het tijdstip $t=0$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd ($\mu\text{g cm}^{-3}$); deze concentratie wordt door analyse bepaald, rekening houdend met de resultaten van de blanco-bepaling;

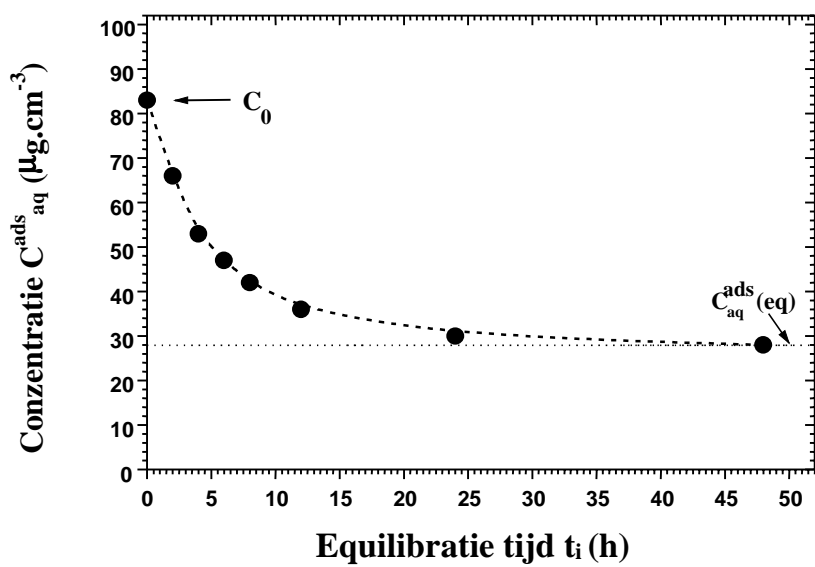
V_0 = volume van de testoplossing in contact met het bodemonmonster op het tijdstip $t=0$ (cm^3).

Het adsorptiepercentage A_{t_i} of $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteld; de figuren 1 en 2 bevatten voorbeelden van dergelijke curves.

⁴ Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.



Figuur 1: Adsorptie-evenwichtscurve



Figuur 2: Massaconcentratie van de teststof in de waterfase (C_{aq}) uitgezet tegen de tijd

b) Seriële methode

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure wordt uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties van de waterfase na specifieke tijdsintervallen.

- De hoeveelheid van de stof die gedurende elk tijdsinterval aan het bodemmonster wordt geadsorbeerd, wordt als volgt berekend:

- voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$:

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- voor het tweede tijdsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$:

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- voor het derde tijdsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$:

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- voor het n^e tijdsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$:

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Het adsorptiepercentage over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t_i}$) wordt berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

terwijl het adsorptiepercentage op het tijdstip t_i (A_{t_i}) wordt berekend met de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.

Het adsorptiepercentage A_{t_i} of $A_{\Delta t_i}$ (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

- Op het evenwichtstijdstip t_{eq} :
 - is de massa van de aan het bodemonster geadsorbeerde teststof:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- is de massa van de teststof in de oplossing:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- en is het adsorptiepercentage bij evenwicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa van de aan het bodemonster geadsorbeerde teststof gedurende de tijdsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = massa van de stof, gemeten in een monster v_a^A op het tijdstip t_1, t_2, \dots, t_n (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa van de aan het bodemonster geadsorbeerde teststof bij het adsorptie-evenwicht (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (μg);

v_a^A = volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = adsorptiepercentage dat overeenkomt met een tijdsinterval Δt_i (%);

A_{eq} = adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht (%).

DESORPTIE D (%)

Als het tijdstip t_0 waarop het desorptie-experiment begint, wordt het moment beschouwd waarop het maximale volume van de oplossing met teststof (nadat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld) wordt verwijderd en vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$ -oplossing.

a) Parallele methode

Op een tijdstip t_i wordt de massa van de teststof gemeten in de waterfase die uit buis i is verwijderd (V_R^i) en wordt de gedesorbeerde massa berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_R^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Bij het desorptie-evenwicht is $t_i = t_{eq}$ en derhalve $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

De massa van de gedurende een tijdsinterval Δt_i gedesorbeerde teststof is:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Het desorptiepercentage wordt berekend:

- op een tijdstip t_i met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- en gedurende een tijdsinterval Δt_i met de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

Hierbij is:

D_{t_i} = desorptiepercentage op een tijdstip t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = desorptiepercentage over een tijdsinterval Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa van de op een tijdstip t_i gedesorbeerde teststof (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = massa van de gedurende een tijdsinterval Δt_i gedesorbeerde teststof (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = analytisch bepaalde massa van de teststof in een op een tijdstip t_i voor analyse genomen volume oplossing V_R^i (μg);

m_{aq}^A = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (μg);

V_{R} = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl_2 -oplossing (cm^3);

V_{T}^i = volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment voor de bepaling van de teststof uit buis (i) is genomen (cm^3).

Het desorptiepercentage D_{t_i} of $D_{\Delta t_i}$ (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

b) Seriële methode

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure is uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties (v_{a}^{A}) van de waterfase (de seriële methode in punt 1.9: "Uitvoering van de test"). Aangenomen wordt dat (a) het na het adsorptiekinetiek-experiment uit de buis verwijderde supernatans is vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl_2 -oplossing (V_{R}) en (b) het totale volume van de waterfase in contact met het bodemmonster (V_{T}) gedurende het desorptiekinetiek-experiment constant blijft en wordt gegeven door de vergelijking:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{a}}^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

Op een tijdstip t_i :

- De massa van de teststof in een kleine hoeveelheid oplossing (v_{a}^{D}) wordt bepaald en de gedesorbeerde massa wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (i-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad (19)$$

- Bij het desorptie-evenwicht is $t_i = t_{\text{eq}}$ en derhalve $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$.

- Het desorptie-percentage D_{t_i} wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

Over een tijdsinterval Δt_i :

- Over elk tijdsinterval wordt de hoeveelheid geadsorbeerde stof als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{en} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— voor het tweede tijdsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{en}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— voor het n^{e} tijdsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

en

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Ten slotte wordt het desorptiepercentage over elk tijdsinterval ($D_{\Delta t_i}$) berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

terwijl het desorptiepercentage op het tijdstip t_i (D_{t_i}) wordt berekend met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massa van de teststof die aan het bodemonmonster blijft geadsorbeerd na de tijdsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massa van de teststof die wordt geadsorbeerd gedurende de tijdsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = massa van de teststof die in een hoeveelheid oplossing (v_a^D) wordt gemeten op de tijdstippen t_1, t_2, \dots, t_n (μg);

V_T = totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemonmonster is (cm^3);

m_{aq}^A = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M CaCl_2 -oplossing (cm^3);

v_a^D = volume van het monster dat tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analyse-doeleinden uit buis (i) wordt genomen (cm^3).

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

BIJLAGE 6

ADSORPTIE/DESORPTIE IN DE BODEM: RAPPORTAGEFORMULIEREN

Geteste stof:

Getest bodemonster:

Gehalte van het bodemonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:°C

Geschiktheid van de analysemethode

Gewicht bodemonster	g	
Droge massa in bodemonster	g	
Volume CaCl ₂ -oplossing	cm ³	
Nominale concentratie eindoplossing	µg cm ⁻³	
Concentratie eindoplossing bij analyse	µg cm ⁻³	

Principe van de gebruikte analysemethode:

Kalibratie van de analysemethode:

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:°C

Gevolgde analysemethodologie: Indirect Parallel Serieel
 Direct

Adsorptietest: testmonsters

	Symbol	Eenheid	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd
Buis nr.									
Gewicht bodemmonster	-	g							
Droge massa bodemmonster	m_{soil}	g							
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	cm ³							
Volume 0,01 M CaCl ₂ -oplossing voor equilibratie bodemmonster		cm ³							
Volume stockoplossing		cm ³							
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster	V_0	cm ³							
Beginconcentratie testoplossing	C_0	µg cm ⁻³							
Massa teststof aan begin van de test	m_0	µg							
Na schudden en centrifugeren									
Indirecte methode									
Parallele methode									
Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm ⁻³							
Seriële methode									
Gemeten massa teststof in het analysemonster V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg							
Directe methode									
Massa aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof	$m_s^{ads}(t_i)$	µg							
Berekening van de adsorptie									
Adsorptie	A_{t_i}	%							
	$A_{\Delta t_i}$	%							
Gemiddelde									
Adsorptie coefficient	K_d	cm ³ g ⁻¹							
Gemiddelde									
Adsorptie coefficient	K_{oc}	cm ³ g ⁻¹							
Gemiddelde									

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:°C

Adsorptietest: blanco- en controlebepalingen

	Symbol	Eenheid	Blanco		Blanco		Controle	
Buis nr.								
Gewicht bodemmonster	-	g					0	0
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)		cm ³					-	-
Toegevoegd volume 0,01 M CaCl ₂ -oplossing		cm ³						
Toegevoegd volume stockoplossing met teststof		cm ³	0	0				
Totaal volume waterfase (berekend)		cm ³					-	-
Beginconcentratie van de teststof in de waterfase		µg cm ⁻³						
Na schudden en centrifugeren								
Concentratie in waterfase		µg cm ⁻³						

NB: Indien nodig kolommen toevoegen

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:°C

Massabalans

	Symbol	Eenheid				
Buis nr.						
Gewicht bodemmonster	-	g				
Droge massa bodemmonster	m_{soil}	g				
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	ml				
Volume 0,01 M CaCl ₂ -oplossing voor equilibratie bodemmonster		ml				
Volume stockoplossing		cm ³				
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster	V_0	cm ³				
Beginconcentratie testoplossing	C_0	µg cm ⁻³				
Equilibratietijd	-	uur				
Na schudden en centrifugeren						
Concentratie teststof in waterfase bij adsorptie-evenwicht na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm ⁻³				
Equilibratietijd	t_{eq}	uur				
Eerste verdunning met oplosmiddel						
Volume verwijderde waterfase	V_{rec}	cm ³				
Volume toegevoegd oplosmiddel	ΔV	cm ³				
Eerste extractie met oplosmiddel						
Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	S_{E1}	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	C_{E1}	µg cm ⁻³				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	m_{E1}	µg				
Tweede verdunning met oplosmiddel						
Volume verwijderd oplosmiddel	ΔV_s	cm ³				
Volume toegevoegd oplosmiddel	$\Delta V'$	cm ³				
Tweede extractie met oplosmiddel						
Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	S_{E2}	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	C_{E2}	µg cm ⁻³				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	m_{E2}	µg				
Totale massa in twee stappen geëxtraheerde teststof	m_E					
Massabalans	MB	%				

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:

.....°C

Adsorptie-isothermen

	Symbol	Eenheid								
Buis nr.										
Gewicht bodemmonster	-	g								
Droge massa bodemmonster	E	g								
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	cm^3								
Volume 0,01 M $CaCl_2$ -oplossing voor equilibratie bodemmonster		cm^3								
Volume toegevoegde stock-oplossing		cm^3								
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster (berekend)	V_0	cm^3								
Concentratie oplossing	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Equilibratietijd	-	uur								
Na schudden en centrifugeren										
Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatuur		°C								
Massa geadsorbeerde teststof per eenheid bodemmonster	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Regressie-analyse:

waarde van K_F^{ads} :

waarde van $1/n$:

regressiecoëfficiënt r^2 :

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):.....%

Temperatuur:°C

Gevolgde analysemethodologie: Indirect Parallel Serieel

Desorptietest

	Symbol	Eenheid	Tijds- interval	Tijds- interval	Tijds- interval	Tijds- interval
Buisnr. uit adsorptiestap						
Massa aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij adsorptie-evenwicht	$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Verwijderd volume waterfase, vervangen door 0,01 M CaCl ₂	V_R	cm ³				
Totaal volume waterfase in contact met bodem	PM V_0 SM V_T	cm ³ cm ³				
Massa stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht	m_{aq}^A	µg				
Desorptiekinetiek						
Gemeten massa van de op het tijdstip t_i uit het bodemmonster gedesorbeerde stof	$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume van de oplossing die voor de meting van de teststof uit buis (i) is genomen	PM v_i^i	cm ³				
	SM v_a^D	cm ³				
Massa van de op het tijdstip t_i uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massa van de gedurende het tijdsinterval Δt_i uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				
Desorptiepercentage						
Desorptie op het tijdstip t_i	D_{t_i}	%				
Desorptie gedurende het tijdsinterval Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Schijnbare desorptiecoëfficiënt	K_{des}					

PM: Parallele methode

SM: Serieële methode

C.19. RAMING VAN DE ADSORPTIECOËFFICIËNT (K_{oc}) AAN DE BODEM EN AAN RIOOLSLIB MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van OESO TG 121 (2000).

1.1 INLEIDING

Het sortiegedrag van stoffen ten opzichte van de bodem en van rioolslib kan worden beschreven aan de hand van parameters die langs experimentele weg worden bepaald met behulp van testmethode C.18. Een belangrijke parameter is de adsorptiecoëfficiënt, die wordt gedefinieerd als de verhouding tussen de concentratie van de stof in de bodem/het rioolslib en de concentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-evenwicht. De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor het organische-koolstofgehalte van de bodem K_{oc} is een bruikbare indicator van de bindingscapaciteit van een chemische stof aan organisch bodemmateriaal en rioolslib, en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Deze parameter kan worden geraamd door middel van correlaties met de oplosbaarheid in water en de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Bij de in deze test beschreven onderzoeksmethode wordt gebruikgemaakt van HPLC voor de raming van de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} aan de bodem en aan rioolslib (8). De ramingen zijn betrouwbaarder dan die op basis van KSAR-berekeningen (9). Aangezien deze onderzoeksmethode gebaseerd is op ramingen, kan zij de bij testmethode C.18 gebruikte batch-evenwichtsexperimenten niet volledig vervangen. Toch kan de geraamde K_{oc} van nut zijn bij de keuze van geschikte testparameters voor adsorptie-/desorptieonderzoeken volgens testmethode C.18 door de berekening van K_d (verdelingscoëfficiënt) of K_f (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) volgens vergelijking 3 (zie punt 1.2).

1.2 DEFINITIES

K_d : de verdelingscoëfficiënt wordt gedefinieerd als de verhouding van evenwichtsconcentraties C van een opgeloste teststof in een tweefasensysteem dat bestaat uit een sorptiemiddel (bodem of rioolslib) en een waterfase; deze coëfficiënt is een waarde zonder dimensies wanneer de concentraties in beide fasen worden uitgedrukt in gewicht/gewicht. Indien de concentratie in de waterfase wordt uitgedrukt in gewicht/volume, zijn de eenheden $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. K_d kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen en concentratieafhankelijk zijn.

$$K_d = \frac{C_{\text{soil}}}{C_{\text{aq}}} \text{ or } \frac{C_{\text{sludge}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

Hierbij is:

C_{soil} = concentratie van de teststof in de bodem bij evenwicht ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{sludge} = concentratie van de teststof in slib bij evenwicht ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{aq} = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

K_f : de adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich wordt gedefinieerd als de concentratie van de teststof in de bodem of in rioolslib (x/m) wanneer de evenwichtsconcentratie C_{aq} in de waterfase gelijk is aan één; de eenheden zijn µg·g⁻¹ sorptiemiddel. De waarde kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

Hierbij is:

x/m = hoeveelheid teststof x (µg) die is geadsorbeerd aan de hoeveelheid sorptiemiddel m (g) bij evenwicht

1/n = helling van de adsorptie-isotherm volgens Freundlich

C_{aq} = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht (µg · ml⁻¹)

$$\text{Bij } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: de verdelingscoëfficiënt (K_d) of adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich (K_f) genormaliseerd voor het organische-koolstofgehalte (f_{oc}) van een sorptiemiddel; deze coëfficiënt is met name voor niet-geïoniseerde chemische stoffen een tamelijk nauwkeurige indicator voor de mate van adsorptie van een stof aan het sorptiemiddel en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Afhankelijk van de dimensies van K_d en K_f kan K_{oc} dimensieloos zijn of de eenheden ml · g⁻¹ of µg · g⁻¹ organisch materiaal hebben.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (dimensionless or ml} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (3)$$

Het verband tussen K_{oc} en K_d is niet altijd lineair; K_{oc}-waarden kunnen dan ook verschillen van bodemtype tot bodemtype, hoewel zij nauwelijks uiteenlopen vergeleken met K_d-of K_f-waarden.

De adsorptiecoëfficiënt (K_{oc}) wordt afgeleid uit de capaciteitsfactor (k') aan de hand van een ijkcurve van log k' versus log K_{oc} van de geselecteerde referentieverbindingen.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

Hierbij is:

t_R : HPLC-retentietijd van test- en referentiestof (minuten)

t₀ : dode tijd HPLC (minuten) (zie punt 1.8.2).

P_{ow} : de verdelingscoëfficiënt octanol/water wordt gedefinieerd als de verhouding van de concentraties van opgeloste stof in n-octanol en water; dit is een dimensieloze waarde.

$$P_{ow} = \frac{C_{oc \text{ tan ol}}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

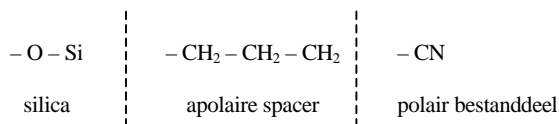
1.3 REFERENTIESTOFFEN

Voordat de methode wordt gebruikt, moeten de structuurformule, de zuiverheid en de dissociatieconstante (indien van toepassing) bekend zijn. Gegevens over de oplosbaarheid in water en organische oplosmiddelen, de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de hydrolysekenmerken zijn nuttig.

Om de gemeten HPLC-retentiegegevens van een teststof te correleren aan de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} van die stof, moet een ijkgrafiek van $\log K_{oc}$ versus $\log k'$ worden getekend. Er moet gebruik worden gemaakt van minimaal zes referentiepunten, waarvan ten minste één boven en ten minste één onder de verwachte teststofwaarde dient te liggen. De methode zal veel nauwkeuriger zijn als er referentiestoffen worden gebruikt die qua structuur verwant zijn aan de teststof. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, dient de gebruiker zelf geschikte ijkstoffen te kiezen. In dat geval moet een meer algemene reeks van qua structuur heterogene stoffen worden gekozen. Voor rioolslib zijn toegestane stoffen en K_{oc} -waarden opgenomen in tabel 1, voor de bodem in tabel 3 (zie aanhangsel). De eventuele keuze van andere ijkstoffen moet worden onderbouwd.

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er wordt gebruikgemaakt van analytische HPLC-kolommen die zijn gevuld met een in de handel verkrijgbare vaste cyaanpropylfase die lipofiele en polaire bestanddelen bevat. Verder wordt een op een silicamatrix gebaseerde gematigd polaire stationaire fase gebruikt:



Het principe van de testmethode is hetzelfde als dat van testmethode A.8 (verdelingscoëfficiënt, HPLC-methode). Op het moment dat de teststof samen met de mobiele fase door de kolom stroomt, gaat die stof een interactie aan met de stationaire fase. De teststof wordt vertraagd als gevolg van de verdeling tussen mobiele en stationaire fasen. De tweeledige samenstelling van de stationaire fase – polaire en apolaire locaties – maakt dezelfde soort interactie tussen polaire en apolaire groepen van een molecuul mogelijk als bij organisch materiaal in bodem- of rioolslibmatrices. Op basis hiervan kan er een verband worden gelegd tussen de retentietijd in de kolom en de adsorptiecoëfficiënt aan organisch materiaal.

Met name bij polaire stoffen heeft de pH een belangrijke invloed op het sortiegedrag. Bij landbouwgrond en reservoirs van rioolwaterzuiveringsinstallaties schommelt de pH gewoonlijk tussen 5,5 en 7,5. Voor ioniseerbare stoffen moeten er twee tests worden verricht met zowel geïoniseerde als niet-geïoniseerde vormen in geschikte bufferoplossingen, doch alleen in gevallen waarin ten minste 10 % van de testverbinding uiteen zal vallen binnen pH 5,5 tot 7,5.

Aangezien de evaluatie uitsluitend plaatsvindt op basis van het verband tussen de retentie in de HPLC-kolom en de adsorptiecoëfficiënt, is er geen kwantitatieve analysemethode nodig en behoeft slechts de retentietijd te worden bepaald. Indien er een geschikte reeks referentiestoffen beschikbaar is en de methode benut wordt onder standaard experimentele omstandigheden, vormt die methode een snelle en efficiënte manier om de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} te ramen.

1.5 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De HPLC-methode kan worden gebruikt voor chemische stoffen (al dan niet gelabeld) waarvoor een geschikt detectiesysteem (b.v. spectrofotometer, radioactiviteitsdetector) beschikbaar is en die voldoende stabiel zijn gedurende het experiment. De methode kan zeer bruikbaar zijn voor chemische stoffen die moeilijk op een andere manier experimenteel te onderzoeken zijn (zoals vluchtige stoffen; stoffen die niet in water oplosbaar zijn in een concentratie die analyseerbaar is; stoffen met een sterke affiniteit tot het oppervlak van incubatiesystemen). De methode kan worden gebruikt voor mengsels die niet-opgeloste elutiebanden opleveren. In dat geval moeten de onder- en bovengrenzen van de log K_{oc} -waarden van de verbindingen van het testmengsel worden vermeld.

Hoewel onzuiverheden soms problemen kunnen opleveren voor de interpretatie van HPLC-resultaten, zijn zij van ondergeschikt belang zolang de teststof duidelijk langs analytische weg kan worden geïdentificeerd en van de onzuiverheden gescheiden.

De methode is geldig verklaard voor de stoffen die zijn opgenomen in tabel 1 van het aanhangsel en is tevens gebruikt voor een aantal andere chemische stoffen, die behoren tot de volgende chemische categorieën:

- aromatische aminen (b.v. trifluralin, 4-chlooraniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naftylamine);
- aromatische carbonzuren esters (b.v. benzoëzure methylester, 3,5-dinitrobenzoëzure ethylester);
- aromatische koolwaterstoffen (b.v. toluen, xyleen, ethylbenzeen, nitrobenzeen);
- aryloxyfenoxypropionzuren esters (b.v. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);
- schimmelwerende middelen, benzimidazol en imidazol (b.v. carbendazim, fuberidazol, triazoxide);
- carbonzuren amiden (b.v. 2-chloorbenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide);
- chloorkoolwaterstoffen (b.v. endosulfan, DDT, hexachloorbenzeen, quintozeen, 1,2,3-trichloorbenzeen);
- organofosfor-insecticiden (b.v. azinfos-methyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos);
- fenolen (b.v. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachloorfenol, 2,4,6-trichloorfenol, 1-naftol);
- fenylureumderivaten (e.g. isoproturon, monolinuron, pencycuron);
- pigmentkleurstoffen (b.v. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polyaromatische koolwaterstoffen (b.v. acenafteen, naftaleen);
- 1,3,5-triazine-herbiciden (b.v. prometryn, propazin, simazin, terbutryn);
- triazoolderivaten (b.v. tebuconazol, triadimefon, triadimenol, triapentenol).

De methode kan niet worden gebruikt voor stoffen die met het eluent of de stationaire fase reageren, en ook niet voor stoffen die een specifieke interactie aangaan met anorganische bestanddelen (b.v. vorming van clustercomplexen met kleimineralen). Het is mogelijk dat de methode niet werkt bij oppervlakte-actieve stoffen, anorganische verbindingen en matige of sterke organische zuren en basen. Er kunnen log K_{oc} -waarden van 1,5 tot 5,0 worden bepaald. Ioniseerbare stoffen moeten worden gemeten met behulp van een gebufferde mobiele fase, waarbij er wel op moet worden gelet dat precipitatie van bufferbestanddelen of van de teststof wordt voorkomen.

1.6 KWALITEITSCRITERIA

1.6.1 Nauwkeurigheid

Normaliter kan de adsorptiecoëfficiënt van een teststof worden geraamd tot binnen $\pm 0,5$ log eenheid van de waarde die is bepaald met behulp van de batch-evenwichtsmethode (zie tabel 1 van het aanhangsel). Een hogere nauwkeurigheid is haalbaar als de gebruikte referentiestoffen qua structuur verwant zijn aan de teststof.

1.6.2 Herhaalbaarheid

De bepalingen moeten ten minste in duplo worden uitgevoerd. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van $\log K_{oc}$ moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

1.6.3 Reproduceerbaarheid

De ervaring die tot nu toe met de methode is opgedaan, ondersteunt de geldigheid ervan. Uit een onderzoek naar de HPLC-methode, waarbij gebruik werd gemaakt van 48 stoffen (merendeels pesticiden) waarvoor betrouwbare gegevens over K_{oc} in de bodem beschikbaar waren, kwam een correlatiecoëfficiënt van $R = 0,95$ naar voren (10) (11).

Er is een vergelijkingstest onder 11 laboratoria gehouden ter verbetering en validatie van de methode (12). De resultaten zijn vermeld in tabel 2 van het aanhangsel.

1.7 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.7.1 Voorbereidende raming van de adsorptiecoëfficiënt

Daar de verdelingscoëfficiënt octanol/water P_{ow} ($= K_{ow}$) en, in zekere mate, de oplosbaarheid in water met name bij niet-geïoniseerde stoffen kunnen worden gebruikt als indicatoren van de mate van adsorptie, kunnen zij tevens worden benut voor voorbereidende bereikbepaling. Er zijn een aantal bruikbare correlaties gepubliceerd voor verschillende groepen chemische stoffen (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 Apparatuur

Vereist is een vloeistofchromatograaf met een pulsloze pomp en een geschikt detectieapparaat. Het gebruik van een injectieklep met injectielus wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbare chemisch gebonden cyaanpropylharsen op silicabasis (b.v. Hypersil en Zorbax CN). Er mag een voorkolom van hetzelfde materiaal tussen het injectiesysteem en de analysekolom worden geplaatst. Kolommen van verschillende leveranciers kunnen aanzienlijk uiteenlopen qua scheidingsefficiëntie. Als richtsnoer moeten de volgende capaciteitsfactoren k' worden gehaald: $\log k' > 0,0$ voor $\log K_{oc} = 3,0$ en $\log k' > -0,4$ voor $\log K_{oc} = 2,0$ bij gebruik van methanol/water 55/45 % als mobiele fase.

1.7.3 **Mobiele fasen**

Van de diverse geteste mobiele fasen worden de twee volgende aanbevolen:

- methanol/water (55/45% v/v)
- methanol/0,01M citraatbuffer pH 6,0 (55/45% v/v)

Er wordt gebruikgemaakt van een combinatie van methanol van HPLC-kwaliteit met gedestilleerd water of citraatbuffer voor de bereiding van het uitspoeloplosmiddel. Het mengsel wordt vóór gebruik ontgast. Er moet isocratische elutie worden toegepast. Als methanol/water-mengsels niet geschikt zijn kunnen ook andere organisch-oplosmiddel/water-mengsels worden uitgetest, zoals ethanol/water- of acetonitril/water-mengsels. Voor ioniseerbare verbindingen wordt het gebruik van een bufferoplossing aanbevolen om de pH te stabiliseren. Zoutprecipitatie en achteruitgang van de kolom moeten worden voorkomen, verschijnselen die zich kunnen voordoen bij sommige organische fase/buffer-mengsels.

Er mogen geen additieven zoals ionenpaarreagentia worden gebruikt, omdat die van invloed kunnen zijn op de sorptie-eigenschappen van de stationaire fase. Dergelijke veranderingen van de stationaire fase kunnen onomkeerbaar zijn. Daarom moeten experimenten waarbij additieven worden gebruikt, uitgevoerd worden op gescheiden kolommen.

1.7.4 **Oplossingen**

De test- en referentiestoffen moeten worden opgelost in de mobiele fase.

1.8 **UITVOERING VAN DE TEST**

1.8.1 **Testomstandigheden**

De temperatuur tijdens de metingen moet worden geregistreerd. Temperatuurregeling van het kolomcompartiment wordt sterk aanbevolen teneinde constante omstandigheden te garanderen tijdens het ijken en ramen en het meten van de teststof.

1.8.2 **Bepaling van de dode tijd t_0**

Voor deze bepaling kunnen twee methoden worden gebruikt (zie ook punt 1.2).

1.8.2.1 *Bepaling van de dode tijd t_0 door middel van een homologe reeks*

Gebleken is dat deze procedure betrouwbare en gestandaardiseerde t_0 -waarden oplevert. Zie voor nadere bijzonderheden testmethode A.8, Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water), HPLC-methode.

1.8.2.2 *Bepaling van de dode tijd t_0 door middel van inerte stoffen waarvan geen retentie door de kolom plaatsvindt*

Deze techniek is gebaseerd op de injectie van oplossingen van formamide, ureum of natriumnitraat. De metingen moeten ten minste in duplo worden verricht.

1.8.3 **Bepaling van de retentietijden t_R**

De referentiestoffen moeten worden gekozen zoals beschreven in punt 1.3. Ze mogen als gemengde standaard worden geïnjecteerd om hun retentietijden te bepalen, mits aangetoond is dat de retentietijd van elke referentiestandaard niet wordt beïnvloed door de aanwezigheid van de andere referentiestandaarden. Er dient regelmatig en in ieder geval tweemaal per dag te worden geïjkt teneinde rekening te kunnen houden met onvoorziene veranderingen in de prestaties van de kolom. Het verdient de voorkeur de ijkinjecties uit te voeren vóór en na de injecties van de teststof om er zeker van te zijn dat de retentietijden niet zijn gewijzigd. De teststoffen worden afzonderlijk in zo klein mogelijke hoeveelheden geïnjecteerd (om overlading van de kolom te voorkomen) en de retentietijden ervan worden bepaald.

Om het vertrouwen in de meting te vergroten moeten de bepalingen ten minste in duplo worden verricht. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van $\log K_{oc}$ moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

1.8.4 **Evaluatie**

Uit de dode tijd t_0 en de retentietijden t_R van de gekozen referentiestoffen worden de capaciteitsfactoren k' berekend volgens vergelijking 4 (zie punt 1.2). Daarna worden de $\log k'$ -gegevens van de referentiestoffen uitgezet tegen hun $\log K_{oc}$ -waarden die zijn verkregen bij batch-evenwichtsexperimenten. Aan de hand van deze curve wordt vervolgens de $\log k'$ -waarde van een teststof gebruikt om de $\log K_{oc}$ -waarde van die stof te bepalen. Als uit de actuele resultaten blijkt dat de $\log K_{oc}$ van de teststof buiten het ijkbereik valt, moet de test worden herhaald met andere, geschiktere referentiestoffen.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

In het rapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

- identiteit van test- en referentiestoffen en hun zuiverheid, alsmede pK_a -waarden voorzover relevant;
- beschrijving van apparatuur en bedrijfsomstandigheden, b.v. type en maat van analysekolom en voorkolom, detectieapparaat, mobiele fase (verhouding tussen bestanddelen en pH), temperatuurbereik tijdens de metingen;
- dode tijd en methode die wordt gebruikt voor de bepaling daarvan;
- in de kolom gebrachte hoeveelheden test- en referentiestoffen;
- retentietijden van referentieverbindingen die voor ijkdoeleinden worden gebruikt;
- nadere gegevens over de aangebrachte regressielijn ($\log k'$ vs. $\log K_{oc}$) en een grafiek van die lijn;
- gemiddelde-retentiegegevens en geraamde $\log K_{oc}$ -waarde van de testverbinding;
- chromatogrammen.

3. **REFERENTIES**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

AANHANGSEL

Tabel 1

**Vergelijking van K_{oc} -waarden voor bodem en rioolslib,
en volgens de HPLC-screeningmethode^{1,2} berekende waarden**

Stof	CAS-nr.	log K_{oc} riooslib	log K_{oc} HPLC	Δ	Log K_{oc} bodem	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoëzure fenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetaniide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlooraniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

¹ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, *35*(1/2), 121 - 128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. *Chemosphere*, *35* (1/2), 107 – 119.

Tabel 2

**Resultaten van een vergelijkende laboratoriumtest (11 laboratoria)
verricht ter verbetering en validatie van de HPLC-methode¹**

Stof	CAS-nr.	log K_{oc} [OESO 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC-methode]	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, *30*(7), 1373-1384.

Tabel 3**Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-screeningmethode op basis van bodemadsorptiegegevens**

Referentiestof	CAS-nr.	Gemidd. log K_{oc} -waarden van batch-evenwicht	Aantal K_{oc} -gegevens	log S.D.	Bron
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	a
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a
2-nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	b
N,N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	a
4-methylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	a
Methylbenzooat	93-58-3	1,80	4	1,08	a
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	c
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	c
3-nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	b
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	a
3,5-dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	b
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	c
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	c
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	c
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	a
1,2,3-trichloorbenzeen	87-61-6	3,16	4	1,40	a
γ -HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	a
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	a
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c
α -Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	c
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	a
DDT	50-29-3	5,63	1	-	b

/a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

/c/ Door de bedrijfstak verstrekte gegevens.

C.20 DAPHNIA MAGNA VOORTPLANTINGSTEST

1. METHODE

Deze methode voor het testen van de voortplantingstoxiciteit neemt OESO TG 211 (1998) integraal over.

1.1 INLEIDING

Het doel van de test is in de eerste plaats het beoordelen van het effect van chemicaliën op het voortplantingsresultaat van *Daphnia magna*.

1.2 DEFINITIES EN EENHEDEN

Moederdieren: de vrouwelijke *Daphnia* die aanwezig zijn bij aanvang van de test en voorwerp zijn van de studie naar het voortplantingsresultaat.

Nakomelingen: de jonge *Daphnia* die tijdens de test worden voortgebracht door de moederdieren.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) (concentratie waarbij het laagste effect wordt waargenomen): de laagste testconcentratie van de stof waarbij een effect is waargenomen dat statistisch significant is voor de voortplanting en de mortaliteit van moederdieren (bij $p < 0,05$) in vergelijking met de controle, binnen een aangegeven blootstellingsperiode. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd.

No Observed Effect Concentration (NOEC) (concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen): de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ($p < 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

EC_x: de concentratie van de in water opgeloste teststof die resulteert in een x % vermindering van de voortplanting van *Daphnia magna* binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Intrinsieke groeisnelheid: een maat voor de groei van de populatie waarbij wordt uitgegaan van het voortplantingsresultaat en de leeftijdspecifieke mortaliteit (20) (21) (22). Bij stabiele populaties is die snelheid nul. Bij toenemende populaties is zij positief en bij afnemende populaties negatief. De laatstgenoemde populaties zijn uiteraard niet levensvatbaar en zullen uiteindelijk uitsterven.

Detectiegrens: de laagste concentratie die wel kan worden gedetecteerd doch niet gekwantificeerd.

Bepalingsgrens: de laagste concentratie die kwantitatief meetbaar is.

Mortaliteit: een dier wordt geregistreerd als gestorven als het immobiel is, d.w.z. als het niet tot zwemmen in staat is of als er geen beweging van aanhangsels of het postabdomen wordt waargenomen binnen 15 seconden na zachtjes bewegen van het testvat. (Gebruik van een andere definitie moet met bronvermelding worden vermeld).

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Jonge vrouwelijke *Daphnia* (de moederdieren), die bij aanvang van de test nog geen 24 uur oud zijn, worden blootgesteld aan de teststof die aan het water is toegevoegd in een aantal uiteenlopende concentraties. De testduur is 21 dagen. Aan het eind van de test wordt het totale aantal voortgebrachte levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, geteld. Dit houdt in dat nakomelingen die zijn voortgebracht door volwassen dieren die tijdens de test sterven, niet worden meegeteld. Het voortplantingsresultaat van de moederdieren kan ook op andere manieren worden uitgedrukt (bijvoorbeeld in het aantal levende nakomelingen dat per dag en per dier is voortgebracht vanaf de eerste dag dat er nakomelingen werden waargenomen), maar die moeten dan wel worden vermeld naast het totale aantal nakomelingen dat per moederdier dat nog in leven was aan het eind van de test, werd voortgebracht. Het voortplantingsresultaat van de aan de teststof blootgestelde dieren wordt vergeleken met dat van de controlegroep(en) teneinde de lowest observed effect concentration (LOEC) en daarmee ook de no observed effect concentration (NOEC) te bepalen. Daarnaast vindt waar mogelijk data-analyse plaats met behulp van een regressiemodel om de concentratie te schatten die zou leiden tot een x % vermindering van het voortplantingsresultaat (d.w.z. EC_{50} , EC_{20} of EC_{10}).

Het aantal overlevende moederdieren en de tijd die nodig was voor het voortbrengen van het eerste broedsel, moeten eveneens worden vermeld. Ook andere stofgerelateerde effecten op parameters als groei (bijvoorbeeld lengte) en mogelijke intrinsieke groeisnelheid kunnen voorwerp van onderzoek zijn.

1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Er moeten resultaten van een met *Daphnia magna* verrichte acute-toxiciteitstest (zie Methode C.2, Deel I) beschikbaar zijn. Deze kunnen bruikbaar zijn bij de selectie van een geschikt aantal uiteenlopende testconcentraties voor de voortplantingstests. De oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn; tevens moet er een betrouwbare analysemethode beschikbaar zijn voor de kwantificering van de stof in de testoplossingen met vermelding van de herstelcapaciteit en de bepalingsgrens.

Voorbeelden van gegevens over de teststof die bruikbaar kunnen zijn bij de vaststelling van de testvoorwaarden zijn de structuurformule, de zuiverheidsgraad van de stof, de stabiliteit bij licht, de stabiliteit onder de testvoorwaarden, pK_a , P_{ow} en resultaten van de test betreffende gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie Methode C.4).

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Wil de test geldig zijn, dan moet in de controlegroep(en) aan de volgende prestatiecriteria worden voldaan:

- de mortaliteit van de moederdieren (vrouwelijke *Daphnia*) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 20 %;
- het gemiddelde aantal levende nakomelingen dat is voortgebracht per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, is ≥ 60 .

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 Apparatuur

Testvaten en andere apparaten die in aanraking komen met de testoplossingen, mogen alleen uit glas of een ander chemisch inert materiaal bestaan. Normaal gesproken zijn de testvaten glazen bekertjes.

Daarnaast zijn alle of sommige van de volgende apparaten vereist:

- zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere geschikte voorzieningen voor de meting van opgeloste zuurstof in monsters met een klein volume);
- adequate apparatuur voor de temperatuurbeheersing;
- pH-meter;
- uitrusting voor de bepaling van de hardheid van water;
- uitrusting voor de bepaling van de totale organische koolstofconcentratie (TOC) van water of uitrusting voor de bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD);

— adequate apparatuur voor de regeling van het lichtregime en de meting van de lichtintensiteit.

1.6.2 Testorganisme

De testsoort is *Daphnia magna* Strauss. Andere *Daphnia*-soorten zijn eveneens toegestaan, mits ze aan de toepasselijke geldigheidscriteria voldoen (het geldigheids criterium met betrekking tot het voortplantingsresultaat bij de controlegroepen moet relevant zijn voor de *Daphnia*-soort). Indien andere *Daphnia*-soorten worden gebruikt, moeten die duidelijk worden vermeld en dient dat gebruik te worden onderbouwd.

De kloon moet bij voorkeur zijn geïdentificeerd door middel van bepaling van het genotype. Uit onderzoek (1) is gebleken dat de voortplantingsprestatie van Kloon A (die afkomstig is van IRCHA in Frankrijk) (3) consequent voldoet aan het geldigheids criterium van een gemiddelde van ≥ 60 nakomelingen per overlevend moederdier indien gekweekt onder de in deze methode beschreven voorwaarden. Desalniettemin zijn andere klonen aanvaardbaar mits de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoet aan de geldigheidscriteria voor een test.

Bij aanvang van de test mogen de dieren nog geen 24 uur oud zijn; ze mogen geen eerste nakomelingen zijn. Ze moeten afkomstig zijn van een gezonde stam (d.w.z. geen tekenen van stress vertonen, zoals hoge mortaliteit, aanwezigheid van mannelijke dieren en ephippia, vertraging in het voortbrengen van het eerste broedsel, verkleurde dieren enz.). De stamdieren moeten onder soortgelijke kweekomstandigheden (licht, temperatuur, medium, voeding en aantal dieren per eenheid) worden gehouden als die welke van toepassing zijn tijdens de test. Indien het tijdens de test te gebruiken *Daphnia*-kweekmedium afwijkt van het medium voor de gangbare *Daphnia*-cultuur, verdient het aanbeveling een aan de test voorafgaande acclimatiseringsperiode van normaliter circa 3 weken (d.w.z. één generatie) aan te houden om stress bij de moederdieren te voorkomen.

1.6.3 Testmedium

Het verdient aanbeveling om bij deze test gebruik te maken van een volledig beschreven medium. Op die manier kan het gebruik van additieven vermeden worden (zoals zeewier, grondextract enz.), die moeilijk te typeren zijn, en kan er beter gestandaardiseerd worden tussen laboratoria. De media Elendt M4 (4) en M7 (zie Bijlage 1) zijn hiertoe geschikt gebleken. Desalniettemin zijn andere media (bijvoorbeeld (5) en (6)) aanvaardbaar mits de prestaties van de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoen aan de geldigheidscriteria voor de test.

Indien gebruik wordt gemaakt van media met niet-beschreven additieven, moeten die additieven niet alleen duidelijk worden gespecificeerd, maar moeten er ook gegevens in het testrapport worden opgenomen over de samenstelling, in het bijzonder met betrekking tot het koolstofgehalte, aangezien dit een bijdrage kan leveren aan de voeding. Het verdient aanbeveling de totale organische koolstof (TOC) en/of het chemisch zuurstofverbruik (COD) van het stampreparaat van het organische additief te bepalen en een schatting te maken van de resulterende bijdrage aan TOC/COD in het testmedium. De TOC-niveaus in het medium (d.w.z. vóór toevoeging van de algen) zijn bij voorkeur lager dan 2 mg/l (7).

Ingeval van teststoffen met metalen moet worden onderkend dat de eigenschappen van het testmedium (bijvoorbeeld hardheid, chelaatvormend vermogen) van invloed kunnen zijn op de toxiciteit van de teststof. Een volledig beschreven medium is dan ook wenselijk. Op dit moment zijn er echter slechts twee volledig beschreven media waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor langetermijnkweek van *Daphnia magna*, Elendt M4 en M7. Beide media bevatten de chelaatvormer EDTA. Uit werkzaamheden is naar voren gekomen (2) dat de 'klaarblijkelijke toxiciteit' van cadmium in de regel lager is wanneer de voortplantingstest wordt uitgevoerd in M4- en M7-media dan bij uitvoering in media die geen EDTA bevatten. M4 en M7 worden derhalve niet aanbevolen voor metaalhoudende teststoffen, terwijl ook het gebruik van andere media die bekende chelaatvormers bevatten, vermeden dient te worden. Het kan raadzaam zijn om voor metaalhoudende stoffen een ander medium te gebruiken, zoals volgens ASTM geregenereerd hard schoon water (7), dat geen EDTA bevat, met toevoeging van zeewierextract (8). Deze combinatie van volgens ASTM geregenereerd hard schoon water en zeewierextract is ook geschikt voor langetermijnkweek en het testen van *Daphnia magna* (2), hoewel die combinatie nog altijd een licht chelaatvormende werking heeft vanwege de organische component in het toegevoegde zeewierextract.

Bij aanvang en tijdens de test moet de concentratie opgeloste zuurstof boven 3 mg/l liggen. De pH moet liggen tussen 6-9 en normaliter mag er geen variatie van meer dan 1,5 eenheid optreden bij welke test ook. Een hardheid van meer dan 140 mg/l (als CaCO₃) wordt aanbevolen. Uit tests op dit niveau en de hierboven beschreven tests is naar voren gekomen dat de voortplantingsprestatie voldoet aan de geldigheidscriteria (9) (10).

1.6.4 **Testoplossingen**

Testoplossingen van de gekozen concentraties worden in de regel bereid middels verdunning van een stamoplossing. Stamoplossingen moeten bij voorkeur worden bereid door oplossing van de stof in het testmedium.

In sommige gevallen kan het gebruik van organische oplosmiddelen of disperseermiddelen nodig zijn om een voldoende geconcentreerde stamoplossing te maken, maar het gebruik van dergelijke middelen moet waar mogelijk worden voorkomen. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van geschikte disperseermiddelen zijn Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % en HCO-40. De teststof in de testoplossingen mag in geen geval de grens van de oplosbaarheid in het testmedium overschrijden.

Oplosmiddelen worden gebruikt voor de productie van een stamoplossing die nauwkeurig in water kan worden gedoseerd. Bij de aanbevolen oplosmiddelconcentratie in het uiteindelijke testmedium (d.w.z. $\leq 0,1$ ml/l) zijn bovengenoemde oplosmiddelen niet toxisch en leiden ze niet tot een hogere oplosbaarheid in water van een stof.

Disperseermiddelen kunnen een goed hulpmiddel zijn bij een nauwkeurige dosering en dispersie. Bij de aanbevolen concentratie in het uiteindelijke testmedium ($\leq 0,1$ ml/l) zijn bovengenoemde disperseermiddelen niet toxisch en leiden ze niet tot een hogere oplosbaarheid in water van een stof.

1.7 **TESTOPZET**

De behandelingen moeten alle plaatsvinden in een speciaal voor de desbetreffende behandeling bestemd testvat en de testvaten moeten daarna op willekeurige wijze worden behandeld. Het nalaten hiervan kan een vertekend beeld geven dat uitgelegd zou kunnen worden als een concentratie-effect. In het bijzonder moet hierbij gedacht worden aan de mogelijkheid dat, wanneer met experimentele units wordt omgegaan in volgorde van behandeling of concentratie, bepaalde met tijd verband houdende effecten, zoals vermoeidheid bij de uitvoerder van het experiment of andere fouten, kunnen leiden tot het vaststellen van grotere effecten bij de hogere concentraties. Bovendien zou overwogen moeten worden de test af te breken als de testresultaten beïnvloed kunnen worden door een conditie waarvan reeds sprake was bij aanvang van de test of door een omgevingsconditie, zoals de plaats in het laboratorium.

1.8 **PROCEDURE**

1.8.1 **Blootstellingsomstandigheden**

1.8.1.1 *Duur*

De test duurt 21 dagen.

1.8.1.2 *Kwantiteit*

De moederdieren worden afzonderlijk, d.w.z. één per testvat, in de vaten ondergebracht met 50 - 100 ml medium in elk vat.

Soms kunnen grotere volumes nodig zijn om te voldoen aan de eisen van de analytische procedure die wordt gebruikt voor de bepaling van de teststofconcentratie, hoewel het bundelen van replicatieonderzoeken voor chemische analyse ook is toegestaan. Bij gebruik van volumes van meer dan 100 ml dient de hoeveelheid voer die aan de *Daphnia* wordt gegeven eventueel te worden verhoogd om ervoor te zorgen dat er voldoende voer aanwezig is en dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria. Bij doorstroomtests mag om technische redenen voor een andere opzet worden gekozen (bijvoorbeeld vier groepen van 10 dieren in een groter testvolume), mits eventuele wijzigingen in de testopzet in het testrapport worden vermeld.

1.8.1.3 *Aantal dieren*

Bij semi-statische tests, ten minste 10 dieren afzonderlijk gehouden bij elke testconcentratie en ten minste 10 dieren afzonderlijk gehouden in de controlereeks.

Wat doorstroomtests betreft is gebleken dat een aantal van 40, in vier groepen van 10 verdeelde dieren bij elke testconcentratie geschikt is (1). Een kleiner aantal testorganismen is toegestaan; een minimum van 20 dieren per concentratie verdeeld over twee of meer replicatieonderzoeken met een gelijk aantal dieren (bijvoorbeeld vier replicatieonderzoeken met elk vijf watervlooiën) wordt aanbevolen. Opgemerkt dient te worden dat het bij tests waar dieren in groepen worden gehouden, niet mogelijk is het voortplantingsresultaat uit te drukken in het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, als er moederdieren sterven. In die gevallen moet dat resultaat worden uitgedrukt in het 'totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat bij aanvang van de test aanwezig was'.

1.8.1.4 *Voeding*

Bij semi-statische tests moet er bij voorkeur dagelijks worden gevoerd, doch in ieder geval driemaal per week (d.w.z. naar gelang van de verandering van medium). Indien hiervan wordt afgeweken (bijvoorbeeld bij doorstroomtests), moet dat in het testrapport worden vermeld.

Tijdens de test moet de voeding van de moederdieren bij voorkeur bestaan uit levende algencellen of ten minste één van de volgende bestanddelen: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (tegenwoordig *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) en *Scenedesmus subspicatus*. Uitgangspunt bij de voeding moet de aan elk moederdier toegediende hoeveelheid organische koolstof (C) zijn. Uit onderzoek (12) is gebleken dat een hoeveelheid van 0,1 à 0,2 mg C/*Daphnia*/dag voor *Daphnia magna* voldoende is om een zodanig aantal nakomelingen te krijgen dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria voor de test. De voeding kan worden gegeven in een gelijkmatige, over de gehele testperiode uitgesmeerde hoeveelheid of desgewenst in een lagere hoeveelheid bij aanvang van de test, die daarna wordt opgevoerd teneinde rekening te houden met de groei van de moederdieren. Ook in dat geval moet de hoeveelheid echter altijd binnen de aanbevolen hoeveelheid van 0,1 – 0,2 mg C/*Daphnia*/dag blijven.

Indien er gebruik moet worden gemaakt van alternatieve middelen, zoals algencelaantal of lichtabsorptie, om aan de vereiste hoeveelheid voeding te komen (d.w.z. gemakshalve, aangezien de meting van het koolstofgehalte tijdrovend is), moet elk laboratorium zijn eigen nomografie opstellen waarin het alternatieve middel wordt gerelateerd aan het koolstofgehalte van de algencultuur (zie Bijlage 2 voor suggesties inzake het opstellen van een nomografie). Nomografieën moeten ten minste eenmaal per jaar worden gecontroleerd, doch vaker als de algencultuuromstandigheden zijn gewijzigd. Gebleken is dat lichtabsorptie een beter alternatief voor het koolstofgehalte is dan het celaantal (13).

Er dient een geconcentreerde algensuspensie te worden toegediend aan de *Daphnia* om de hoeveelheid algenkweekmedium die in de testvaten wordt overgebracht, zoveel mogelijk te beperken. De algen kunnen worden geconcentreerd door middel van centrifugeren, gevolgd door hersuspensie in gedistilleerd water, gedeïoniseerd water of *Daphnia*-kweekmedium.

1.8.1.5 *Licht*

16 Uren licht met een intensiteit van ten hoogste $15\text{-}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatuur*

De temperatuur van de testmedia moet liggen tussen 18-22°C. Waar mogelijk moet de temperatuur echter bij geen enkele test met meer dan 2°C variëren binnen dit bereik (bijvoorbeeld 18-20, 19-21 of 20-22°C). Voor de controle van de temperatuur kan het dienstig zijn een extra testvat te gebruiken.

1.8.1.7 *Beluchting*

De testvaten mogen niet worden belucht tijdens de test.

1.8.2 Testconcentratie

Normaliter moeten er ten minste vijf testconcentraties worden bereid in een meetkundige reeks met een scheidingsfactor die bij voorkeur niet hoger is dan 3,2, en moet voor elke testconcentratie het juiste aantal replicatieonderzoeken worden uitgevoerd (zie punt 1.8.1.3). Het eventuele gebruik van minder dan vijf concentraties moet worden beargumenteerd. Stoffen mogen niet worden getest boven de grens van hun oplosbaarheid in het testmedium.

Bij de vaststelling van het concentratiebereik moet aandacht worden geschonken aan het volgende:

- i. Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC vast te stellen, moet de laagste testconcentratie zo laag zijn dat de vruchtbaarheid bij die concentratie niet significant lager is dan die van de controlegroep. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een lagere laagste concentratie.
- ii. Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC vast te stellen, moet de hoogste testconcentratie zo hoog zijn dat de vruchtbaarheid bij die concentratie significant lager is dan die van de controlegroep. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een hogere hoogste concentratie.
- iii. Indien een schatting wordt gemaakt van de EC_x betreffende effecten op de voortplanting, is het raadzaam om een dusdanig aantal concentraties te gebruiken dat de EC_x met voldoende zekerheid kan worden bepaald. Indien een schatting wordt gemaakt van de EC_{50} betreffende effecten op de voortplanting, is het raadzaam dat de hoogste testconcentratie groter is dan deze EC_{50} . Als niet op deze wijze te werk wordt gegaan zal – hoewel de EC_{50} nog steeds geschat kan worden – het betrouwbaarheidsinterval van de EC_{50} erg breed worden, en is wellicht ook niet goed te beoordelen of het model wel voldoet.
- iv. Het testconcentratiebereik moet bij voorkeur geen concentraties omvatten die statistisch gezien een significant effect hebben op overleving van volwassen dieren, aangezien de aard van de test daarmee zou veranderen van een eenvoudige voortplantingstest in een gecombineerde voortplantings- en mortaliteitstest, die een veel complexere statistische analyse vergt.

Voorafgaande kennis over de toxiciteit van de teststof (bijvoorbeeld op basis van een acute test en/of verdelingsgerichte studies) kan een goed hulpmiddel zijn bij de selectie van de juiste testconcentraties.

Indien een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt bij de bereiding van testoplossingen (zie punt 1.6.4), mag de uiteindelijke concentratie in de testvaten niet hoger zijn dan 0,1 ml/l en moet die bovendien in alle testvaten dezelfde zijn.

1.8.3 Controles

Ter aanvulling op de testreeks moet er één testmediumcontrolereeks en, indien relevant, één controlereeks met het oplosmiddel of het dispergeermiddel worden uitgevoerd. Indien gebruikt moet de oplosmiddel- of dispergeermiddelconcentratie dezelfde zijn als in de vaten met de teststof. Het juiste aantal replicatieonderzoeken moet worden verricht (zie punt 1.8.1.3).

Bij een goed uitgevoerde test moet de coëfficiënt van de variatie rond het gemiddelde aantal levende nakomelingen per moederdier in de controlegroep(en) in de regel $\leq 25\%$ zijn; dit moet worden vermeld voor elke testopzet waarbij gebruik wordt gemaakt van afzonderlijk gehouden dieren.

1.8.4 Verversing van het testmedium

De frequentie waarmee het medium wordt verversed hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar moet ten minste driemaal per week zijn. Indien uit voorafgaande stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de teststofconcentratie niet stabiel is (d.w.z. buiten het bereik van 80 - 120 % van de nominale concentratie of dalend tot onder 80 % van de gemeten beginconcentratie) gedurende de maximale verversingsperiode (d.w.z. 3 dagen), moet worden overwogen het medium vaker te verversen of gebruik te maken van een doorstroomtest.

Wanneer het medium wordt verversd in semi-statische tests, wordt een tweede reeks testvaten bereid waarin de moederdieren worden overgebracht door middel van bijvoorbeeld een glazen pipet met een geschikte diameter. De hoeveelheid met de *Daphnia* overgebracht medium moet zo klein mogelijk zijn.

1.8.5 **Observaties**

De resultaten van de observaties gedurende de test moeten worden vermeld op informatiebladen (zie de voorbeelden in Bijlage 3 en 4). Indien er nog andere metingen gedaan moeten worden (zie 1.3 en 1.8.8), zijn er mogelijk meer observaties nodig.

1.8.6 **Nakomelingen**

De door elk moederdier voortgebrachte nakomelingen moeten bij voorkeur dagelijks worden verwijderd en geteld vanaf het moment dat het eerste broedsel verschijnt, teneinde te voorkomen dat ze voer opeten dat voor de volwassen dieren is bestemd. Hoewel in het kader van deze methode alleen het aantal levende nakomelingen moet worden geteld, moet ook de aanwezigheid van niet-uitgekomen eitjes of dode nakomelingen worden vermeld.

1.8.7 **Mortaliteit**

De mortaliteit onder de moederdieren moet bij voorkeur dagelijks worden geregistreerd, en ten minste op dezelfde tijdstippen als de telling van de nakomelingen.

1.8.8 **Andere parameters**

Hoewel deze methode voornamelijk bedoeld is voor de beoordeling van de effecten op de voortplanting, kunnen er mogelijk ook andere effecten in zodanige mate worden gekwantificeerd dat statistische analyse mogelijk is. Groeimetingen zijn zeer wenselijk aangezien zij informatie verschaffen over mogelijke subletale effecten, welke gegevens soms bruikbaar zijn dan voortplantingsmetingen alleen; de meting van de lengte van de moederdieren (d.w.z. de lichaamslengte met uitzondering van het anale uiteinde) aan het eind van de test wordt aanbevolen. Andere te meten of te berekenen parameters zijn de tijd die nodig is om het eerste broedsel (en de daaropvolgende broedsels) voort te brengen, aantal en omvang van de nakomelingen per dier, aantal niet-uitgekomen eitjes, aanwezigheid van mannelijke dieren of ephippia en de intrinsieke groeisnelheid van de populatie.

1.8.9 **Frequentie van analytische bepalingen en metingen**

De zuurstofconcentratie, temperatuur, hardheid en pH-waarden moeten ten minste eenmaal per week worden gemeten, in verse en oude media, in de controle(s) en in de hoogste teststofconcentratie.

Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig bepaald.

Bij semi-statische tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven (d.w.z. binnen het bereik van 80 - 120 %, zie 1.4 en 1.8.4), verdient het aanbeveling de hoogste en laagste testconcentraties in ieder geval te analyseren bij de verse bereiding ervan alsmede eenmaal bij verversing in de eerste week van de test (d.w.z. analyses moeten worden verricht op een monster van een en dezelfde oplossing – bij verse bereiding en bij verversing). Daarna moeten deze bepalingen in ieder geval wekelijks worden herhaald.

Bij tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting niet binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven, moeten alle testconcentraties zowel bij de verse bereiding als bij verversing worden geanalyseerd. Bij tests echter waarbij de gemeten beginconcentratie van de teststof weliswaar niet binnen ± 20 % van de nominale waarde ligt, maar wel naar tevredenheid kan worden aangetoond dat de beginconcentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80 - 120 % van de beginconcentraties), kunnen de chemische bepalingen in de weken 2 en 3 van de test worden beperkt tot de hoogste en laagste testconcentraties. In alle gevallen hoeft de bepaling van teststofconcentraties vóór de verversing slechts op één replicatieonderzoekvat bij elke testconcentratie te worden uitgevoerd.

Bij doorstroomtests is een gelijksoortige monstermethode van toepassing als bij semi-statische tests (met dien verstande dat de meting van 'oude'oplossingen hier niet van toepassing is). Desalniettemin kan het raadzaam zijn meer monsters te nemen in de eerste week (bijvoorbeeld via drie reeksen metingen) om te bewerkstelligen dat de testconcentraties stabiel blijven. Bij dit soort testen moet de doorstromingssnelheid van het oplosmiddel en de teststof dagelijks worden gecontroleerd.

Als er voldoende aanwijzingen zijn dat de concentratie van de te testen stof gedurende de gehele test en naar tevredenheid binnen $\pm 20\%$ van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op nominale of gemeten beginwaarden. Indien de afwijking van de nominale of gemeten beginconcentratie groter is dan $\pm 20\%$, moeten de resultaten worden uitgedrukt in tijdgewogen gemiddelde (zie Bijlage 5).

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1 VERWERKING VAN DE RESULTATEN

Doel van de test is het bepalen van het effect van de teststof op het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is. Het totale aantal nakomelingen per moederdier moet per testvat worden berekend (d.w.z. via replicatieonderzoek). Als bij een replicatieonderzoek het moederdier sterft tijdens de test of als het blijkt te gaan om een mannelijk dier, wordt dat replicatieonderzoek niet meegenomen in de analyse. De analyse zal in dat geval worden gebaseerd op een lager aantal replicatieonderzoeken.

Voor de schatting van de LOEC – en daarmee de NOEC – met betrekking tot de effecten van de chemische stof op het voortplantingsresultaat moet het gemiddelde voortplantingsresultaat van alle replicatieonderzoeken bij elke concentratie en de gebundelde reststandaardafwijking worden berekend aan de hand van variantieanalyse (ANOVA). Vervolgens moet per concentratie het gemiddelde worden vergeleken met het controlegemiddelde aan de hand van een geschikte meervoudige-vergelijkingsmethode. Geschikt zijn de Dunnett- of Williams-test (14)(15)(16)(17). Gecontroleerd moet worden of de binnen de ANOVA gehanteerde aanname betreffende de variantiehomogeniteit stand houdt. Dit kan beter langs grafische weg worden gedaan dan middels een formele significantietest (18); een Bartlett-test is een geschikt alternatief. Als de aanname geen stand houdt moet transformatie van gegevens worden overwogen om de varianties vóór de ANOVA te homogeniseren of om een gewogen ANOVA uit te voeren. De omvang van het met behulp van ANOVA waarneembare effect (d.w.z. het geringste significante verschil) moet worden berekend en vermeld.

Voor de schatting van de concentratie die zou leiden tot een achteruitgang met 50 % van het voortplantingsresultaat (d.w.z. de EC_{50}), moet voor de gegevens een geschikte kromme – bijvoorbeeld een logistische kromme – worden uitgezet met behulp van een statistische methode als die van de kleinste kwadraten. De parameters van de kromme kunnen zo worden gekozen dat de EC_{50} en de standaardafwijking daarvan direct kunnen worden geschat, waarmee de berekening van de betrouwbaarheidsgrenzen betreffende de EC_{50} aanzienlijk kan worden vergemakkelijkt. Tenzij er goede redenen zijn om de voorkeur te geven aan verschillende betrouwbaarheidsniveaus, moeten tweezijdig 95 % betrouwbaarheidsgrenzen worden vermeld. De procedure moet bij voorkeur voorzien in een methode voor de beoordeling van de significantie van het gebrek aan 'fit'. Dit kan langs grafische weg geschieden, of door middel van verdeling van de restsom van de kwadraten in 'gebrek aan fit' en 'zuivere afwijkingscomponenten' en uitvoering van een significantietest inzake dat 'gebrek aan fit'. Aangezien behandelingen die leiden tot een hoge vruchtbaarheid waarschijnlijk een grotere variatie in het aantal voortgebrachte nakomelingen hebben dan behandelingen die leiden tot een lage vruchtbaarheid, moet weging van de vastgestelde waarden om de verschillende varianties in de verschillende behandelingsgroepen tot uitdrukking te brengen, in overweging worden genomen (zie voor achtergrondinformatie ref. 18).

Bij de analyse van de gegevens van de eindringtest (2) is een logistische kromme uitgezet aan de hand van het volgende model, waarbij moet worden aangetekend dat ook andere geschikte modellen gebruikt mogen worden:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

waarin:

Y: het totale aantal nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven was (berekend per vat)

x: de stofconcentratie

c : het verwachte aantal nakomelingen wanneer $x = 0$

x_0 : de EC_{50} in de populatie

b : de hellingsparameter

In de meeste situaties zal dit model naar alle waarschijnlijkheid voldoen, maar er zijn ook tests waar dat niet opgaat. De geldigheid van het hierboven voorgestelde model moet worden gecontroleerd. In sommige gevallen kan een hormesismodel waarin lage concentraties sterkere effecten sorteren, uitkomst bieden (19).

Ook concentraties betreffende andere effecten zoals de EC_{10} of EC_{20} kunnen worden geschat, zij het dat het wellicht beter is andere parameters voor het model te kiezen dan die welke worden gebruikt bij de schatting van de EC_{50} .

2.2 TESTRAPPORT

Het testrapport moet het volgende omvatten:

2.2.1 Teststof:

- fysische kenmerken en relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, waaronder de zuiverheid.

2.2.2 Testsoort:

- de kloon (ongeacht of die genetisch getypeerd is), leverancier of bron (voorzover bekend) en de toegepaste culturomstandigheden. Als gebruik wordt gemaakt van een andere soort dan *Daphnia magna*, moet dit worden gerapporteerd en beargumenteerd.

2.2.3 Testomstandigheden:

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statisch of doorstroom, volume, hoeveelheid *Daphnia* per liter);
- fotoperiode en lichtintensiteit;
- testopzet (bijvoorbeeld aantal replicatieonderzoeken, aantal moederdieren per replicatieonderzoek);
- bijzonderheden over het gebruikte kweekmedium;
- voorzover gebruikt, toevoegingen van organisch materiaal, met inbegrip van de samenstelling, bron, bereidingsmethode, TOC/COD van stamoplossingen, schatting van de resulterende TOC/COD in het testmedium;
- gedetailleerde informatie over voeding, waaronder de hoeveelheid (in mg C/*Daphnia*/dag) en het schema (bijvoorbeeld soort voer, met inbegrip van de specifieke naam (soort) wat de algen betreft en, voorzover bekend, de stam en de kweekomstandigheden);
- bereidingsmethode van stamoplossingen en frequentie van de verversing (indien gebruikt moeten het oplosmiddel en het dispergeermiddel alsmede de concentratie ervan worden vermeld).

2.2.4

Resultaten:

- resultaten van eventuele voorafgaande studies naar de stabiliteit van de teststof;
- de nominale testconcentraties en de resultaten van alle analyses ter bepaling van de concentratie van de teststof in de testvaten (zie voorbeeld informatiebladen in Bijlage 4); de herstelcapaciteit van de methode en de bepalingsgrens moeten ook worden gerapporteerd;
- waterkwaliteit in de testvaten (d.w.z. pH, temperatuur en opgeloste-zuurstofconcentratie, en TOC en/of COD en hardheid waar van toepassing) (zie voorbeeld informatieblad in Bijlage 3);
- de volledige gegevens over de levende nakomelingen per moederdier (zie voorbeeld informatieblad in Bijlage 3);
- sterftecijfer onder de moederdieren en de dag(en) waarop de sterfte plaatsvond (zie voorbeeld informatieblad in Bijlage 3);
- de variatiecoëfficiënt van de vruchtbaarheid in de controlegroep (gebaseerd op het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven was);
- grafische voorstelling van het totale aantal levende nakomelingen per moederdier (voor elk replicatieonderzoek) dat nog in leven was aan het eind van de test afgezet tegen de concentratie van de teststof;
- de Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) voor de voortplanting, inclusief een beschrijving van de toegepaste statistische procedures en een indicatie van de omvang van het effect dat zou kunnen worden waargenomen, alsmede de No Observed Effect Concentration (NOEC) voor de voortplanting; waar van toepassing moet ook de LOEC/NOEC betreffende de mortaliteit van de moederdieren worden vermeld;
- voorzover van toepassing, de EC_x betreffende de voortplanting en betrouwbaarheidsintervallen en een grafiek van het voor de berekening daarvan gehanteerde model, de helling van de dosis/respons-curve en de standaardafwijking daarvan;
- andere waargenomen biologische effecten of metingen: vermelding van eventuele andere biologische effecten die werden waargenomen of gemeten (bijvoorbeeld groei van moederdieren), met inbegrip van eventuele passende onderbouwing;
- een toelichting op eventuele afwijkingen van de testmethode.

3.

LITERATUUR

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 maart 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Strauss. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.
- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 blz.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Strauss for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Kopenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) blz. 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

BIJLAGE 1

BEREIDING VAN VOLLEDIG BESCHREVEN MEDIA ELENDT M7 EN M4

Acclimatisering aan Elendt M7- en -M4-media

Sommige laboratoria hebben problemen ondervonden bij het rechtstreeks overbrengen van *Daphnia* in M4- (1) en M7-media. Toch is er enig succes geboekt met geleidelijke acclimatisering, d.w.z. overgang van het eigen medium naar 30 % Elendt, vervolgens naar 60 % Elendt en tot slot naar 100 % Elendt. Soms is een acclimatiseringsperiode van een volle maand nodig.

BEREIDING

Spoorelementen

Afzonderlijke stamoplossingen (I) van individuele spoorelementen worden eerst bereid in water met een geschikte zuiverheid, d.w.z. gedeïoniseerd, gedistilleerd of omgekeerde osmose. Uit deze verschillende stamoplossingen (I) wordt een enkelvoudige stamoplossing (II) bereid, die alle spoorelementen bevat (gecombineerde oplossing), te weten:

Stamoplossingen I (enkelvoudige stof)	Aan water toegevoegde hoeveelheid Mg/l	Concentratie (in relatie tot medium M4) -voudig	Ter bereiding van de gecombineerde stamoplossing II de volgende hoeveelheid stamoplossing I aan water toevoegen ml/l	
			M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000	–	–
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	–	–
Zowel de Na ₂ EDTA- als FeSO ₄ -oplossingen worden enkelvoudig bereid, samengebracht en onmiddellijk met een autoclaaf gesteriliseerd. Hiermee wordt verkregen:				
21 Fe-EDTA-		1 000-voudig	20,0	5,0

oplossing				
-----------	--	--	--	--

M4- en M7-media

M4- en M7-media worden als volgt bereid met behulp van stamoplossing II, macro-nutriënten en vitamines:

	Aan water toegevoegde hoeveelheid mg/l	Concentratie (in relatie tot medium M4) -voudig	Toegevoegde hoeveelheid stamoplossing ter bereiding van medium ml/l	
			M 4	M 7
Stamoplossing II gecombineerde spoelementen		20	50	50
Macro-nutriëntstamoplossingen (enkelvoudige stof)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Gecombineerde vitaminestamoplossing	–	10 000	0,1	0,1
De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt bereid door toevoeging van de 3 vitamines aan 1 liter water, zoals hieronder weergegeven:				
Thiaminehydrochloride	750	10 000	–	–
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10 000	–	–
Biotine	7,5	10 000	–	–

De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand bewaard in kleine fracties. De vitamines worden kort vóór gebruik aan de media toegevoegd.

N.B. Voeg, ter voorkoming van zoutneerslag bij de bereiding van de volledige media, de fracties van de stamoplossingen toe aan circa 500 - 800 ml gedeïoniseerd water en vul daarna aan tot 1 liter.

N.N.B. Zie voor de eerste publicatie betreffende het M4-medium Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Strauss. *Protoplasma*, 154, 25-33.

BIJLAGE 2

TOTALE ORGANISCHE KOOLSTOF (TOC) ANALYSE EN

OPSTELLING VAN EEN NOMOGRAFIE VOOR TOC-GEHALTE VAN ALGENVOEDING

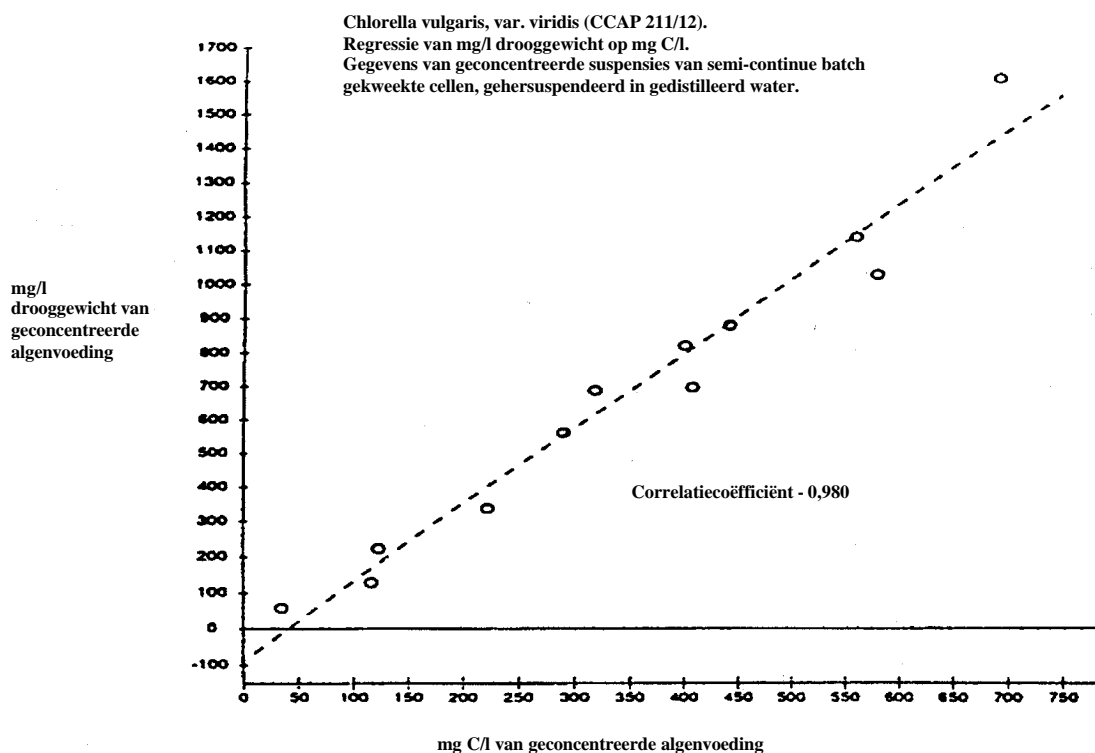
Normaal gesproken wordt het koolstofgehalte van de algenvoeding niet rechtstreeks gemeten, maar afgeleid uit correlaties (d.w.z. nomografieën) met alternatieve middelen als algencelaantal of lichtabsorptie.

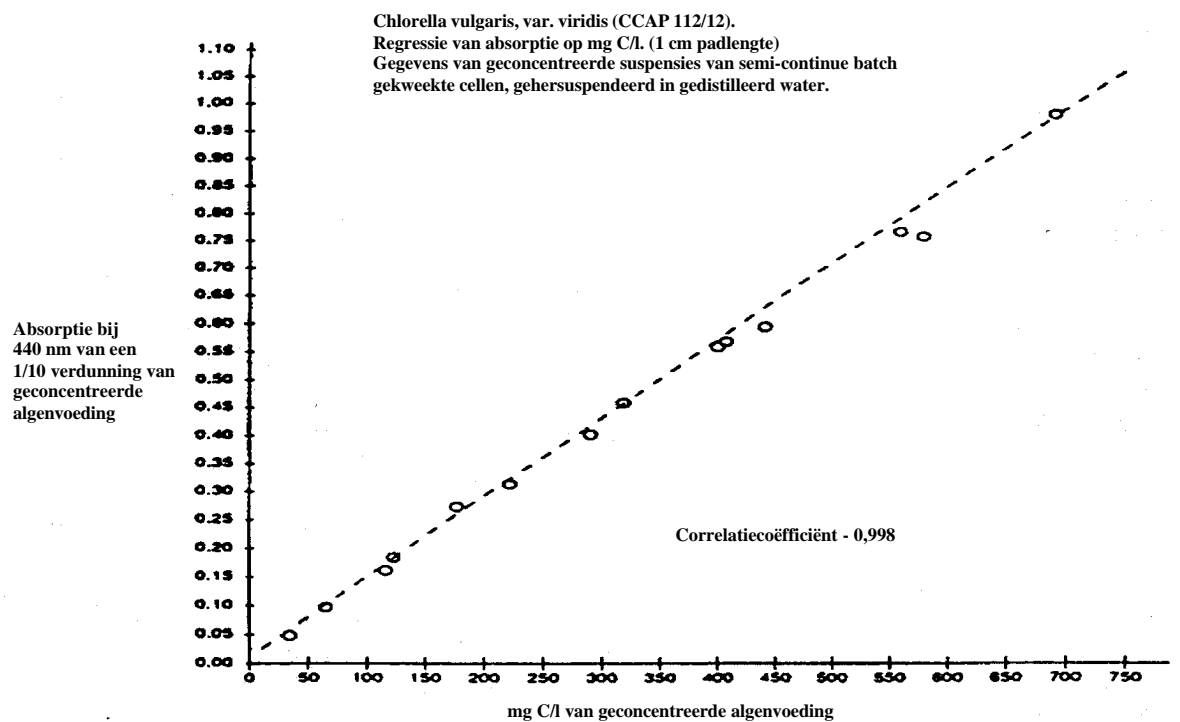
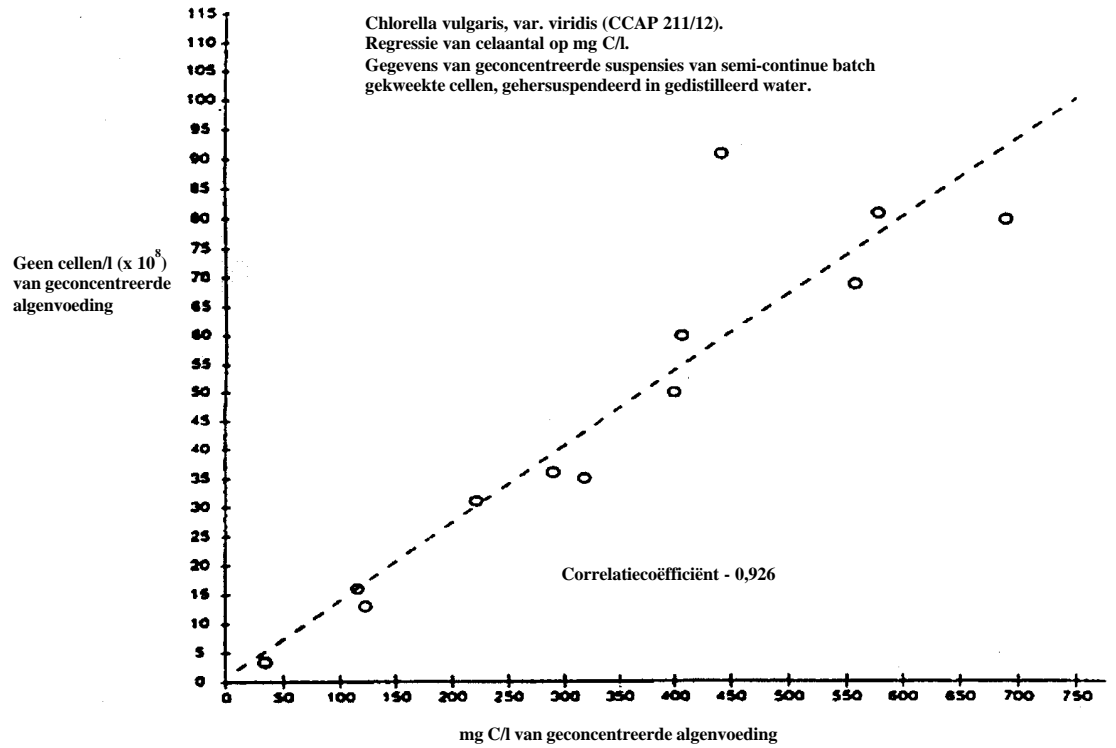
De TOC moet worden gemeten via hoge-temperatuuroxidatie en niet met methoden op basis van UV of persulfaat. (Zie: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, Londen WC1V 6HB).

Voor het opstellen van nomografieën moeten algen middels centrifugeren worden gescheiden van het groeimedium, gevolgd door hersuspensie in gedistilleerd water. De surrogaatparameter en de TOC-concentratie moet in elk monster driemaal worden gemeten. Blanco's van gedistilleerd water moeten worden geanalyseerd; de TOC-concentratie moet worden afgeleid uit die van het algenmonster.

De nomografie moet lineair zijn over het vereiste koolstofconcentratiebereik. Voorbeelden zijn hieronder weergegeven.

N.B. Deze grafieken mogen niet worden gebruikt voor conversiedoeleinden; het is van wezenlijk belang dat laboratoria hun eigen nomografieën opstellen.





BIJLAGE 3

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN MEDIUMVERVERSING, FYSISCH-CHEMISCHE CONTROLEGEGEVENS, VOEDING,

DAPHNIA-VOORTPLANTING EN MORTALITEIT VOLWASSEN DIEREN

Experiment nr: Begin gegevens : Kloon : Medium : Type voeding : Teststof : Nominale conc.:

Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Medium- verversing (aangeven)																									
PH *																								Nieuw	
																								Oud	
O ₂ mg/l *																								Nieuw	
																								Oud	
Temp (°C) *																								Nieuw	
																								Oud	
Voeding gegeven																									
Aantal levende																									Totaal
Vat 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Totaal
Cumulatieve mortaliteit volw. dieren ‡																									

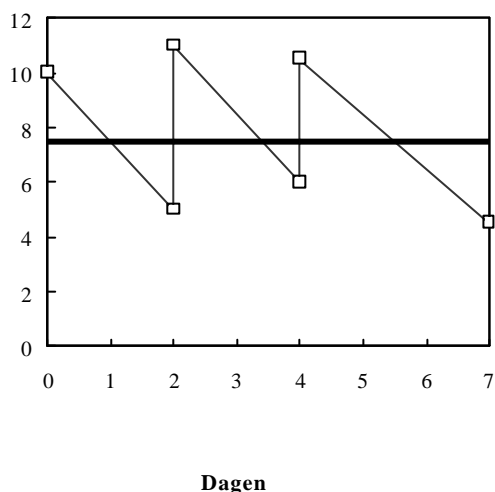
*Aangeven welk vat voor het experiment werd gebruikt
‡Eventuele mortaliteit van volwassen dieren aangeven als 'M' in desbetreffend hokje
†Niet-uitgekomen eitjes aangeven als 'AB' in desbetreffend hokje

BIJLAGE 5

BEREKENING TIJDGEWOGEN GEMIDDELDE

Tijdgewogen gemiddelde

Daar de concentratie van de teststof in de periode tussen de mediumverversingen kan afnemen, moet goed worden bekeken welke concentratie moet worden gekozen als representatief voor het concentratiebereik dat wordt ondergaan door de *Daphnia*-moederdieren. Deze keuze moet gebaseerd zijn op biologische én statistische overwegingen. Als bijvoorbeeld wordt aangenomen dat de voortplanting vóór alles wordt beïnvloed door de piekconcentratie, moet de maximumconcentratie worden gebruikt. Wanneer men er daarentegen van uitgaat dat het geaccumuleerde of langeretermijneffect van de toxische stof belangrijker is, is een gemiddelde concentratie relevanter. In dat geval is de tijdgewogen gemiddelde concentratie geschikt, aangezien daarbij rekening wordt gehouden met de variatie van de momentane concentratie over een bepaalde tijdsperiode.



Figuur 1 : Voorbeeld van tijdgewogen gemiddelde

Figuur 1 laat een voorbeeld zien van een (vereenvoudigde) test over 7 dagen met mediumverversing op dag 0, 2 en 4.

- De dunne zigzaglijn geeft de concentratie op enig tijdstip weer. Als vooronderstelling geldt dat de concentratie daalt volgens een exponentieel achteruitgangproces.
- De 6 vierkantjes geven de waargenomen concentraties weer zoals gemeten aan het begin en einde van elke verversingsperiode.
- De dikke, ononderbroken lijn geeft het tijdgewogen gemiddelde weer.

Het tijdgewogen gemiddelde wordt zo berekend dat het oppervlak onder dat gemiddelde gelijk is aan het oppervlak onder de concentratiekromme. Zie onderstaande Tabel 1 voor de berekening van dit voorbeeld.

Tabel 1: Berekening van het tijdgewogen gemiddelde

Verversing nr.	Dagen	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Oppervlak
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781
Totaal Dagen : 7					Totaal Oppervlak	50.091
					Tijdgew. Gem.	7.156

Dagen : het aantal dagen in de verversingsperiode

Conc0 : de gemeten concentratie aan het begin van elke verversingsperiode

Conc1 : de gemeten concentratie aan het einde van elke verversingsperiode

Ln(Conc0) : de natuurlijke logaritme van Conc0

Ln(Conc1) : de natuurlijke logaritme van Conc1

Oppervlak : het oppervlak onder de exponentiële kromme voor elke verversingsperiode. Het wordt berekend aan de hand van de volgende formule :

$$Oppervlak = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Dagen$$

Het tijdgewogen gemiddelde is het *Totaal Oppervlak* gedeeld door het *Totaal Dagen*.

Voor de toepasbaarheid op de *Daphnia*-voortplantingstest zou de tabel uiteraard moeten worden uitgebreid en betrekking moeten hebben op een periode van 21 dagen.

Het is duidelijk dat niet bevestigd kan worden dat het achteruitgangsproces inderdaad exponentieel is als de waarnemingen alleen plaatsvinden aan het begin en einde van elke verversingsperiode. Een andere kromme zou resulteren in een andere berekening van het *Oppervlak*. Hoe dan ook, het is alleszins plausibel uit te gaan van een exponentieel achteruitgangsproces en de weergegeven kromme is waarschijnlijk het beste alternatief bij gebrek aan andere gegevens.

Toch is de nodige voorzichtigheid geboden als geen enkele stof wordt aangetroffen bij de chemische analyse aan het eind van de verversingsperiode. Als niet ingeschat kan worden hoe snel de stof uit de oplossing verdwenen is kan er ook geen realistisch oppervlak onder de kromme worden vastgesteld, en dus ook geen aannemelijk tijdgewogen gemiddelde.