

NL



COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN

Brussel, 29 oktober 2003
COM(2003) 644 definitief

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEEL V - Bijlage X, deel C, bij het
voorstel voor een verordening

-

Voorstel voor een

VERORDENING VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD

inzake registratie, evaluatie en autorisatie van en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (Reach) en tot oprichting van een Europees Chemicaliënagentschap en wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en Verordening (EG) {over persistente organische stoffen}

Voorstel voor een

RICHTLIJN VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD

tot wijziging van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad teneinde deze aan te passen aan Verordening (EG) nr. [...] van het Europees Parlement en de Raad inzake registratie, evaluatie en autorisatie van en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen

(ingediend door de Commissie)

{SEC(2003) 1171}

DEEL C: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT

C.1. ACUTE TOXICITEIT VOOR VISSSEN

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de acute letale toxiciteit van een stof voor vissen in zoet water. Met het oog op de keuze van de testmethode (statisch, semi-statisch of doorstroming) die het meest geschikt is om concentraties van de teststof gedurende de testperiode voldoende constant te houden, is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de teststof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met aanvullende gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Acute toxiciteit is het waarneembare schadelijke effect dat in een organisme wordt teweeggebracht binnen een korte tijd (dagen) van blootstelling aan een stof. In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan letale concentratie (LC_{50}), dat wil zeggen de concentratie in water waardoor 50 % van een groep vissen in de proef wordt gedood binnen een continue blootstellingsperiode, die moet worden vermeld.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

Voor deze test worden geen referentiestoffen gespecificeerd.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd, om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

De vissen worden gedurende 96 uur blootgesteld aan de teststof die in een reeks concentraties aan het water is toegevoegd. De sterfte wordt ten minste elke 24 uur genoteerd en de concentraties waarbij 50 % van de vissen sterft (LC_{50}) wordt indien mogelijk berekend voor elke waarnemingstijd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volledige test van toepassing.

De sterfte in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 % (of één vis indien minder dan tien worden gebruikt).

Het zuurstofgehalte moet gedurende de gehele test meer dan 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht zijn geweest.

De concentraties van de geteste stof dienen gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentraties gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen geven en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentraties beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentratie gedurende de gehele test gehandhaafd werden en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Voor stoffen die:

- (i) moeilijk oplosbaar zijn in het testmedium
- of
- (ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen
- of
- (iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen,

dient de bij het begin van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie moet na een evenwichtsperiode maar voordat de proefvissen worden ingebracht, worden bepaald.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

De pH mag niet meer dan 1 eenheid variëren.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Er kunnen drie verschillende procedures worden toegepast:

Statische test:

Toxiciteitstest waarbij de te onderzoeken oplossing niet stroomt. (Oplossingen blijven ongewijzigd gedurende de test.)

Semi-statische test:

Test waarbij de oplossing niet stroomt, maar de testoplossing periodiek per bak wordt ververs na een langere periode (bijvoorbeeld 24 uur).

Doorstroomtest:

Toxiciteitstest waarin het water voortdurend wordt ververs in de testbakken waarbij de te onderzoeken stof wordt meegevoerd met het water ten einde het testmedium te verversen.

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door verdunning van de stamoplossing. Indien hoge concentraties worden getest, kan de te onderzoeken stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De stoffen moeten normaal gezien slechts worden getest tot aan de oplosbaarheids grens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow} , of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een echte oplossing in water) is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidslimiet van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water verhinderd wordt).

Ultrasone dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water, of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controlevissen worden blootgesteld

aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien ten gevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

1.6.1.2. *Voorraad en verdunningswater*

Leidingwater (waarin geen chloor, zware metalen of andere stoffen in mogelijk schadelijke concentraties mogen voorkomen), goede kwaliteit natuurlijk water of synthetisch water (zie aanhangsel 1) kunnen worden gebruikt. Water met een totale hardheid van 10 tot 250 mg per liter (als CaCO_3) en met een pH van 6,0 tot 8,5 verdient de voorkeur.

1.6.2. **Apparatuur**

Alle apparatuur dient te zijn vervaardigd van chemisch inert materiaal.

- Automatisch verdunningsstelsel (voor doorstroomtest).
- Zuurstofmeter.
- Apparatuur voor de bepaling van de hardheid van water.
- Apparatuur voor de temperatuurbeheersing.
- pH-meter.

1.6.3. **Testvissen**

De vissen dienen gezond te zijn en vrij van elke waarneembare misvorming.

Het verdient aanbeveling de te gebruiken soorten te selecteren op basis van relevante praktische overwegingen, zoals goede beschikbaarheid gedurende het gehele jaar, goede houdbaarheid, geschiktheid voor testdoeleinden, relatieve gevoeligheid voor chemische stoffen, alsmede alle economische, biologische of ecologische factoren die van belang zijn. Tevens dient bij de keuze van de vissoort rekening gehouden te worden met de behoefte aan vergelijkbaarheid van de verkregen gegevens en met de bestaande internationale harmonisering (referentie 1).

Een lijst met voor de uitvoering van de onderhavige test aanbevolen vissoorten staat vermeld in aanhangsel 2; de zebra vis en de regenboogforel hebben de voorkeur.

1.6.3.1. *Het houden van voorraad*

Testvissen dienen bij voorkeur afkomstig te zijn van één partij, met ongeveer dezelfde lengte en leeftijd. De vissen moeten ten minste 12 dagen onder de volgende omstandigheden worden bewaard:

Hoeveelheid vis per liter:

aangepast aan het systeem (recirculatie of doorstroming) en de vissoort,

Water:

zie 1.6.1.2,

Licht:

per dag een belichtingsperiode van 12 à 16 uur,

Zuurstofgehalte:

ten minste 80 % van de verzadigingswaarde voor lucht,

Voeren:

drie keer per week of dagelijks; dit wordt 24 uur voor het begin van de test stopgezet.

1.6.3.2.

Sterfte

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd, waarbij de volgende criteria worden gehanteerd:

- in 7 dagen meer dan 10 % van de populatie: de gehele partij wordt afgekeurd;
- 5 tot 10 % van de populatie: de periode van het in voorraad houden wordt met nog 7 dagen verlengd. Indien geen nieuwe sterfgevallen optreden, wordt de partij goedgekeurd. Anders dient deze te worden afgekeurd;
- minder dan 5 % van de populatie: de partij wordt goedgekeurd.

1.6.4.

Aanpassing

Alle vissen moeten gedurende ten minste 7 dagen voor het gebruik worden blootgesteld aan water van de kwaliteit en de temperatuur zoals dat in de test zal worden gebruikt.

1.6.5.

Testprocedure

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.

Naast de testreeks wordt een controlegroep zonder de teststof uitgevoerd en, indien van toepassing, ook een controlegroep met de hulpstof.

Afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof kan gekozen worden voor een statische, semi-statische of doorstroomtest om aan de kwaliteitscriteria te voldoen.

Vissen worden als volgt aan de stof blootgesteld:

- Tijdsduur: 96 uur,
- Aantal dieren: ten minste 7 per concentratie,
- Bakken: van een capaciteit die in overeenstemming is met de aanbevolen hoeveelheid vis per liter,
- Hoeveelheid vis per liter: een maximale bezettingsgraad van 1,0 g per liter voor statische en semi-statische tests wordt aanbevolen; voor doorstroomsystemen kan een grotere hoeveelheid vis per liter aanvaardbaar zijn,
- Testconcentratie: ten minste vijf concentraties die verschillen met een constante welke niet groter is dan 2,2 en die zo mogelijk het gebied met een sterfte van 0 % tot 100 % bestrijken,
- Water: zie 1.6.1.2,
- Licht: dagelijks een belichtingsperiode van 12 à 16 uur,
- Temperatuur: aangepast aan de soort (Aanhangsel 2); voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen ± 1 °C.
- Zuurstofgehalte: ten minste 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht bij de gekozen temperatuur,
- Voeren: achterwege laten.

De vissen worden gecontroleerd na de eerste 2 tot 4 uur en ten minste elke 24 uur. Vissen worden geacht dood te zijn indien aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn. Dode vissen worden, zodra zij zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt geregistreerd.

Er wordt aantekening gemaakt van zichtbare afwijkingen (bijvoorbeeld evenwichtsverlies, veranderingen in zwemgedrag, ademhalingsfunctie, pigmentatie enzovoort).

De pH, zuurstofconcentratie en temperatuur moeten dagelijks worden gemeten.

Limiettest

Gebruik makend van de procedure zoals beschreven in deze methode, kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd met een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient te worden uitgevoerd met 7 à 10 vissen en eenzelfde aantal in de controlegroepen. (De binomiale theorie schrijft voor dat als bij gebruik van 10 vissen geen sterfte optreedt, de LC_{50} met een betrouwbaarheid van 99,9 % groter is dan de in de limiettest gebruikte concentratie. Met 7, 8 of 9 vissen geeft de afwezigheid van sterfte een betrouwbaarheid van ten minste 99 % dat de LC_{50} groter is dan de gebruikte concentratie.)

Indien sterfte optreedt, dient een volledige test te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen, dienen deze te worden vermeld.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet voor elke aanbevolen blootstellingsperiode op logaritmisches-waarschijnlijkheidspapier voor elk tijdstip waarop waarnemingen werden geregistreerd (24, 48, 72 en 96 uur) het sterftepercentage uit tegen de concentratie.

De LC_{50} en de betrouwbaarheidsintervallen ($p = 0,05$) dienen zo mogelijk voor iedere waarnemingsperiode geschat te worden met behulp van standaardprocedures; deze waarden moeten worden afgerond tot op één, of ten hoogste twee significante cijfers (voorbeelden voor afronding op twee cijfers: 170 voor 173,5; 0,13 voor 0,127; 1,2 voor 1,21).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/respons-percentages-kromme te steil is voor een berekening van de LC_{50} -waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2,2 slechts een sterfte van 0 respectievelijk 100 % geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC_{50} ligt.

Indien blijkt dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen:

- gegevens over de testvis (wetenschappelijke naam; stam; leverancier; eventuele voorbehandeling; afmeting en aantal dat voor elke testconcentratie gebruikt is;
- herkomst van het verdunningswater alsmede belangrijkste chemische kenmerken (pH, hardheid, temperatuur);
- voor stoffen met een geringe oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;
- concentratie van eventuele hulpstoffen;

- lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit bij de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossing;
- als chemische analyses zijn uitgevoerd, dienen de toegepaste methoden en de verkregen resultaten te worden vermeld;
- de resultaten van de limiettest, indien van toepassing;
- redenen voor de keuze van de testprocedure alsmede verdere details (bijvoorbeeld statisch, semi-statisch, doseersnelheid, doorstromingsnelheid, of er belucht is, hoeveelheid vis per liter, enzovoort);
- beschrijving van de testuitrusting;
- lichtregime;
- voor iedere 24 uur het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen;
- gegevens om aan te tonen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan;
- een tabel met de cumulatieve mortaliteit voor elke concentratie en voor de controlegroepen (en, zo nodig, voor de controlegroep met hulpstof) op elke aanbevolen waarnemingstijd;
- grafiek van de concentratie/responspercentage-kromme aan het einde van de test;
- zo mogelijk, de LC₅₀-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen);
- statistische procedures voor de bepaling van de LC₅₀-waarden;
- als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen sterfte veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100 % sterfte veroorzaakte.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 Final and updates.
- (2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.
- (3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.
- (4) ISO 7346/1, /2 en /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- (5) Eidgenössisches Departement des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 L(1) und L(15).
- (7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- (8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- (9) Environmental Protection Agency, Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- (10) Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012, January 1978.
- (11) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- (12) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

- (13) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
- (16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- (17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- (18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.
- (19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50} . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, C.E., Bush, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50} . US EPA.

Aanhangsel 1

Synthetisch water

Voorbeeld van een geschikt verdunningswater

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedistilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Het toestel voor de distillatie van water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Stamoplossingen

| | |
|--|---------|
| CaCl ₂ · 2H ₂ O (calciumchloridedihydraat) | 11,76 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O (magnesiumsulfaatheptahydraat) | 4,93 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| NaHCO ₃ (natriumwaterstofcarbonaat) | 2,59 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| KCl (kaliumchloride) | 0,23 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |

Synthetisch verdunningswater

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen en vul met water aan tot 1 liter.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet $7,8 \pm 0,2$ bedragen.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (zoutzuur).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en hoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol per liter. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol per liter.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

Aanhangsel 2

Voor tests aanbevolen vissoorten

| Aanbevolen soort | Aanbevolen testtemperatuur (°C) | Aanbevolen totale lengte van het proefdier (cm) |
|---|---------------------------------|---|
| <i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis | 20-24 | 3,0 ± 0,5 |
| <i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Modderkruiper | 20-24 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Gewone karper | 20-24 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Japans rijstvisje | 20-24 | 3,0 ± 1,0 |
| <i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy | 20-24 | 3,0 ± 1,0 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Zonnebaars | 20-24 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regenbogenforel | 12-17 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Goudwinde | 20-24 | 6,0 ± 2,0 |

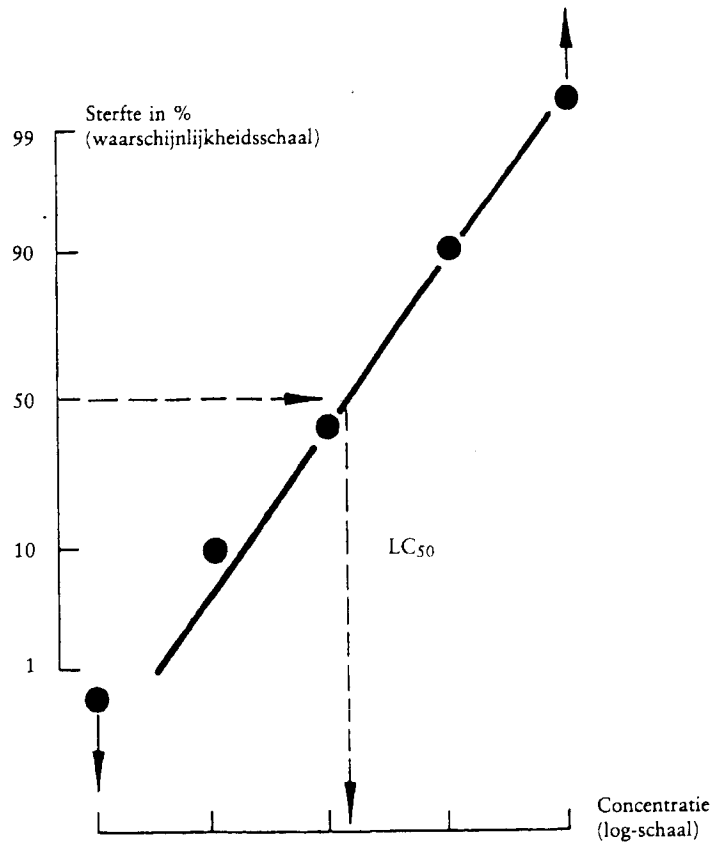
Herkomst

Bovengenoemde vissen laten zich gemakkelijk kweken en/of zijn het gehele jaar ruim verkrijgbaar. Zij kunnen worden geteeld en gekweekt in viskwekerijen of in het laboratorium onder omstandigheden waarbij ziektekiemen en parasieten onder controle gehouden worden, zodat de proefdieren gezond zijn en hun afkomst bekend is. Deze vissen zijn in veel delen van de wereld beschikbaar.

Aanhangsel 3

Voorbeeld van een concentratie / sterftepercentage — kromme

Voorbeeld van de bepaling van de LC_{50} -waarde met logaritmic-waarschijnlijkheidspapier



C.2. ACUTE TOXICITEIT VOOR DAPHNIA

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de mediaan van de effectieve concentratie van een stof (EC_{50}) waarbij immobilisatie van *Daphnia* in zoet water optreedt. Alvorens de test te beginnen is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de stof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met verdere gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Aan de eis van de richtlijn met betrekking tot de LC_{50} voor *Daphnia* wordt beschouwd te zijn voldaan door de bepaling van de EC_{50} zoals beschreven in deze testmethode.

In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan van de effectieve concentratie (EC_{50}) voor immobilisatie. Dit is de concentratie (uitgaande van de beginwaarden) waarbij 50 % van de *Daphnia*'s in een testgroep wordt geïmmobiliseerd binnen een ononderbroken blootstellingsperiode die moet worden aangegeven.

Immobilisatie

Dieren die niet tot zwemmen in staat zijn binnen 15 seconden na zachtjes bewegen van het testvat, worden geacht immobiel te zijn.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van geteste soorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

De samenvatting van de resultaten van een EEG-ringtest, waarbij gebruik gemaakt werd van vier verschillende stoffen, wordt gegeven in aanhangsel 2.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd om aan te tonen dat de EC_{50} hoger is dan deze concentratie.

De *Daphnia* worden gedurende 48 uur blootgesteld aan de teststof die aan het water is toegevoegd in een aantal uiteenlopende concentraties; indien een kortere test wordt gebruikt moet een verantwoording hiervoor gegeven worden in het testrapport.

Als de concentraties van de teststof een geschikt gebied beslaan, zal onder overigens gelijke testomstandigheden het zwemvermogen van de *Daphnia* door verschillende concentraties van de teststof gemiddeld in verschillende mate worden beïnvloed. Verschillende concentraties hebben tot gevolg dat verschillende percentages *Daphnia* niet meer kunnen zwemmen aan het einde van de test. De concentraties die 0 of 100 % immobilisatie veroorzaken, worden rechtstreeks afgeleid uit de waarnemingen; de 48-uur EC_{50} wordt daarentegen zo mogelijk door berekening bepaald.

Voor deze methode wordt een statisch systeem gebruikt. Testoplossingen worden dan ook niet vernieuwd tijdens de blootstellingsperiode.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volledige test van toepassing.

De immobilisatie in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 %.

De proef-*Daphnia* in de controlegroepen mogen niet vastzitten aan het wateroppervlak.

Het is wenselijk dat gedurende het hele testverloop de opgeloste zuurstofconcentratie in de proefvaten boven 3 mg l^{-1} blijft. Onder geen enkele voorwaarde mag de opgeloste zuurstofconcentratie echter lager worden dan 2 mg l^{-1} .

De concentratie van de teststof dient gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentratie gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen vormen en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentratie beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentraties gedurende de gehele test gehandhaafd zijn en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Bij stoffen die:

- (i) slecht oplosbaar zijn in het testmedium
- of
- (ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen
- of
- (iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen,

dient de bij het begin van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie dient te worden bepaald na een periode van evenwichtinstelling, maar voor het uitzetten van de proeforganisme.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

De pH mag met niet meer dan 1 eenheid variëren.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door verdunning van de stamoplossingen. Indien hoge concentraties worden getest, kan de te onderzoeken stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De stoffen moeten normaal gezien slechts worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow} , of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een ware oplossing in water) is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidsgrens van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water wordt verhinderd, enzovoorts).

Ultrasone dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controle-*Daphnia* worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt aangeraden om de test te herhalen na correctie van de pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

1.6.1.2. Testwater

In deze test wordt synthetisch water gebruikt (zie aanhangsel 1 en referentie (2): ISO 6341). Om de noodzaak van acclimatisering vóór de test te vermijden wordt aanbevolen om voor de kweek water van dezelfde kwaliteit (pH, hardheid) te gebruiken als voor de test.

1.6.2. Apparatuur

Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare laboratoriumapparatuur en uitrusting. Materiaal dat rechtstreeks in contact komt met de testoplossingen moet bij voorkeur volledig van glas zijn.

- 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.

1.6.3. Testorganisme

De testsoort is bij voorkeur *Daphnia magna*, alhoewel *Daphnia pulex* ook is toegestaan. De testdieren moeten bij het begin van de test minder dan 24 uur oud, in het laboratorium gekweekt en vrij van zichtbare ziekten zijn, en een bekende voorgeschiedenis hebben (bijvoorbeeld kweek, eventuele voorbehandelingen enzovoort).

1.6.4. Testprocedure

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.

Naast de testreeks wordt één controlegroep zonder de teststof getest en, indien van toepassing, ook één controlegroep met de hulpstof.

Daphnia worden als volgt aan de stof blootgesteld:

- *Tijdsduur*: bij voorkeur 48 uur.
- *Aantal dieren*: ten minste 20 dieren bij iedere testconcentratie, bij voorkeur ingedeeld in vier groepen van vijf dieren of in twee groepen van tien.
- *Benodigd volume*: ten minste 2 ml testoplossing dient per dier te worden gerekend.
- *Testconcentratie*: de testoplossing moet onmiddellijk voor het toevoegen van de *Daphnia* worden bereid, bij voorkeur zonder gebruik te maken van andere oplosmiddelen dan water. De concentraties worden zo bereid dat ze een meetkundige reeks vormen, met een concentratie-verhouding die 2,2 niet overschrijdt. Concentraties voldoende voor 0 % en 100 % immobilisatie na 48 uur dienen te worden getest, alsmede een reeks tussenliggende graden van immobilisatie, aan de hand waarvan de EC₅₀-waarde na 48 uur kan worden berekend. Daarnaast dienen controlegroepen te worden getest.
- *Water*: zie 1.6.1.2.
- *Licht*: een licht-donker cyclus naar keuze.
- *Temperatuur*: de testtemperatuur moet tussen 18 en 22 °C liggen, maar voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen ± 0,1 °C.

- *Beluchting*: de testoplossing mag niet met luchtbellen worden belucht.
- *Voeren*: achterwege laten.

De pH en de zuurstofconcentratie van de controles en alle testconcentraties moeten na afloop van de test gemeten worden; de pH van de testoplossingen mag niet worden gewijzigd.

Vluchtige stoffen moeten worden getest in volledig gevulde, afgesloten vaten, die groot genoeg zijn om zuurstofgebrek te voorkomen.

De *Daphnia* worden in ieder geval geïnspecteerd na een blootstelling van 24 uur en nogmaals na 48 uur.

Limiettests

Met de in deze methode beschreven procedures kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de EC_{50} hoger is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd bij een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient te worden uitgevoerd met 20 *Daphnia*, ingedeeld in twee of vier groepen, en hetzelfde aantal in de controlegroep(en). Indien immobilisatie optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet voor elk tijdstip waarop waarnemingen werden geregistreerd (24 en 48 uur) het sterftepercentage uit tegen de concentratie op logaritmisches-waarschijnlijkheidspapier.

De EC_{50} en de betrouwbaarheidsintervallen ($p = 0,05$) dienen zo mogelijk voor iedere waarnemingsperiode geschat te worden met behulp van standaardprocedures; deze waarden moeten worden afgerond tot op één, of ten hoogste twee significante cijfers (voorbeelden voor afronding op twee cijfers: 170 voor 173,5; 0,13 voor 0,127; 1,2 voor 1,21).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/responspercentage-kromme te steil is voor een berekening van de EC_{50} -waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2,2 slechts 0 respectievelijk 100 % immobilisatie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de EC_{50} ligt.

Indien blijkt dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen:

- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam; stam; leverancier of herkomst; eventuele voorbehandeling; kweekmethode — met inbegrip van de herkomst van het voer, de soort en hoeveelheid voer en de frequentie waarmee gevoerd is);
- herkomst van het verdunningswater alsmede de belangrijkste chemische kenmerken (bijvoorbeeld pH, temperatuur, hardheid);
- in geval van stoffen met een lage oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;
- concentraties van eventuele hulpstoffen;
- lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit bij de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossingen;

- in geval van chemische analyses: toegepaste methoden en behaalde resultaten;
- de resultaten van de limiettest, indien van toepassing;
- beschrijving van de testuitrusting;
- lichtregime;
- de zuurstofgehalten, de pH-waarden en de temperaturen van de testoplossingen;
- gegevens om aan te tonen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan;
- een tabel met de cumulatieve immobilisatie voor elke concentratie en voor de controlegroep (en, zo nodig, voor de controlegroep met hulpstof) op elke aanbevolen waarnemingstijd (24 en 48 uur);
- grafiek van de concentratie/responspercentage-kromme aan het einde van de test;
- zo mogelijk, de EC₅₀-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen);
- statistische procedures voor de bepaling van de EC₅₀-waarden;
- als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen immobilisatie veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100% immobilisatie veroorzaakte.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C(81) 30 Final and updates.
- (2) International Standard ISO, Water Quality — Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341 1989.
- (3) AFNOR. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
- (4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).
- (6) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K.
- (7) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharmacol. Exper. Therap., 1949, vol. 96, 99-113.
- (8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- (9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.
- (10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM 1977, STP 634, 65-84.
- (11) Stephan, C. E., Bush, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

Aanhangsel 1

Synthetisch water

Voorbeeld van een geschikt verdunningswater (volgens ISO 6341)

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedistilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan 5 μScm^{-1} .

Het toestel voor de distillatie van water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Stamoplossingen

| | |
|---|---------|
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O (calciumchloridedihydraat) | 11,76 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O (magnesiumsulfaatheptahydraat) | 4,93 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| NaHCO ₃ (natriumwaterstofcarbonaat) | 2,59 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |
| KCl (kaliumchloride) | 0,23 g |
| Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter. | |

Synthetisch verdunningswater

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen en vul met water aan tot 1 l.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet $7,8 \pm 0,2$ bedragen.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (zoutzuur).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en hoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol per liter. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol per liter.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

Aanhangsel 2

Samenvatting van de resultaten van een EEG-ringtest, uitgevoerd in 1978 (ook aangehaald in referentie 2)

Let op: het doel van deze ringtest was de bepaling van de EC₅₀ na 24 uur.

Gebruikte stoffen:

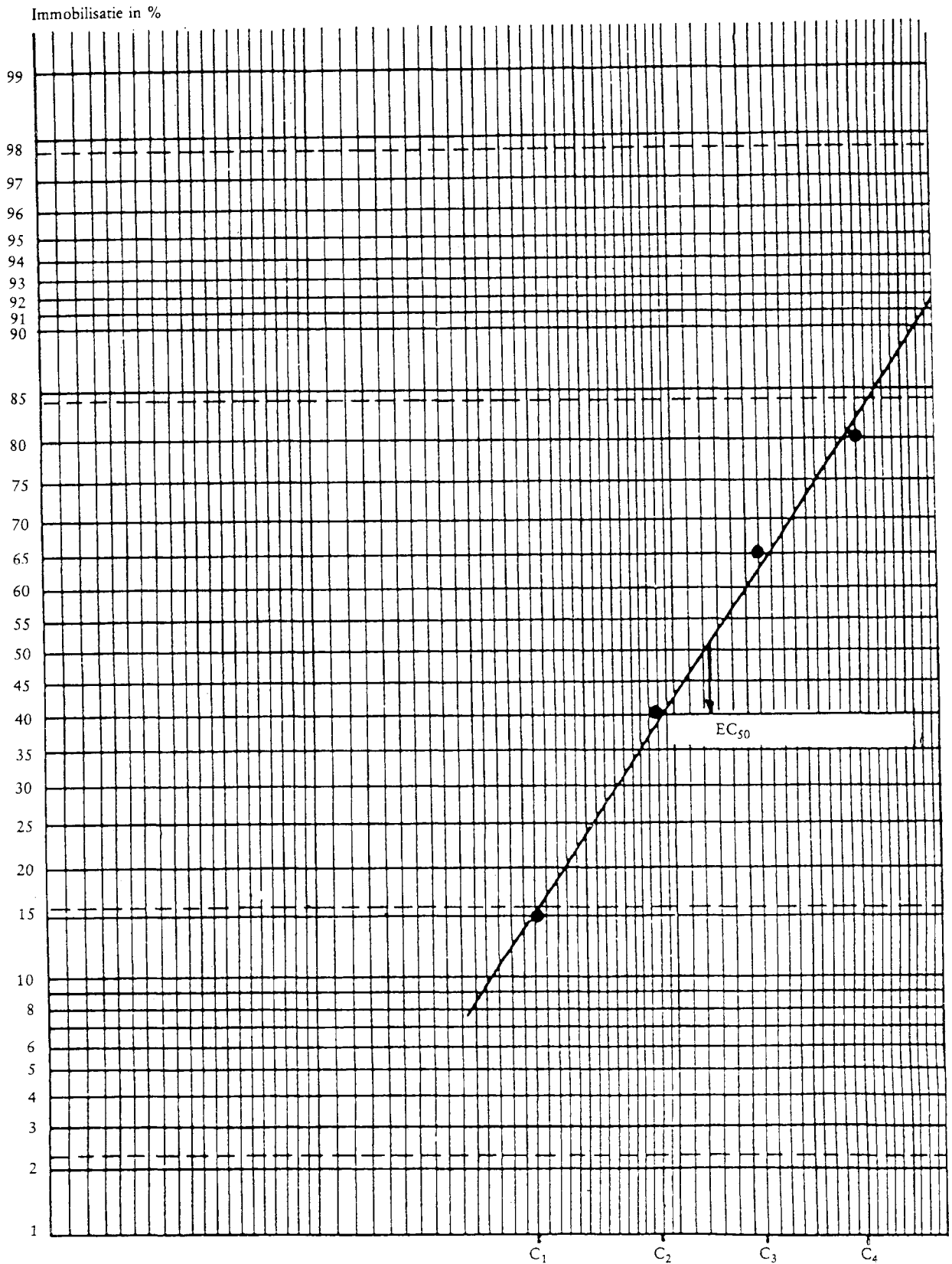
- 1) Kaliumdichromaat
- 2) Tetrapropylbenzeensulfonzuur
- 3) Tetrapropylbenzeensulfonzuur, natriumzout
- 4) 2,4,5-Trichloorfenoxiazijnzuur, kaliumzout

| Stof | Aantal deelnemende laboratoria | Aantal resultaten voor de berekening | EC ₅₀ -24 uur mg/l gemiddelde |
|------|--------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 46 | 129 | 1,5 |
| 2 | 36 | 108 | 27 |
| 3 | 31 | 84 | 27 |
| 4 | 32 | 72 | 770 |

Aanhangsel 3

Voorbeeld van concentratie/immobilisatiepercentage-curve

Voorbeeld van de bepaling van de EC_{50} -waarde met logaritisch-waarschijnlijkheidspapier



C.3. GROEIREMMINGSTEST MET ALGEN

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de effecten van een stof op de groei van een eencellige groene algensoort. Met relatief korte onderzoeken (72 uur) kunnen de effecten op verschillende generaties bepaald worden. Deze methode kan worden aangepast voor het gebruik met verschillende eencellige algensoorten; dan dient evenwel een beschrijving van de gebruikte methode bij het testrapport gevoegd te worden.

Deze test is eenvoudig toe te passen op in water oplosbare stoffen die, onder de testomstandigheden, waarschijnlijk in oplossing blijven.

De methode kan gebruikt worden voor stoffen die de meting van de algengroei niet direct storen.

Alvorens met de test te beginnen is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de stof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met nadere gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van belangrijke verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheid van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Celdichtheid: het aantal cellen per milliliter;

Groei: de toename van de celdichtheid gedurende de onderzoeksperiode;

Groeisnelheid: de toename van de celdichtheid per tijdseenheid;

EC₅₀: in deze methode de concentratie van een teststof waarbij ten opzichte van de controle een 50 % vermindering van de groei (E_bC₅₀) of de groeisnelheid (E_rC₅₀) optreedt;

NOEC (no observed effect concentration, concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen): in deze methode de hoogste geteste concentratie waarbij geen significante groeiremming wordt waargenomen ten opzichte van de controle;

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg · kg⁻¹).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder de testomstandigheden in het laboratorium niet in belangrijke mate is veranderd.

Als een referentiestof wordt gebruikt, moeten de resultaten worden weergegeven in het testrapport. Kaliumdichromaat mag als referentiestof gebruikt worden, maar de kleur zou van invloed kunnen zijn op de kwaliteit en intensiteit van het voor de cellen beschikbare licht, alsmede op de spectrometrische bepalingen indien deze gebruikt worden. Kaliumdichromaat is gebruikt tijdens een internationale inter-laboratoriumtest (zie referentie (3) en Aanhangsel 2).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd om aan te tonen dat de EC_{50} hoger is dan deze concentratie.

Onder bepaalde omstandigheden worden exponentieel groeiende culturen van geselecteerde groene algen gedurende verschillende generaties blootgesteld aan verschillende concentraties van de teststof.

De testoplossingen worden geïncubeerd gedurende 72 uur en de celdichtheid wordt in iedere oplossing ten minste éénmaal per 24 uur gemeten. De remming van de groei wordt bepaald in verhouding tot een controlecultuur.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volle studie toepasselijk.

De celdichtheid in de controleculturen moet binnen drie dagen ten minste met een factor 16 zijn toegenomen.

De concentratie van de teststof dient gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentratie gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen vormen en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentratie beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentraties gedurende de gehele test gehandhaafd werden en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Bij stoffen die:

- (i) slecht oplosbaar zijn in het testmedium of
- (ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen of
- (iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen

dient de bij het begin van de proef gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie dient te worden bepaald na een periode van evenwichtinstelling.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria werd voldaan.

Zoals bekend kunnen significante hoeveelheden van de te onderzoeken stof tijdens de testperiode opgenomen in de biomassa van de algen. Om aan de bovengenoemde kwaliteitscriteria te voldoen dient daarom rekening gehouden te worden met zowel de hoeveelheid van de stof die is opgenomen in de algenbiomassa, als met de hoeveelheid stof in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, gemeten in de waterkolom). Daar de bepaling van de concentratie van de stof in de biomassa van de algen aanzienlijke technische problemen kan stellen, kan aangetoond worden dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan door de proef bij de hoogste concentratie uit te voeren, maar dan zonder algen, en de concentraties aan het begin en het einde van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) te meten.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door geschikte hoeveelheden aan de algen-voorcultuur toe te voegen (zie Aanhangsel 1). Stoffen moeten normaal gezien enkel worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow} , of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een echte oplossing in water), is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidsgrens van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water wordt verhinderd, enz.).

Ultrasonische dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controles worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt aangeraden om de test te herhalen na correctie van de pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld.

1.6.1.2. Testmedium

Het water dient gedistilleerd water van goede kwaliteit te zijn, of gedeïoniseerd water met een soortelijke geleiding van minder dan $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Het toestel voor de distillatie van het water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Het volgende medium wordt aangeraden.

Vier stamoplossingen worden bereid volgens de volgende tabel. De stamoplossingen worden gesteriliseerd met behulp van membraanfiltratie of een autoclaaf en opgeslagen in het donker bij 4 °C. Stamoplossing nr. 4 mag alleen met membraanfiltratie gesteriliseerd worden. Deze stamoplossingen worden verdund om de eindconcentraties van voedingsstoffen in de testoplossingen te bereiken.

| Voedingsstoffen | Concentratie in de stamoplossing | | Eindconcentratie in de testoplossing | |
|--|----------------------------------|------|--------------------------------------|------|
| Stamoplossing 1: Macro-voedingsstoffen | | | | |
| NH ₄ Cl | 1,5 | g/l | 15 | mg/l |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 1,2 | g/l | 12 | mg/l |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1,8 | g/l | 18 | mg/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,5 | g/l | 15 | mg/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 | g/l | 1,6 | mg/l |
| Stamoplossing 2: Fe-EDTA | | | | |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 80 mg/l | | 0,08 mg/l | |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 100 mg/l | | 0,1 mg/l | |
| Stamoplossing 3: Sporelementen | | | | |
| H ₃ BO ₃ | 185 | mg/l | 0,185 | mg/l |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 415 | mg/l | 0,415 | mg/l |
| ZnCl ₂ | 3 | mg/l | 3×10^{-3} | mg/l |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 1,5 | mg/l | $1,5 \times 10^{-3}$ | mg/l |
| CuCl ₂ · 2H ₂ O | 0,01 | mg/l | 10^{-5} | mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 7 | mg/l | 7×10^{-3} | mg/l |
| Stamoplossing 4: NaHCO₃ | | | | |
| NaHCO ₃ | 50 | g/l | 50 | mg/l |

De pH van het medium na bereiken van een evenwichtstoestand met lucht is ongeveer 8.

1.6.2. Apparatuur

- Gangbare laboratoriumuitrusting,
- Testkolven met een geschikt volume (erlenmeyers van 250 ml zijn bijvoorbeeld geschikt indien het volume van de testoplossing 100 ml bedraagt). Alle testkolven dienen identiek te zijn wat betreft materiaal en dimensies.
- Kweekapparaat: kast of kamer waarin de temperatuur binnen het bereik van 21 tot 25 °C, binnen ± 2 °C gehouden kan worden, en een continue uniforme verlichting in het spectraal bereik van 400 tot 700 nm. Indien de algen in de controleculturen de vereiste groeisnelheid hebben bereikt, mag aangenomen worden dat de groeivoorwaarden, inclusief de lichtintensiteit, voldoende waren.

Het verdient aanbeveling op het gemiddelde niveau van de testoplossingen een lichtintensiteit tussen 60 en $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (35 tot 70×10^{18} fotonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) te gebruiken, gemeten in het bereik van 400 tot 700 nm met behulp van een geschikte receptor. Voor lichtmeters die geijkt zijn in lux is een gelijkwaardig bereik van 6 000 tot 10 000 lx aanvaardbaar.

Deze lichtintensiteit kan verkregen worden met behulp van vier tot zeven 30 W TL-lampen van het universele witte type (kleurtemperatuur ongeveer 4 000 K) op 0,35 m afstand van de algencultuur.

- Celdichtheidsmetingen moeten uitgevoerd worden met een rechtstreekse telling voor levende cellen, bijvoorbeeld een microscoop met telkamers. Andere methoden (fotometrie, turbidimetrie ...) kunnen gebruikt worden indien zij voldoende gevoelig zijn en indien is aangetoond dat zij voldoende goed gecorreleerd zijn met de celdichtheid.

1.6.3. Testorganismen

Het verdient aanbeveling om als groene algensoort een snelgroeiend soort te nemen dat geschikt is voor kweken en testen. De volgende soorten hebben de voorkeur:

- *Selenastrum capricornutum*, bijvoorbeeld ATCC 22662 of CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, bijvoorbeeld 86.81 SAG.

Opmerking:

ATCC = American Type Culture Collection (V.S.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (G.B.)

SAG = Algencultuur-verzameling (Göttingen, B.R.D.)

Indien andere soorten worden gebruikt, dient de stam te worden vermeld.

1.6.4. Testprocedure

Het concentratiebereik waarin het optreden van de effecten wordt verwacht, kan bepaald worden met behulp van proeven voor afbakening van het testbereik.

De twee meeteenheden voor groei (biomassa en groeisnelheid) kunnen resulteren in zeer uiteenlopende maten van groeiremming; beide dienen gebruikt te worden in de afbakeningsproef om er zeker van te zijn dat de meetkundige concentratiereeks een schatting van de $E_b C_{50}$ en de $E_r C_{50}$ mogelijk maakt.

Oorspronkelijke celdichtheid

Het verdient aanbeveling dat de celdichtheid in de testculturen voor *Selenastrum capricornutum* en *Scenedesmus subspicatus* in het begin ongeveer 10^4 cellen/ml bedraagt. Indien andere soorten worden gebruikt dient de biomassa vergelijkbaar te zijn.

Concentraties van de teststof

Ten minste vijf testconcentraties worden zo bereid dat ze een meetkundige reeks vormen, met een concentratie-verhouding die niet groter is dan 2,2. De laagste geteste concentratie mag geen waarneembaar effect op de algengroei vertonen. De hoogste geteste concentratie dient de groei ten opzichte van de controle met ten minste 50 % te remmen en bij voorkeur de groei volledig te stoppen.

Duplo's en controles

Elke testconcentratie dient in triplo getest te worden. Drie controles zonder teststof dienen te worden uitgevoerd en indien van toepassing tevens drie controles met hulpstof. Indien gemotiveerd mag het testschema veranderd worden om het aantal concentraties op te voeren en het aantal duplo's per concentratie te verminderen.

Uitvoering van de test

Testculturen met de gewenste concentraties teststof en de gewenste hoeveelheid algen-inoculum worden bereid door toevoeging van hoeveelheden van de stamoplossing van de teststof aan de vereiste hoeveelheden preculturen van de algen (zie Aanhangsel 1).

De testkolven worden geschud en in het kweekapparaat geplaatst. De algen worden in suspensie gehouden door schudden, roeren of doorborrelen met lucht om aldus de gasuitwisseling te verbeteren en de pH-variatie in de testoplossing te verminderen. De culturen moeten op een temperatuur van 21 tot 25 °C worden gehouden, afgeregeld tot op ± 2 °C.

De celdichtheid in iedere kolf wordt ten minste 24, 48, en 72 uur na de start van de test bepaald. Gefilterd algen-medium met de juiste concentratie van de teststof wordt gebruikt als achtergrondbepaling, indien gebruik wordt gemaakt van andere methoden voor meting van de celdichtheid dan rechtstreekse telling.

De pH wordt aan het begin van de test en na 72 uur gemeten.

De pH van de controles mag tijdens de test niet meer dan 1,5 eenheid variëren.

Testen van vluchtige stoffen

Tot op heden bestaat er geen algemeen aanvaarde methode voor het testen van vluchtige stoffen. Indien van een stof bekend is dat ze neiging heeft tot verdampen, kunnen gesloten kolven met een vergrote vrije ruimte boven de vloeistof gebruikt worden. Er dient evenwel bij het berekenen van de vrije ruimte in de gesloten kolven rekening gehouden te worden met een mogelijk CO₂-gebrek. Variaties op deze methode zijn voorgesteld (zie referentie (4)).

Getracht moet worden om de hoeveelheid stof te bepalen die in de oplossing blijft en aanbevolen wordt om extra voorzichtig te zijn bij het interpreteren van resultaten van tests met vluchtige chemicaliën met behulp van gesloten systemen.

Limiettest

Met de procedure beschreven in deze methode kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de EC₅₀ hoger is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd bij een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient ten minste in drievoud te worden uitgevoerd met hetzelfde aantal controles. De twee groei-eenheden (biomassa en groeisnelheid) dienen bij de limiettest gebruikt te worden.

Indien in een limiettest een gemiddelde afname van de biomassa of de groeisnelheid ten opzichte van de controle van 25 % of meer wordt gevonden, dient een volledige studie te worden uitgevoerd.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De in de testculturen en controles gemeten celdichtheid wordt in tabellen genoteerd met de concentraties van de teststof en de tijdstippen van de meting. De gemiddelde waarde van de celdichtheid voor iedere concentratie van de teststof en de controles wordt uitgezet als functie van de tijd (0-72 uur) om aldus groeikrommes te verkrijgen.

Om de concentratie/effect verhouding te bepalen dienen de twee volgende benaderingen te worden gevolgd. Bepaalde stoffen kunnen de groei stimuleren bij lage concentraties. Alleen met gegevens die op een remming tussen 0 en 100 % wijzen, moet rekening gehouden worden.

2.1. VERGELIJKING VAN DE OPPERVLAKTEN ONDER DE GROEIKROMMES

De oppervlakte tussen de groeikrommes en de horizontale lijn $N = N_0$ kan berekend worden volgens de formule:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

waarin

A = de oppervlakte,

N_0 = het aantal cellen/ml op tijd t_0 (begin van de test),

N_1 = het gemeten aantal cellen/ml op tijd t_1 ,

N_2 = het gemeten aantal cellen/ml op tijd t_n ,

t_1 = het tijdstip van de eerste meting na het begin van de test,

t_n = het tijdstip van de nde meting na het begin van de test,

n = het aantal uitgevoerde metingen sinds het begin van de test.

Het percentage celgroeiremming bij iedere teststofconcentratie (I_A) wordt berekend volgens de formule:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

waarin

A_c = de oppervlakte tussen de groeikromme voor de controle en de horizontale lijn $N = N_0$,

A_t = de oppervlakte tussen de groeikromme bij concentratie t en de horizontale lijn $N = N_0$.

I_A -waarden worden uitgezet tegen de bijbehorende concentraties op semilogaritmisch papier of op semilogaritmisch waarschijnlijkheidspapier. Indien uitgezet op waarschijnlijkheidspapier, dienen de punten op het oog, of met behulp van een berekende regressie te worden verbonden door een rechte lijn.

De EC_{50} wordt geschat op grond van de regressielijn door de concentratie af te lezen die overeenkomt met 50 % remming ($I_A = 50$ %). Om de met deze methode verkregen waarde ondubbelzinnig te onderscheiden, wordt voorgesteld om het symbool E_bC_{50} te gebruiken. Het is van wezenlijk belang om de E_bC_{50} aan te geven met de betrokken blootstellingsperiode, bijvoorbeeld E_bC_{50} (0-72 uur).

2.2. VERGELIJKING VAN DE GROEISNELHEID

De gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) voor exponentieel groeiende culturen kan als volgt berekend worden:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

waarin t_0 de tijd aan het begin van de test is.

De gemiddelde specifieke groeisnelheid kan anderszins worden afgeleid uit de helling van de regressielijn, verkregen door $\ln N$ uit te zetten tegen de tijd.

Het percentage remming van de specifieke groeisnelheid bij iedere teststofconcentratie ($I_{\mu t}$) wordt berekend volgens de formule:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

waarin

μ_c = de gemiddelde specifieke groeisnelheid

μ_t = de gemiddelde specifieke groeisnelheid voor de testconcentratie t

De percentuele afname van de gemiddelde specifieke groeisnelheid bij iedere teststofconcentratie ten opzichte van de controlewaarde wordt uitgezet tegen de logaritme van de concentratie. De EC_{50} kan vervolgens afgelezen worden uit de verkregen grafiek. Om de met deze methode verkregen EC_{50} -waarde ondubbelzinnig te onderscheiden, wordt voorgesteld om het symbool E_rC_{50} te gebruiken. Het tijdstip van de meting dient te worden aangegeven; als de waarde bij de tijdstippen 0 en 72 uur behoort, wordt bijvoorbeeld het symbool als $E_rC_{50}(0-72 \text{ uur})$ aangegeven.

Opmerking: De specifieke groeisnelheid is een logaritmische term, zodat kleine veranderingen in de groeisnelheid kunnen leiden tot grote veranderingen in de biomassa. De E_bC - en E_rC -waarden zijn daarom niet numeriek vergelijkbaar.

2.3. BEREKENING VAN DE NOEC

De concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (NOEC) wordt bepaald volgens een geschikte statistische procedure voor meervoudige monstervergelijking (bijvoorbeeld variantie-analyse en Dunnett-test), met behulp van de uit de triplo-tests verkregen afzonderlijke waarden van de oppervlakten onder de groeikrommes A (zie punt 2.1), of de specifieke groeisnelheden μ (zie 2.2).

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen:

- teststof: gegevens voor chemische identificatie;
- gegevens over het testorganisme: oorsprong, laboratoriumcultuur, stamnummer, kweekmethode;
- testomstandigheden:
 - datum van het begin en het einde van de test, alsmede de duur;
 - temperatuur;
 - samenstelling van het medium;
 - kweekapparatuur;
 - pH van de oplossingen aan het begin en het einde van de test (een verklaring dient gegeven te worden als pH-veranderingen van meer dan 1,5 eenheid werden waargenomen);
 - medium en de gebruikte methode voor het oplossen van de teststof en de concentratie van het medium in de testoplossing;
 - lichtintensiteit en -kwaliteit;
 - geteste concentraties (gemeten of nominaal);
- resultaten:
 - celdichtheid in iedere kolf op ieder meetpunt en de methode voor het bepalen van de celdichtheid;
 - gemiddelde waarden van de celdichtheid;
 - groeikrommes;
 - grafische presentatie van de concentratie/effect relatie;
 - EC-waarden en de berekeningsmethode;
 - NOEC;
 - andere waargenomen effecten.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201. Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlijn, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*”, in: Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg 1986.
- (3) ISO 8692 — Water Quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi en M. Vighi — Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123-1126.

Aanhangsel 1

Voorbeeld van een procedure voor het kweken van algen.

Algemene observaties

Het doel van het kweken op basis van de volgende procedure is het verkrijgen van algenculturen voor toxiciteitstesten.

Geschikte methoden moeten gebruikt worden om te verzekeren dat de algenculturen niet besmet worden met bacteriën (ISO 4833). Axenische culturen zijn gewenst, maar eensoortige algenculturen zijn verplicht.

Alle behandelingen dienen te worden uitgevoerd onder steriele omstandigheden ter vermijding van besmetting met bacteriën of andere algen. Besmette culturen dienen te worden afgekeurd.

Procedure voor het verkrijgen van algenculturen

Bereiding van de voedingsstoffenoplossingen (media):

Het medium kan bereid worden door verdunnen van de geconcentreerde stamoplossingen van voedingsstoffen. Voor vast medium wordt 0,8 % agar toegevoegd. Het medium moet steriel zijn. Sterilisatie met een autoclaaf kan leiden tot verlies van NH_3 .

Stamculturen:

De stamculturen bestaan uit kleine algenculturen die regelmatig op vers medium worden overgezet om aldus als nieuw uitgangsmateriaal voor tests te dienen. Indien de culturen niet regelmatig worden gebruikt, worden zij uitgestreken in schuine agarbuizen. Deze worden ten minste éénmaal per twee maanden overgebracht op vers medium.

De stamculturen worden gekweekt in erlenmeyers met het geschikte medium (volume ongeveer 100 ml). Wanneer de algen geïncubeerd worden bij 20 °C met continue verlichting, is wekelijks overzetten vereist.

Gedurende het overzetten wordt een hoeveelheid „oud” medium met steriele pipetten zodanig overgebracht naar de kolf met het verse medium, dat de beginconcentratie van de snelgroeiende soort ongeveer 100 maal kleiner is dan in de oude cultuur.

De groeisnelheid kan bepaald worden uit de groeikromme. Indien bekend, is het mogelijk de dichtheid te schatten waarbij de cultuur moet worden overgezet naar het nieuwe medium. Dit dient te geschieden voordat de cultuur de afstervingsfase bereikt.

Voorcultuur:

De voorcultuur dient om een aantal algen te geven dat geschikt is voor inoculatie van de testculturen. De voorculturen worden geïncubeerd onder testomstandigheden en worden gebruikt terwijl zij nog exponentieel groeien, normaal gezien na een incubatieperiode van drie dagen. Wanneer de algenculturen misvormde of abnormale cellen bevatten, moeten ze worden afgekeurd.

Aanhangsel 2

In ISO 8692 („Water Quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*”) worden de volgende resultaten vermeld voor een interlaboratoriumtest, uitgevoerd door 16 laboratoria, met kaliumdichromaat als teststof:

| | Gemiddelde (mg/l) | Bereik (mg/l) |
|----------------------|-------------------|---------------|
| E_rC_{50} (0-72 h) | 0,84 | 0,60 tot 1,03 |
| E_bC_{50} (0-72 h) | 0,53 | 0,20 tot 0,75 |

C.4. BEPALING VAN DE GEMAKKELIJKE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

DEEL I. ALGEMEEN

1.1. INLEIDING

Voor het testen van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid van chemische stoffen in een aëroob watermedium worden zes testmethoden beschreven:

- (a) DOC (opgeloste organische koolstof) Aflakkingstest (Methode C.4-A)
- (b) Gewijzigde OESO-Screening test — Aflakking DOC (Methode C.4-B)
- (c) Kooldioxyde (CO₂) Ontwikkelingstest (Gewijzigde Sturm-test) (Methode C.4-C)
- (d) Manometrische respirometrie (Methode C.4-D)
- (e) Gesloten-flestest (Methode C.4-E)
- (f) MITI (Ministerie voor Internationale Handel en Industrie — Japan) (Methode C.4-F)

In deel I van de methode worden zowel de algemene aanwijzingen als de op alle zes tests betrekking hebbende aanwijzingen gegeven. In de Delen II tot en met VII worden bijzonderheden over de afzonderlijke methoden vermeld. De bijlagen bevatten definities, formules en nadere toelichting.

Bij een vergelijkend onderzoek tussen laboratoria in OESO-verband in 1988 bleek dat de methoden overeenstemmende resultaten geven. Afhankelijk van de fysische kenmerken van de te onderzoeken stof kan echter de voorkeur naar de ene of de andere methode gaan.

1.2. KEUZE VAN DE GESCHIKTE METHODE

Voor een keuze van de meest in aanmerking komende methode is informatie over de oplosbaarheid, de dampdruk en de adsorptie-eigenschappen van de stof van wezenlijk belang. Voor het berekenen van theoretische waarden en/of het controleren van gemeten waarden voor parameters, b.v. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (zie Bijlagen I en II) moet de scheikundige structuur of de brutoformule bekend zijn.

Teststoffen die tot ten minste 100 mg/l in water oplosbaar zijn kunnen met alle methoden worden bepaald, mits ze niet-vluchtig en niet-adsorberend zijn. Voor stoffen die slecht in water oplosbaar, vluchtig of adsorberend zijn, worden in Tabel 1 geschikte methoden aangegeven. De wijze waarop slecht in water oplosbare stoffen en vluchtige stoffen kunnen worden behandeld wordt beschreven in Bijlage III. Matig vluchtige stoffen kunnen worden onderzocht met behulp van de DOC-aflakkingsmethode, indien er voldoende gasruimte in de proefvaten is (deze zouden goed afgesloten moeten worden). In dat geval dient een niet-biologische controle te worden toegepast voor het verdisconteren van een eventueel fysisch verlies.

Tabel 1: Bruikbaarheid van testmethoden

| Test | Analytische methode | Geschiktheid voor de volgende stoffen: | | |
|------------------------------|---|--|----------|-------------|
| | | Slecht oplosbaar | Vluchtig | Adsorberend |
| DOC Aflakking | Opgeloste organische koolstof | — | — | + / - |
| Gew. OESO Aflakking | Opgeloste organische koolstof | — | — | + / - |
| Ontwikkeling CO ₂ | Respirometrie: CO ₂ -ontwikkeling | + | — | + |
| Manometrische respirometrie | Manometrische respirometrie: zuurstofverbruik | + | + / - | + |
| Gesloten fles | Respirometrie: opgeloste zuurstof | + / - | + | + |
| MITI | Respirometrie: zuurstofverbruik | + | + / - | + |

Informatie over de zuiverheid of de relatieve hoeveelheden van belangrijke componenten van het testmateriaal is nodig voor een interpretatie van de verkregen resultaten, vooral wanneer de uitkomsten gering of marginaal zijn.

Informatie over de giftigheid van de teststof voor bacteriën (Bijlage IV) kan zeer nuttig zijn voor het kiezen van de juiste testconcentraties en kan essentieel zijn voor een juiste interpretatie van een geringe waarde voor de biologische afbraak.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Voor een controle op de procedure worden referentiestoffen die aan de criteria voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid voldoen onderzocht door een geschikte proefvolume referentiestof parallel met de gewone testuitvoeringen te behandelen.

Geschikte chemische stoffen zijn aniline (vers gedistilleerd), natriumacetaat en natriumbenzoaat. Deze referentiestoffen worden bij de onderhavige methoden alle afgebroken, zelfs wanneer niet bewust entmateriaal wordt toegevoegd.

Voorgesteld is een referentiestof te zoeken die wel gemakkelijk biologisch afbreekbaar is maar de toevoeging van een entmateriaal vereist. Daartoe is kaliumwaterstoftalaat voorgesteld, maar de geschiktheid moet nog worden aangetoond voordat deze stof als referentiestof aangenomen kan worden.

In de respirometrische testen kunnen stikstof bevattende verbindingen als gevolg van nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Een oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium wordt geënt en onder aërobe omstandigheden in het donker of in gedempt licht bebroed. De hoeveelheid DOC in de testoplossing die het gevolg is van het entmateriaal dient zo laag mogelijk te zijn in vergelijking met de hoeveelheid DOC tengevolge van de teststof.

Voor de endogene activiteit van het entmateriaal wordt een correctie aangebracht door middel van parallelle blanco proeven met entmateriaal maar zonder teststof, ofschoon de endogene activiteit van cellen in aanwezigheid van een teststof niet volledig overeenstemt met die van de endogene controle. De werking van de procedures wordt gecontroleerd door een parallelle test met een referentiestof uit te voeren.

In het algemeen wordt de afbraak gevolgd door de bepaling van parameters, zoals DOC, CO₂-productie en opgenomen zuurstof en worden op voldoende frequente tijdstippen metingen gedaan om het begin en het einde van de biologische afbraak vast te stellen. Bij automatische respirometers is de meting continu. Soms wordt de DOC gemeten naast een andere parameter, maar gewoonlijk wordt dit slechts bij het begin en bij de afloop van de test gedaan. Voor het bepalen van de primaire afbraak van de teststof en voor het bepalen van de concentratie van eventuele gevormde tussenproducten (verplicht bij de MITI-test) kan ook een specifieke chemische analyse worden uitgevoerd.

Gewoonlijk duurt de test 28 dagen. De proeven kunnen echter ook eerder dan na 28 dagen, en wel zodra de kromme voor de biologische afbraak gedurende ten minste 3 bepalingen een plateau vertoont, worden beëindigd. De proeven kunnen ook langer dan 28 dagen worden voortgezet, wanneer uit de kromme blijkt dat de biologische afbraak wel begonnen is, maar dat op dag 28 nog geen plateau is bereikt.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. Reproduceerbaarheid

In verband met de aard van de biologische afbraak en van de als entmateriaal gebruikte gemengde bacterie-populaties dienen bepalingen ten minste in tweevoud te worden uitgevoerd.

De ervaring leert in het algemeen dat hoe hoger de aanvankelijk aan het testmedium toegevoegde concentratie micro-organismen is, hoe geringer de afwijking tussen herhaalde bepalingen is. Uit ringtests is ook gebleken dat er tussen de resultaten van verschillende laboratoria grote verschillen kunnen zijn, maar gewoonlijk wordt met gemakkelijk biologische afbreekbare stoffen een goede overeenstemming verkregen.

1.5.2. Geldigheid van de test

Een test wordt geldig beschouwd indien het verschil tussen de uiterste waarden van de in de test meermalen uitgevoerde metingen van de verwijdering van teststof op het plateau-niveau, aan het einde van de test of aan het einde van het venster van 10 dagen, minder is dan 20 % en indien het percentage afbraak van de referentiestof na 14 dagen het niveau voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid heeft bereikt. Indien aan een van deze voorwaarden niet is voldaan, dient de test te worden herhaald. Wegens de strengheid van de methoden behoeven lage waarden nog niet te betekenen dat de teststof onder milieu-omstandigheden niet biologisch afbreekbaar is, maar wel dat meer onderzoek nodig is om de biologische afbreekbaarheid vast te stellen.

Indien in een toxiciteitstest waarbij zowel de teststof als een referentiestof aanwezig is, in 14 dagen minder dan 35 % afbraak (gebaseerd op DOC) of minder dan 25 % afbraak (gebaseerd op ThOD of ThCO₂) is opgetreden, kan worden aangenomen dat de teststoffen remmend werken (zie ook Bijlage IV). De testreeks dient dan te worden herhaald, zo mogelijk met een lagere concentratie teststof en/of een hogere concentratie entmateriaal, maar niet meer dan 30 mg vaste stof per liter.

1.6. ALGEMENE WERKWIJZEN EN BEREIDINGEN

Algemene omstandigheden die van toepassing zijn op de test zijn in Tabel 2 samengevat. Apparatuur en overige experimentele omstandigheden die op afzonderlijke tests betrekking hebben worden verderop in het hoofdstuk voor die test beschreven.

Tabel 2: Testomstandigheden

| Test | DOC Afvlakking | CO ₂ -ontwikkeling | Manometrische respirometrie | Gewijzigde OECD-test | Gesloten fles | MITI (I) |
|--|--|-------------------------------|-------------------------------------|---|---|--|
| Concentratie teststof als in mg/l mg DOC/l mg ThOD/l | 10-40 | 10-20 | 100 10-40 50-100 | | 2-10 5-10 | 100 |
| Concentratie entmateriaal (in cellen/l, bij benadering) | ≤ 30 mg/l SS of ≤ 100 ml effluent/l (10 ⁷ - 10 ⁸) | | | 0,5 ml secundair effluent/l (10 ⁵) | ≤ 5 ml effluent/l (10 ⁴ - 10 ⁶) | 30 mg/l SS (10 ⁷ - 10 ⁸) |
| Concentratie elementen in anorganisch medium (in mg/l): | | | | | | |
| P | 116 | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 122 | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05-0,1 | | | | 0,05-0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | bij voorkeur 7,0 |
| Temperatuur | 22 ± 2 °C | | | | | 25 ± 1 °C |
| DOC = opgeloste organische koolstof | | | ThOD = theoretisch zuurstofverbruik | | SS = gesuspendeerde vaste stof | |

1.6.1. Verdunningswater

Gedeïoniseerd of gedistilleerd water, dat vrij is van remmende concentraties giftige stoffen (b.v. Cu^{++} -ionen) wordt gebruikt. Het mag niet meer dan 10 % van de hoeveelheid organische koolstof die met het testmateriaal wordt geïntroduceerd bevatten. De grote zuiverheid van het testwater is nodig om hoge waarden van de blanco-proeven te vermijden. Besmetting kan het gevolg zijn van aanwezige verontreinigingen en ook van de ionenuitwisselende harsen en van de lysis van bacteriën en algen. Voor elke reeks tests dient slechts gebruik te worden gemaakt van een enkele voorraad water, die vooraf door middel van DOC-analyse is gecontroleerd. Zo'n controle is niet nodig voor de gesloten fles-test, maar het zuurstofverbruik van het water moet laag blijven.

1.6.2. Voorraadoplossingen van anorganische componenten

Voor het bereiden van testoplossingen worden voorraadoplossingen met geschikte concentraties van anorganische componenten aangemaakt. Voor de methoden DOC-afvlakking, gewijzigde OESO-test, CO_2 -ontwikkeling, manometrische respirometrie en gesloten fles kunnen de onderstaande voorraadoplossingen worden gebruikt (met verschillende verdunningsfactoren).

De verdunningsfactoren en, voor de MITI-test, de specifieke bereiding van het anorganische medium, worden in de hoofdstukken van de afzonderlijke tests beschreven.

Voorraadoplossingen:

De onderstaande voorraadoplossingen worden bereid met gebruikmaking van reagentia van analytische kwaliteit.

| | | |
|-----|--|---------|
| (a) | Monokaliumdiwaterstoforthofosfaat, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Dikaliummonowaterstoforthofosfaat, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Dinatriummonowaterstoforthofosfaat-dihydraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 33,40 g |
| | Ammoniumchloride, NH_4Cl | 0,50 g |

Oplossen in water en tot 1 liter aanvullen. De pH van de oplossing moet 7,4 zijn.

| | | |
|-----|--|---------|
| (b) | Calciumchloride, watervrij, CaCl_2 | 27,50 g |
| | of calciumchloride-dihydraat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 36,40 g |
| | In water oplossen en tot 1 liter aanvullen | |
| (c) | Magnesiumsulfaat-heptahydraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | In water oplossen en tot 1 liter aanvullen | |
| (d) | IJzer(III)chloride-hexahydraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | In water oplossen en tot 1 liter aanvullen | |

Opmerking: Teneinde deze oplossing (d) niet onmiddellijk voor gebruik te behoeven te bereiden wordt één druppel geconcentreerde HCl of 0,4 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur-dinatriumzout (EDTA) per liter toegevoegd.

1.6.3. Voorraadoplossingen van chemicaliën

Indien de oplosbaarheid meer dan 1 g/l bedraagt, wordt bijvoorbeeld 1-10 g, zoals toepasselijk is, aan teststof of referentiestof in gedeïoniseerd water opgelost en tot 1 liter aangevuld. In andere gevallen worden voorraadoplossingen in het anorganische medium bereid of wordt de stof rechtstreeks aan het anorganische medium toegevoegd. Voor het bewerken van minder goed oplosbare stoffen wordt verwezen naar Bijlage III, maar in de MITI-test (Methode C.4-F) dienen noch oplosmiddelen noch emulgatoren te worden gebruikt.

1.6.4. Entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, (chloorvrij) behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan. Indien bij de DOC-afvlakking, de CO_2 -ontwikkeling en de manometrische respirometrie actief slib wordt gebruikt, dient dit te worden onttrokken aan een behandeling-sinstallatie of installatie op laboratoriumschaal die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater verwerkt. Gebleken is dat entmateriaal van andere bronnen een grotere spreiding van resultaten geeft. Voor de gewijzigde OESO-test en de gesloten-flestest is een meer verdund entmateriaal zonder slibvlokken nodig en bij voorkeur wordt dan als bron een secundair effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of van een laboratoriuminstal-

latie met huishoudelijk afvalwater genomen. Voor de MITI-test is het entmateriaal afkomstig van een mengsel van bronnen. Het wordt in het hoofdstuk van die test beschreven.

1.6.4.1. *Entmateriaal uit actief slib*

Uit de beluchtingstank van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afval verwerkt, wordt een vers monster actief slib verzameld. Grote deeltjes worden zonnig door filtratie door een fijne zeef verwijderd; daarna wordt het slib aëroob gehouden.

In plaats daarvan kan na verwijdering van eventuele grote deeltjes worden bezonken of gecentrifugeerd (b.v. 10 min. bij 1 100 g). De bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen. Het geconcentreerde slib kan in het mineraal medium gewassen worden; daarna wordt het in anorganisch medium gesuspenseerd tot een concentratie van 3-5 g gesuspendeerde vaste stof/l en belucht tot het tijdstip van gebruik.

Slib moet afkomstig zijn van een correct werkend zuiveringsstation. Als slib afkomstig is van een installatie met hoge omloopsnelheid, of geacht wordt remmers te bevatten, dient het te worden gewassen. Het opnieuw gesuspendeerde slib wordt na grondig mengen bezonken of gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen en het gewassen slib wordt in een volgend volume anorganisch medium opnieuw gesuspenseerd. Deze procedure wordt herhaald totdat het slib geacht wordt vrij te zijn van overmaat substraat of remmer.

Nadat het slib volledig opnieuw is gesuspenseerd, of bij niet behandeld slib direct, wordt vlak voor gebruik een monster getrokken voor de bepaling van het droog gewicht aan gesuspendeerde vaste stoffen.

Een andere mogelijkheid is het homogeniseren van actief slib (3-5 g gesuspendeerde vaste stof per l). Het slib wordt 2 min. bij matige snelheid in een mechanische menger behandeld. Het gemengde slib wordt gedurende 30 min. of zoveel langer als nodig bezonken en de vloeistof wordt afgeschonken en gebruikt als entmateriaal in een hoeveelheid van 10 ml/l anorganisch medium.

1.6.4.2. *Andere bronnen van entmateriaal*

Dit kan worden betrokken van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Er wordt een vers monster verzameld en dit wordt tijdens transport aëroob gehouden. Na 1 uur bezinken of filtreren door een grof filterpapier wordt het afgeschonken effluent of het filtraat aëroob gehouden zolang als nodig is. Tot 100 ml van dit soort entmateriaal per liter mineraal medium kan gebruikt worden.

Een verdere bron van entmateriaal is oppervlaktewater. In dit geval wordt een monster van een geschikt oppervlaktewater, b.v. rivieren, plassen, verzameld en aëroob gehouden tot het nodig is. Zonnig wordt het entmateriaal door filtreren of centrifugeren geconcentreerd.

1.6.5. **Preconditionering van entmateriaal**

Entmateriaal kan op de proefomstandigheden worden gepreconditioneerd, maar mag niet vooraf aan de teststof worden aangepast. Preconditionering bestaat uit het beluchten van actief slib gedurende 5-7 dagen in anorganisch medium of secundaire effluent bij de testtemperatuur. Door preconditionering wordt de nauwkeurigheid van de testmethode soms verbeterd doordat de blanco-waarden worden verlaagd. Het wordt niet nodig geacht het entmateriaal voor de MITI-test te preconditioneren.

1.6.6. **Niet-biologische controles**

Zonnig wordt gecontroleerd op mogelijke niet-biologische afbraak van de teststof door het bepalen van de verwijdering van DOC, de zuurstofopname of de kooldioxyde-ontwikkeling in steriele controles die geen entmateriaal bevatten. Het testmateriaal wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan (0,2-0,45 micrometer) of door toevoeging van een geschikte giftige stof met een geschikte concentratie. Indien gebruik gemaakt wordt van membraanfiltratie, moeten de monsters aseptisch verzameld worden, om de steriliteit ervan te behouden. De adsorptie van de teststof moet op voorhand uitgesloten worden. Is dit niet het geval, en is het entmateriaal uit actief slib afkomstig, moeten tests waarbij de biologische afbreekbaarheid als DOC-verwijdering bepaald wordt, een abiotische controle bevatten, die geënt en vergiftigd wordt.

1.6.7. Aantal kolven

Het aantal kolven in een doorsnee proef wordt in de betreffende hoofdstukken voor elke test beschreven.

Kolven van het volgende soort kunnen gebruikt worden:

| | |
|-------------------------------|--|
| testsuspensie: | met teststof en entmateriaal |
| entmateriaalblanco: | met entmateriaal alleen |
| procedurecontrole: | met referentiestof en entmateriaal |
| abiotische steriele controle: | met teststof — steriel (zie 1.6.6.) |
| adsorptiecontrole: | met teststof, entmateriaal en steriliserend middel |
| toxiciteitscontrole: | met teststof, referentiestof en entmateriaal. |

Het is beslist nodig de bepalingen in de testsuspensie en entmateriaalblanco parallel uit te voeren. Het is raadzaam de bepalingen in de andere kolf parallel te volgen.

Dit is echter wellicht niet altijd mogelijk. Men dient zich er van te vergewissen dat er voldoende monsters worden genomen of afgelezen om een bepaling van het percentage verwijdering in het venster van 10 dagen mogelijk te maken.

1.7. GEGEVENS EN EVALUATIE

Bij de berekening van D_t , percentage afbraak, worden de gemiddelde waarden van duplo-metingen van de parameter zowel in de testvaten als van de entmateriaalblanco gebruikt. De formules daarvoor zijn vermeld in de onderstaande hoofdstukken die op de afzonderlijke tests betrekking hebben. Het verloop van de afbraak wordt grafisch weergegeven en het 10-dagen venster wordt aangegeven. Het percentage verwijdering dat na afloop van het 10-dagen venster is bereikt en de waarde van het plateau of, indien van toepassing, aan het eind van de test, worden berekend en gerapporteerd.

Bij de respirometrische tests kunnen stikstof bevattende verbindingen door nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

1.7.1. Afbraak gemeten door middel van DOC-bepaling

Op elk tijdstip van monsterneming moet het percentage afbraak (D_t) voor de kolven met teststof apart, aan de hand van gemiddelden van in duplo gemeten DOC-waarden, berekend worden; het doel hiervan is, de validiteit van de test te bevestigen (zie 1.5.2). Het percentage afbraak wordt met de volgende formule berekend :

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t ,

C_o = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat (mg DOC/l),

C_t = gemiddelde concentratie DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat op tijdstip t (mg DOC/l),

C_{bo} = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium (mg DOC/l),

C_{bt} = gemiddelde concentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium op tijdstip t (mg DOC/l).

Alle concentraties worden experimenteel gemeten.

1.7.2. Afbraak gemeten door middel van specifieke analyse

Wanneer de specifieke analytische gegevens beschikbaar zijn, wordt de primaire biologische afbraak berekend:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t , gewoonlijk 28 dagen,

S_a = overblijvende hoeveelheid teststof in het entmedium aan het eind van de test (mg),

S_b = overblijvende hoeveelheid teststof in de blanco test met water/medium waaraan alleen de teststof was toegevoegd (mg).

1.7.3. Niet-biologische afbraak

Indien gebruik wordt gemaakt van een abiotische steriele controle, wordt het percentage niet-biologische afbraak berekend :

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

waarin:

$C_{s(0)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag t

1.8. RAPPORTAGE

Het testrapport bevat, voorzover mogelijk, de volgende gegevens:

- teststof en referentiestof en zuiverheid daarvan;
- testomstandigheden;
- entmateriaal: aard en plaats(en) van bemonstering, concentratie en eventuele pre-conditionering;
- indien bekend, hoeveelheid en aard van industrieel afval dat in rioolwater aanwezig is;
- testduur en testtemperatuur;
- in geval van slecht oplosbare teststoffen, de uitgevoerde behandeling;
- toegepaste testmethode; voor elke wijziging van de procedure dienen wetenschappelijke gronden en een toelichting te worden gegeven;
- gegevensformulier;
- alle eventueel waargenomen remmingsverschijnselen;
- eventueel waargenomen niet-biologische afbraak;
- specifieke analytisch-chemische gegevens, indien beschikbaar;
- analytische gegevens over tussenproducten, indien beschikbaar;
- de grafiek van het percentage afbraak tegen de tijd voor de teststof en de referentiestof; de aanloopfase, de afbraakfase, het 10-dagen venster en de helling dienen duidelijk te zijn aangegeven (Bijlage I); indien de test aan de validiteitscriteria heeft voldaan, kan het gemiddelde van de percentages afbraak van de teststof bevattende kolven voor de grafiek gebruikt worden.
- percentage verwijdering na het 10-dagen venster, alsmede op het plateau of aan het eind van de test.

DEEL II. DOC-AFVLAKKINGSTEST (Methode C.4-A)

II.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume aan geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie van de teststof (10-40 mg DOC/l) als de enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt bij 22 ± 2 °C in het donker of in gedempt licht belucht.

De afbraak wordt door middel van DOC-analyse met regelmatige tussenpozen gedurende 28 dagen gevolgd. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie aan verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de DOC in de blanco-entmateriaalcontrole) als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie wordt uitgedrukt. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend uit een aanvullende chemische analyse die bij het begin en het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

II.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

II.2.1. Apparatuur

- (a) Erlenmeyerkolven, b. v. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;
- (b) Schudmachine geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een voldoende vermogen voor het in stand houden van aërobe omstandigheden in alle kolven;
- (c) Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;
- (d) DOC-analyse-apparaat;
- (e) Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;
- (f) Centrifuge.

II.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing 1.6.2.

10 ml oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

II.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie 1.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. en 1.6.5.

II.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof gebracht dat een concentratie met een chemisch equivalent aan 10-40 mg DOC/l wordt verkregen. De pH wordt gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met actief slib of een andere bron van entmateriaal (zie 1.6.4.) tot een uiteindelijke concentratie van niet meer dan 30 mg gesuspenderde vaste stof per liter wordt verkregen. Tevens worden controles van entmateriaal in anorganisch medium, maar zonder test- of referentiestof, bereid.

Zonodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie 1.6.6.).

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bij voorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

II.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: adsorptiecontrole

Kolf 8: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

II.2.6. Uitvoering van de test

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagen venster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagen venster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zonodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (I.6.1.) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken, wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd.

Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefilterde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd danwel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 °C of langere tijd beneden -18 °C bewaard.

II.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

II.3.1. Verwerking van resultaten

Het percentage afbraak op tijdstip wordt berekend zoals aangegeven bij I.7.1. (DOC-bepaling) en, eventueel, bij I.7.2. (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

II.3.2. Geldigheid van de resultaten

Zie I.5.2.

II.3.3. Rapportage

Zie I.8.

II.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

DOC-AFVLAKKINGSTEST

1. LABORATORIUM
2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST
3. TESTSTOF

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0 : mg/l als teststof

4. ENTMATERIAAL

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Pre-conditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l.

5. KOOLSTOFBEPALINGEN

Koolstofanalyse-apparaat: . . .

| | Kolf nr. | | DOC na n dagen (mg/l) | | | | | |
|--------------------------------------|----------|-----------------------|---|-------|-------|-------|-------|--|
| | | | 0 | n_1 | n_2 | n_3 | n_x | |
| Teststof plus entmateriaal | 1 | a_1 | | | | | | |
| | | a_2 | | | | | | |
| | | a, gem. $C_{a(t)}$ | | | | | | |
| | 2 | b_1 | | | | | | |
| | | b_2 | | | | | | |
| | | b, gem. $C_{b(t)}$ | | | | | | |
| Blanco entmateriaal, zonder teststof | 3 | c_1 | | | | | | |
| | | c_2 | | | | | | |
| | | c, gem. $C_{c(t)}$ | | | | | | |
| | 4 | d_1 | | | | | | |
| | | d_2 | | | | | | |
| | | d, gem. $C_{d(t)}$ | | | | | | |
| | | | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | |

6. EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS

| Kolf nr. | | % afbraak na n dagen | | | | |
|----------|---|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Gem. (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formules kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE (facultatief)

| | Tijd (dagen) | |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | t |
| DOC.conc. (mg/l) in steriele controle | C _{s(o)} | C _{s(t)} |

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE (facultatief)

| | resthoeveelheid teststof aan het einde van de test (mg/l) | % primaire afbraak |
|-------------------|---|------------------------------------|
| Steriele controle | S _b | |
| Geënt testmedium | S _a | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

DEEL III. GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST (Methode C.4-B)

III.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-40 mg DOC/l) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt geënt met 0,5 ml effluent per liter medium. Het mengsel wordt in het donker of in gedempt licht bij 22 ± 2 °C belucht.

De afbraak wordt gedurende 28 dagen met regelmatige tussenpozen gevolgd door middel van DOC-analyse. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de waarde in de blanco-entmateriaalcontrole) wordt uitgedrukt als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

III.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

III.2.1. Apparatuur

- (a) Erlenmeyerkolven, b.v. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;
- (b) Schudmachine — geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met een automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een zodanig vermogen dat in alle kolven aërobe omstandigheden kunnen worden gehandhaafd;
- (c) Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;
- (d) DOC-analyse-apparaat;
- (e) Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;
- (f) Centrifuge

III.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

Bij deze methode wordt slechts 0,5 ml effluent/liter als entmateriaal gebruikt en daarom kan het nodig zijn het medium te versterken met spoorelementen en groeifactoren. Dit geschiedt door toevoeging van 1 ml van elk van de onderstaande oplossingen per liter uiteindelijk medium:

Spoorelementoplossing:

| | |
|--|----------|
| Mangaansulfaat-tetrahydraat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 39,9 mg |
| Boorzuur, H_3BO_3 | 57,2 mg |
| Zinksulfaat-heptahydraat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 42,8 mg |
| Ammoniumheptamolybdaat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ | 34,7 mg |
| Fe-chelaat (FeCl_3 -ethyleendiaminetetraazijnzuur) | 100,0 mg |

Deze stoffen worden opgelost in verdunningswater en de oplossing wordt tot 1 000 ml met verdunningswater aangevuld.

Vitamine-oplossing:

Gistextract 15,0 mg

Het gistextract wordt opgelost in 100 ml verdunningswater. De oplossing wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan van 0,2 micron of vers bereid.

III.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal is afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Zie I.6.4.2. en I.6.5.

Hiervan wordt 0,5 ml per liter mineraal medium gebruikt.

III.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in de afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof toegevoegd dat een concentratie met een chemisch equivalent van 10-40 mg DOC/l wordt verkregen. De pH-waarden worden gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met rioolwaterzuiveringseffluent in een hoeveelheid van 0,5 ml/liter (zie I.6.4.2.). Tevens worden controles voor entmateriaal in het anorganische medium bereid zonder test- of referentiestof.

Zonodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie I.6.6.).

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bij voorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

III.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: adsorptiecontrole

Kolf 8: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

III.2.6. Uitvoering van de test

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagen venster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagen venster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zonodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (I.6.1.) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspenseerd. Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefilterde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd danwel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 °C of langere tijd beneden -18 °C bewaard.

III.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

III.3.1. Verwerking van de resultaten

Het percentage afbraak op tijdstip t wordt berekend zoals aangegeven bij I.7.1. (DOC-bepaling) en, eventueel, bij I.7.2. (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

III.3.2. Geldigheid van de resultaten

Zie I.5.2.

III.3.3. Rapportage

Zie I.8.

III.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder wordt een voorbeeld van een gegevensformulier gegeven.

GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST

1. LABORATORIUM
2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST
3. TESTSTOF

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0 : mg/l als teststof

4. ENTMATERIAAL

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Pre-conditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. KOOLSTOFBEPALINGEN

Koolstofanalyse-apparaat:

| | Kolf nr. | | DOC na n dagen (mg/l) | | | | |
|--------------------------------------|----------|--------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|
| | | | 0 | n_1 | n_2 | n_3 | n_x |
| Teststof plus entmateriaal | 1 | a_1 | | | | | |
| | | a_2 | | | | | |
| | | a, gem. $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | b_1 | | | | | |
| | | b_2 b, gem. $C_{b(t)}$ | | | | | |
| | | | | | | | |
| Blanco entmateriaal, zonder teststof | 3 | c_1 | | | | | |
| | | c_2 | | | | | |
| | | c, gem. $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | d_1 | | | | | |
| | | d_2 | | | | | |
| | | d, gem. $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | |

6. EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS

| Kolf nr. | | % afbraak na n dagen | | | | |
|----------|---|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Gem. (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formulés kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE (facultatief)

| | Tijd (dagen) | |
|--|-------------------|-------------------|
| | 0 | t |
| DOC-conc. (mg/l) in steriele controle | C _{s(o)} | C _{s(t)} |

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE (facultatief)

| | resthoeveelheid reststof aan het einde van de test | % primaire afbraak |
|----------------------|--|------------------------------------|
| Steriele controle | S _b | |
| Geënt testmedium | S _a | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

DEEL IV. KOOLDIOXYDE CO₂-ONTWIKKELINGSTEST (Methode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-20 mg DOC of TOC/l) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt belucht door doorleiden van kooldioxyde-vrije lucht met een geregelde snelheid, in het donker of in gedempt licht. De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd door bepaling van het geproduceerde kooldioxyde dat in barium- of natriumhydroxyde wordt afgevangen en door titratie van het resterende hydroxyde of als anorganische koolstof wordt gemeten. De hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde uit de teststof (gecorrigeerd voor datgene dat afkomstig is van het blanco entmateriaal) wordt uitgedrukt als een percentage van ThCO₂. De mate van biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende DOC-analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

IV.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

IV.2.1. Apparatuur

- a) Kolven, inhoud 2-5 liter, elk voorzien van een beluchtingsbuis die tot onder in de kolf reikt en een uitgang;
- b) Magneetroeders, indien slecht oplosbare stoffen worden bepaald;
- c) Gas-absorptieflessen;
- d) Inrichting voor het regelen en meten van de luchtstroom;
- e) Apparatuur voor het uitwassen van kooldioxyde, voor het bereiden van lucht die vrij is van kooldioxyde; in plaats daarvan kan een mengsel van CO₂-vrije zuurstof en CO₂-vrije stikstof uit gascilinders in de juiste verhouding (20 % O₂; 80 % N₂) worden gebruikt;
- f) Inrichting voor het bepalen van kooldioxyde, hetzij titrimetrisch hetzij met behulp van een of ander analyse-apparaat voor anorganische koolstof;
- g) Inrichting voor membraanfiltratie (facultatief);
- h) DOC-analyse-apparaat (facultatief).

IV.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen, I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

IV.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. en I.6.5.

IV.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld geven de onderstaande volumes en gewichten de waarden aan voor 5-literkolven die 3 l suspensie bevatten. Indien kleinere volumes worden gebruikt, worden de waarden dienovereenkomstig aangepast, maar er dient op te worden toegezien dat het gevormde kooldioxyde nauwkeurig kan worden gemeten.

In elke 5-literkolf wordt 2 400 ml anorganisch medium gebracht. Daaraan wordt een zodanig volume van het bereide actieve slib (zie I.6.4.1. en I.6.5.) toegevoegd dat een concentratie aan gesuspendeerde deeltjes van niet meer dan 30 mg/l in het uiteindelijke 3 l geënt mengsel wordt verkregen. In plaats daarvan kan eerst het bereide slib worden verdund tot een suspensie van 500-1 000 mg/l in het anorganische medium voordat een berekende

hoeveelheid daarvan aan de 2 400 ml anorganisch medium in de 5-literkolf wordt toegevoegd om een concentratie van 30 mg/l in het uiteindelijke 3 l proefvolume te verkrijgen. Dit gaat gepaard met een grotere nauwkeurigheid. Ook andere bronnen van entmateriaal kunnen worden gebruikt (zie I.6.4.2.).

De geënte mengsels worden gedurende een nacht belucht met CO₂-vrije lucht zodat kooldioxyde uit het systeem wordt verwijderd.

In telkens een aantal gelijke kolven worden afzonderlijk testmateriaal en referentiestof als gekende volumes voorraadoplossingen toegevoegd tot concentraties als gevolg van de toegevoegde stoffen van 10 tot 20 mg DOC of TOC/l; enkele kolven blijven zonder toevoeging van chemicaliën en dienen als controle op het entmateriaal. Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks in de kolven gebracht op basis van gewicht of volume of worden behandeld als beschreven in Bijlage III.

Zonodig wordt één kolf gebruikt voor de controle op het eventuele remmende effect van de teststof waarbij zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de andere kolven worden toegevoegd.

Tevens wordt indien nodig een steriele kolf gebruikt voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof, waarbij een niet-geënte oplossing van de stof wordt gebruikt (zie I.6.6.). Steriliseren door toevoeging van een giftige stof met de geschikte concentratie.

Het volume van de suspensies wordt in alle kolven aangevuld tot 3 l door toevoeging van anorganisch medium dat vooraf met CO₂-vrije lucht is belucht. Eventueel kunnen monsters worden getrokken voor analyse van DOC (zie Bijlage II.4) en/of specifieke analyse. De absorptieflessen worden aangesloten op de luchtuitgangen van de kolven.

Indien bariumhydroxyde wordt gebruikt, worden drie absorptiekolven, die elk 100 ml 0,0125 M bariumhydroxyde-oplossing bevatten, in serie op elke 5-literkolf aangesloten. De oplossing moet vrij van neergeslagen sulfaat en carbonaat zijn en de concentratie moet vlak voor gebruik worden bepaald. Indien natriumhydroxyde wordt gebruikt, worden twee vallen aangesloten, waarbij de tweede dient als controle om aan te tonen dat alle kooldioxyde in de eerste is geabsorbeerd. Bruikbaar zijn absorptiekolven die zijn voorzien van sluitingen voor serumflessen. In elke kolf wordt 200 ml 0,05 M natriumhydroxyde gebracht, welke hoeveelheid voldoende is voor het absorberen van de totale hoeveelheid kooldioxyde die bij volledige afbraak van de teststof wordt ontwikkeld. De natriumhydroxyde-oplossing zal echter, zelfs indien deze vers is bereid, sporen carbonaten bevatten; dit wordt gecorrigeerd door aftrek van het carbonaat in de blanco.

IV.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

IV.2.6. Uitvoering van de test

De test wordt gestart doordat CO₂-vrije lucht met een snelheid van 30-100 ml/min. door de suspensies wordt geborreld. Van tijd tot tijd worden monsters van het kooldioxyde absorberende materiaal genomen voor analyse van het CO₂-gehalte. Tijdens de eerste tien dagen verdient het aanbeveling elke tweede of derde dag analyses uit te voeren en vervolgens elke vijfde dag tot de 28ste dag zodat het 10-dagen venster kan worden vastgesteld.

Op de 28ste dag worden (indien van toepassing) monsters getrokken voor DOC-analyse en/of specifieke analyse, wordt de pH van de suspensies gemeten en wordt aan elke kolf 1 ml geconcentreerd zoutzuur toegevoegd; de kolven worden gedurende een nacht belucht teneinde het in de testsuspensies aanwezige kooldioxyde te verdrijven. Op dag 29 wordt de laatste analyse van vrijgekomen kooldioxyde gemaakt.

Op de dagen van CO₂-meting wordt de absorptiefles voor bariumhydroxyde die het dichtst bij de kolf staat, losgekoppeld en wordt de hydroxyde-oplossing getitreerd met 0,05 M HCl met fenolftaleïne als indicator. De overige absorptieflessen worden een plaats dicht bij de kolf gebracht en er wordt een nieuwe absorptiefles met daarin 100 ml vers 0,0125 M bariumhydroxyde aan het eind van de reeks geplaatst. De titraties worden uitgevoerd wanneer dat nodig is, bij voorbeeld wanneer in de eerste val een aanzienlijke hoeveelheid neerslag wordt waargenomen en voordat er in de tweede val een duidelijke neerslag is, of ten minste wekelijks. In het andere geval wordt, wanneer NaOH absorptiemiddel is, met een spuit een klein monster (afhankelijk van de kenmerken van de gebruikte koolstof-analysator) van de natriumhydroxyde-oplossing in de absorptiefles die het dichtst bij de kolf staat, getrokken. Het monster wordt in het IC-gedeelte van het koolstofanalyse-apparaat gespoten en rechtstreeks geanalyseerd op ontwikkelde kooldioxyde.

De inhoud van de tweede val wordt alleen aan het eind van de test geanalyseerd ter correctie van eventuele overdracht van kooldioxyde.

IV.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

IV.3.1. Verwerking van de resultaten

De hoeveelheid in een absorptiefles afgevangen CO₂ die wordt getitreerd komt overeen met:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

waarin:

V = volume HCl dat is gebruikt voor het titreren van de 100 ml in de absorptiefles (ml),

C_B = concentratie bariumhydroxyde-oplossing (M),

C_A = concentratie zoutzuuroplossing (M),

en, indien C_B 0,0125 M en C_A 0,05 M is, is de getitreerde hoeveelheid voor 100 ml bariumhydroxyde 50 ml en wordt het gewicht aan CO₂ gegeven door:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml getitreerd HCl} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

In dit geval bedraagt dus de factor voor het herleiden van het getitreerde volume HCl tot geproduceerde mg CO₂ 1,1.

Het CO₂-gewicht dat afkomstig is uit alleen het entmateriaal en dat wat afkomstig is van het entmateriaal plus de teststof worden berekend met de desbetreffende titratiewaarden en het verschil is het gewicht aan CO₂ dat alleen door de teststof is geproduceerd.

Indien bij voorbeeld het entmateriaal alleen een titratie van 48 ml en het entmateriaal plus teststof 45 ml geeft, dan geldt:

$$\text{CO}_2 \text{ uit entmateriaal} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ uit entmateriaal plus teststof} = 1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$$

en derhalve bedraagt het gewicht aan CO₂ dat door teststof is produceerd 3,3 mg.

Het percentage biologische afbraak wordt berekend uit:

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg toegevoegde teststof}}$$

of,

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{\text{mg TOC toegevoegd in test} \times 3,67}$$

waarbij 3,67 de omrekeningsfactor (44/12) van koolstof naar kooldioxyde is.

Het percentage afbraak na elk tijdsinterval wordt verkregen door optellen van het percentage van ThCO₂-waarden dat voor elk van de dagen, tot het tijdstip waarop het is gemeten, is berekend.

Voor natriumhydroxyde-absorptieflessen wordt de hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde berekend en uitgedrukt als IC (mg) door vermenigvuldiging van de concentratie IC in het absorptiemiddel met het volume van het absorptiemiddel.

Het percentage afbraak wordt berekend uit:

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC uit testkolf} - \text{mg IC uit blanco}}{\text{mg TOC toegevoegd als teststof}} \times 100$$

De verwijdering van DOC (indien van toepassing) wordt berekend zoals beschreven onder 1.7. Deze en alle andere resultaten worden op het beschikbare gegevensformulier vermeld.

IV.3.2. Geldigheid van de resultaten

Het IC-gehalte van de suspensie van teststof in het anorganische medium aan het begin van de test moet minder dan 5 % bedragen van de TC en de totale CO₂-ontwikkeling in de entmateriaal-blanco aan het eind van de test mag doorgaans niet meer dan 40 mg/l medium bedragen. Indien waarden van meer dan 70 mg CO₂/l worden verkregen, dienen de gegevens en de proefopzet kritisch te worden onderzocht.

Zie ook 1.5.2.

IV.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

IV.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

KOOLDIOXYDE (CO₂) -ONTWIKKELINGSTEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu: mg/l als teststof

Totale C aan kolf toegevoegd: mg C

ThCO₂: mg CO₂

4. ENTMATERIAAL

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Pre-conditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. KOOLDIOXYDEPRODUKTIE EN AFBREEKBAARHEID:

Methode: Ba(OH)₂/NaOH/andere

| Tijd (dag) | Gevormde CO ₂ test (mg) | | Gevormde CO ₂ blanco (mg) | | Gevormde CO ₂ cumulatief (mg) (test minus blanco gem.) | | % ThCO ₂ $\frac{\text{cumulatief CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$ | | |
|----------------|------------------------------------|---|--------------------------------------|---|---|------|---|---|------|
| | 1 | 2 | gem | 3 | 4 | gem. | 1 | 2 | gem. |
| 0 | | | | | | | | | |
| n ₁ | | | | | | | | | |
| n ₂ | | | | | | | | | |
| n ₃ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | |

Opmerking: soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en voor toxiciteitscontroles.

6. KOOLSTOFANALYSE (facultatief)

Koolstofanalyse-apparaat: ...

| Tijd (dag) | Blanco mg/l | Teststof mg/l |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|
| 0 | C _{b(o)} | C _o |
| 28 (*) | C _{b(t)} | C _t |
| (*) of aan het eind van de incubatie | | |

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK (facultatief)

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{\text{CO}_2\text{-vorming in steriele kolf na 28 dagen (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEEL V. MANOMETRISCHE RESPIROMETRIE TEST (Methode C.4-D)

V.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (100 mg/l teststof die ten minste 50-100 mg ThOD/l geeft) als enige nominale bron van organische koolstof bevat, wordt gedurende ten hoogste 28 dagen in een gesloten kolf bij een constante temperatuur (± 1 °C of minder) geroerd. Het gebruik aan zuurstof wordt bepaald hetzij door meten van hoeveelheid zuurstof (elektrolytisch geproduceerd) die nodig is om in de respirometerkolf een constant gasvolume te behouden, hetzij op grond van de verandering van het volume of van de druk (of een combinatie daarvan) in de apparatuur. Ontwikkelde kooldioxyde wordt geabsorbeerd in een oplossing van kaliumhydroxyde of een ander geschikt absorptiemiddel. De hoeveelheid door de teststof opgenomen zuurstof (gecorrigeerd voor opneming door de parallel behandelde blanco-entstof) wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD. Facultatief kunnen de primaire biologische afbraak worden berekend uit de aanvullende specifieke analyse die aan het begin en aan het einde van de incubatie wordt uitgevoerd, en de totale afbraak door DOC-analyse.

V.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

V.2.1. Apparatuur

- (a) geschikte respirometer;
- (b) temperatuurregeling, constant op ± 1 °C of beter;
- (c) membraan-filtratie-inrichting (facultatief);
- (d) koolstof analyse-apparaat (facultatief).

V.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

V.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. en I.6.5.

V.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Oplossingen van de teststof en referentiestof worden afzonderlijk in anorganisch medium, uitgaande van voorraadoplossingen, bereid in een hoeveelheid die doorgaans overeenkomt met een concentratie van 100 mg chemische stof/l (overeenkomend met ten minste 50-100 mg ThOD/l).

Het ThOD wordt berekend op basis van de vorming van ammoniumzouten, tenzij nitrificatie moet worden verwacht, in welk geval de berekening moeten worden gebaseerd op nitraatvorming (zie Bijlage II.2.).

De pH-waarden worden bepaald en zonodig bijgesteld op $7,4 \pm 0,2$.

Slecht oplosbare stoffen dienen pas in een later stadium te worden toegevoegd (zie hieronder).

Indien de giftigheid van de teststof moet worden bepaald, wordt nog een oplossing in anorganisch medium bereid welke zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de afzonderlijke oplossingen bevat.

Indien meting van de fysisch-chemische zuurstofopname nodig is, wordt een oplossing van de teststof die door toevoeging van een geschikte giftige stof gesteriliseerd is (zie I.6.6.) in een hoeveelheid van gewoonlijk 100 mg ThOD/l bereid.

Het benodigde volume van oplossingen van de teststof en de referentiestof wordt ten minste in duplo in kolven gebracht. In volgende kolven wordt alleen anorganisch medium gebracht (voor entstof controles) en, zonodig, de gemengde oplossing van teststof en referentiestof en de steriele oplossing.

Indien de teststof slecht oplosbaar is wordt deze in dit stadium rechtstreeks toegevoegd op basis van gewicht of volume of wordt deze behandeld als beschreven in Bijlage III. Aan de compartimenten van het CO₂-absorptie-apparaat worden kaliumhydroxyde, natronkalkpillen of een ander absorptiemiddel toegevoegd.

V.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: steriele controle

Kolf 7: toxiciteitscontrole

Zie I.6.7.

V.2.6. Uitvoering van de test

De kolven worden op de gewenste temperatuur gebracht en de daartoe bestemde kolven worden geënt met bereid actief slib of een andere bron van entmateriaal tot een concentratie aan gesuspendeerde vaste stof van niet meer dan 30 mg/l. De apparatuur wordt in gereedheid gebracht, de roerder wordt aangezet, het geheel wordt gecontroleerd op luchtdichtheid en de meting van de zuurstofopname wordt gestart. Gewoonlijk is dan geen verdere aandacht nodig behalve voor de nodige aflezingen en voor de dagelijkse controle op de juiste temperatuur en het juiste roeren.

De zuurstofopname wordt met behulp van de door de fabrikant van de apparatuur verstrekte methoden berekend uit de met regelmatige tussenpozen verrichte aflezingen. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk na 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten, in het bijzonder indien de opgenomen hoeveelheid zuurstof lager is dan wel hoger is dan ThOD_{NH4} (voor stikstof bevattende verbindingen).

Indien nodig worden aan het begin en aan het eind monsters uit de respirometerkolven genomen voor analyse van DOC of specifieke chemische stof (zie Bijlage II.4). Bij monsterneming aan het begin dient er voor te worden gezorgd dat het volume van de in de kolf achterblijvende testsuspensie bekend is. Wanneer door een N-bevattende teststof zuurstof wordt opgenomen, wordt de toename van de concentratie nitriet en nitraat in 28 dagen bepaald en wordt de correctie voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof berekend (Bijlage V).

V.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

V.3.1. Verwerking van de resultaten

De opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg) van de teststof na een bepaalde tijd (die is gecorrigeerd voor de blanco entstofcontrole na dezelfde tijd) wordt gedeeld door het gewicht van de onderzochte teststof. Dit geeft het BOD die is uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2\text{-opname door teststof} - \text{mg O}_2\text{-opname door blanco}}{\text{mg teststof in kolf}}$$
$$= \text{mg O}_2 \text{ per mg teststof.}$$

Het percentage biologische afbraak wordt berekend hetzij uit:

$$\% \text{ biologische afbraak} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg stof)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg stof)}} \times 100,$$

hetzij uit

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg stof)}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg stof)}} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet noodzakelijk dezelfde waarde geven; bij voorkeur wordt de eerstgenoemde methode gebruikt.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH_4 of NO_3) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door de nitrificatie verbruikte zuurstof (Bijlage V).

Wanneer facultatieve bepalingen van organische koolstof en/of specifieke chemische stof worden uitgevoerd, wordt het percentage afbraak berekend zoals beschreven is onder I.7.

Alle resultaten worden op de bijgevoegde gegevensformulieren vermeld.

V.3.2. Geldigheid van de resultaten

De hoeveelheid opgenomen zuurstof van de entmateriaalblanco bedraagt normaal 20-30 mg O_2 /l en mag in 28 dagen niet groter zijn dan 60 mg/l. Waarden hoger dan 60 mg/l nopen tot een kritisch onderzoek van de gegevens en de experimentele technieken. Indien de pH-waarde buiten het gebied 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de teststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test te worden herhaald met een lagere concentratie teststof.

Zie ook I.5.2.

V.3.3. Rapportage

Zie I.8.

V.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

MANOMETRISCHE RESPIROMETRIE TEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l

Beginconcentratie in het milieu, C_0 : mg/l

Volume in de testkolf (V): ml

ThOD stof/COD stof: mg O_2 /mg (NH_4 , NO_3)

4. ENTMATERIAAL

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Pre-conditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. ZUURSTOFOPNAME: BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

| | | Zeit (Tage) | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-------------|--|---|--|----|--|----|--|----|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | 21 | | 28 |
| O ₂ opname (mg) teststof | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | a, gem. | | | | | | | | | |
| O ₂ opname (mg) blanco | 3 | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | |
| | b, gem. | | | | | | | | | |
| Gecorrigeerde BOD (mg) | (a ₁ - b _m) | | | | | | | | | |
| | (a ₂ - b _m) | | | | | | | | | |
| BOD per mg teststof | $\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$ | | | | | | | | | |
| | $\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$ | | | | | | | | | |
| % afbraak | D ₁ (a ₁) | | | | | | | | | |
| | D ₂ (a ₂) | | | | | | | | | |
| | gem. * | | | | | | | | | |
| $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | | | | | | | | | | |

V = volume medium in testkolf

* Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

6. CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE (zie Bijlage V)

| Dag | 0 | 28 | Vershil |
|---|---|----|---------|
| (i) Concentratie nitraat (mg N/l) | | | (N) |
| (ii) Zuurstofequivalent (4,57 × N × V) (mg) | — | — | |
| (iii) Concentratie nitriet (mg N/l) | | | (N) |
| (iv) Zuurstofequivalent (3,43 × N × V) (mg) | — | — | |
| (ii + iv) Totaal zuurstofequivalent | — | — | |

7. KOOLSTOF ANALYSE (facultatief)

Koolstof analyse-apparaat: ...

| Tijd (dag) | Blanco mg/l | Teststof mg/l |
|------------|---------------------|-------------------|
| 0 | (C _{bio}) | (C _o) |
| 28* | (C _{blt}) | (C _t) |

* of aan het eind van de incubatie

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_r - C_{blr}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE (facultatief)

S_b = concentratie in fysisch-chemische (steriele) controle na 28 dagen.

S_a = concentratie in de geënte kolf na 28 dagen.

$$\% \text{ biologische afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK (facultatief)

a = zuurstofverbruik in steriele kolven na 28 dagen, (mg).

$$\text{Zuurstofverbruik per mg teststof} = \frac{a}{C_o V}$$

(zie afdelingen 1 en 3)

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

DEEL VI. GESLOTEN-FLESTEST (Methode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De oplossing van de teststof in anorganisch medium, doorgaans met een concentratie van 2-5 mg/l, wordt geënt met een betrekkelijk gering aantal micro-organismen uit een gemengde populatie en wordt bij constante temperatuur in het donker in volledig gevulde, afgesloten flessen gehouden. De afbraak wordt gevolgd door analyse van opgeloste zuurstof gedurende 28 dagen. De door de teststof opgenomen hoeveelheid zuurstof, die wordt gecorrigeerd voor de opname door de parallel onderzochte blanco voor het entmateriaal, wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD.

VI.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VI.2.1. Apparatuur

- BOD-flessen met glazen stoppen, b.v. 250-350 ml;
- Waterbad of broedapparaat, voor het op constante temperatuur (± 1 °C of beter) houden van de flessen, met uitsluiting van licht;
- Grote glazen flessen (2-5 l) voor de bereiding van medium en voor het aanvullen van de BOD-flessen;
- Zuurstofelektrode en meter, of apparatuur en reagentia voor Winkler-titratie.

VI.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

1 (een) ml van oplossingen (a) t/m (d) wordt gemengd en het mengsel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

VI.2.3. Bereiding van het entmateriaal

Het entmateriaal is normaal afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Een alternatieve bron van entmateriaal is oppervlaktewater. Gewoonlijk wordt één druppel (0,05 ml) tot 5 ml filtraat per liter medium gebruikt; voorafgaandelijke proeven kunnen nodig zijn om het optimaal volume voor een gegeven effluent te bepalen (zie I.6.4.2. en I.6.5.).

VI.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Anorganisch medium wordt gedurende ten minste 20 min. krachtig belucht. Elke testreeks wordt met uit dezelfde voorraad afkomstig mineraal medium uitgevoerd. In het algemeen is het medium na 20 uur staan bij de testtemperatuur voor gebruik gereed. Ter controle wordt de concentratie opgeloste zuurstof bepaald; de waarde dient bij 20 °C ongeveer 9 mg/l te zijn. Alle overbreng- en aanvulhandelingen van het met lucht verzadigde medium dienen zonder bellen, bijvoorbeeld door gebruik van hevels, te worden uitgevoerd.

Voor de bepaling van de teststof en referentiestof in gelijktijdige proefseries worden parallelle groepen van BOD-flessen bereid. Een voldoende aantal BOD-flessen, waaronder entmateriaalblanco's worden gereed gemaakt zodat op de gewenste tijdstippen, bijvoorbeeld na 0, 7, 14, 21 en 28 dagen, ten minste duplo-metingen van het zuurstofgebruik kunnen worden gedaan. Om het 10-dagen venster met zekerheid te kunnen vaststellen kunnen meer flessen nodig zijn.

In grote flessen wordt volledig belucht anorganisch medium gebracht, zodanig dat de flessen voor ongeveer een-derde gevuld zijn. Vervolgens wordt in afzonderlijke grote flessen zoveel van de voorraadoplossingen van de teststof en referentiestof gebracht dat de uiteindelijke concentratie van de stoffen niet meer dan ongeveer 10 mg/l is. Aan het blanco-controlemedium dat in een andere grote fles aanwezig is, wordt geen chemische stof toegevoegd.

Teneinde zekerheid te geven dat de activiteit van het entmateriaal niet beperkend is, mag de concentratie opgeloste zuurstof in de BOD-flessen niet lager dan 0,5 mg/l zijn. Dit beperkt de concentratie van de teststof tot ongeveer 2 mg/l. Van slecht afbreekbare teststoffen en van teststoffen met een lage ThOD kan echter 5-10 mg/l worden gebruikt. In sommige gevallen kan het raadzaam zijn twee parallelle reeksen van de teststof bij twee verschillende concentraties, bijvoorbeeld 2 en 5 mg/l uit te voeren. Als regel wordt de ThOD op grond van de vorming van ammoniumzouten berekend, maar indien verwacht wordt of bekend is dat nitrificatie optreedt, wordt de berekening uitgevoerd op basis van de vorming van nitraat ($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$; zie Bijlage II.2). Indien nitrificatie evenwel niet volledig is of niet optreedt, wordt gecorrigeerd voor de veranderingen in concentratie nitriet en nitraat, zoals door analyse is vastgesteld (zie Bijlage V).

Indien de toxiciteit van de teststof moet worden onderzocht (bijvoorbeeld in het geval dat eerder een lage waarde voor de biologische afbreekbaarheid is gevonden) is een volgende reeks flessen nodig.

Een volgende grote fles wordt gevuld met belucht anorganisch medium (tot ongeveer een-derde van het volume) plus teststof en referentiestof met uiteindelijke concentraties die als regel dezelfde zijn als die in de andere grote flessen.

De oplossingen in de grote flessen worden met secundair effluent (een druppel of ongeveer 0,05 ml, tot 5 ml/l) of met een andere bron, zoals rivierwater geënt (zie I.6.4.2.). Tenslotte worden de oplossingen met belucht anorganisch medium tot het eindvolume aangevuld met behulp van een hevel die met het oog op een voldoende menging tot op de bodem van de fles reikt.

VI.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

In een doorsneebepaling worden de volgende flessen gebruikt:

ten minste 10 die teststof en entmateriaal bevatten (testsuspensie),

ten minste 10 met alleen entmateriaal (entmateriaalblanco),

ten minste 10 met referentiestof en entmateriaal (procedurecontrole),

en, zonodig 6 flessen met teststof, referentiestof en entmateriaal (toxiciteitscontrole). Om zekerheid te geven dat het 10-dagen venster kan worden vastgesteld zal ongeveer het dubbele aantal flessen nodig zijn.

VI.2.6. Uitvoering van de test

Elke bereide oplossing wordt met behulp van een hevel uit het onderste kwart (niet de bodem) van de desbetreffende grote fles onmiddellijk in de bijbehorende groep BOD-flessen overgebracht, zodat alle BOD-flessen volledig gevuld zijn. Er wordt zachtjes op de kolven geklopt om eventuele luchtbelletjes te verwijderen. De flessen van het tijdstip nul worden onmiddellijk op opgeloste zuurstof onderzocht met behulp van de Winkler-methode of met elektrode methoden. De inhoud van de flessen kan met het oog op latere analyse via de Winkler-methode worden bewaard door toevoeging van mangaan(II)sulfaat en natriumhydroxyde (het eerste Winkler-reagens). De zorgvuldig afgesloten flessen die de zuurstof als bruin gehydrateerd mangaan(III)oxyde gefixeerd bevatten, worden gedurende niet langer dan 24 uur bij 10-20 °C in het donker bewaard, voordat de overige stappen van de Winkler-methode worden uitgevoerd. De overige herhalingsflessen worden afgesloten zodanig dat er geen luchtbelletjes worden opgesloten en worden in het donker bij 20 °C geïncubeerd. Elke reeks moet vergezeld gaan van een volledige parallelreeks voor de bepaling van het geënte blanco-medium. Voor analyse van opgeloste zuurstof op gezette tijden (ten minste wekelijks) gedurende de bebroeding van 28 dagen wordt van elke reeks ten minste één duplofles genomen.

Wekelijkse monsterneming is voldoende voor de bepaling van het percentage verwijdering in een 14-dagen venster, terwijl een bemonstering om de 3-4 dagen het vaststellen van een 10-dagen venster mogelijk maakt, waarbij ongeveer tweemaal zoveel flessen nodig zijn.

Voor stikstof bevattende teststoffen moeten correcties voor de door eventueel optredende nitrificatie veroorzaakte zuurstofopname worden uitgevoerd. Hiertoe wordt de methode met de O₂-elektrode toegepast voor de bepaling van de concentratie opgeloste zuurstof, waarna uit de BOD-fles een monster wordt genomen voor analyse van nitriet en nitraat. Uit de toename van de concentratie nitriet en nitraat wordt de gebruikte hoeveelheid zuurstof berekend (zie Bijlage V).

VI.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VI.3.1. Verwerking van de resultaten

Allereerst wordt het BOD dat na elk tijdstip is opgetreden berekend door aftrekken van de zuurstofafname (mg O₂/l) van de entmateriaal-blanco van de afname als gevolg van de teststof. Deze gecorrigeerde afname wordt gedeeld door de concentratie (mg/l) van de teststof waarbij het specifieke BOD als mg zuurstof per mg teststof wordt verkregen. Het percentage biologische afbreekbaarheid wordt berekend door het specifieke BOD door het specifieke ThOD (dat is berekend volgens Bijlage II.2) of COD (door analyse bepaald, zie Bijlage II.3) te delen, dus:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg O}_2 \text{ opname door blanco}}{\text{mg teststof in de kolf}}$$
$$= \text{mg O}_2 \text{ per mg teststof.}$$

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

ofwel

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}}{\text{COD (mg O}_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet dezelfde uitkomst behoeven te geven; het gebruik van de eerste methode heeft de voorkeur.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH₄ of NO₃) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof (zie Bijlage V).

VI.3.2. Geldigheid van de resultaten

De afname van de hoeveelheid zuurstof in de entmateriaal-blanco mag na 28 dagen niet meer dan 1,5 mg opgeloste zuurstof/l bedragen. Bij hogere waarden dan deze moeten de experimentele technieken worden

doorgelicht. De restconcentratie zuurstof in de testflessen mag nooit minder dan 0,5 mg/l worden. Dergelijke lage zuurstofconcentraties zijn slechts geldig, indien met de methode waarmee opgeloste zuurstof wordt bepaald dergelijke concentraties nauwkeurig kunnen worden gemeten.

Zie ook I.5.2.

VI.3.3. Rapportage

Zie I.8.

VI.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

GESLOTEN-FLESTEST

1. LABORATORIUM
2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST
3. TESTSTOF
 - Naam:
 - Concentratie voorraadoplossing: mg/l
 - Beginconcentratie in de fles: mg/l
 - ThOD/COD: mg O₂/mg teststof
4. ENTMATERIAAL
 - Herkomst:
 - Uitgevoerde behandeling:
 - Pre-conditionering, indien van toepassing:
 - Concentratie in reactiemengsel: ml/l
5. DO-BEPALING
 - Methode: Winkler/elektrode

Analyses kolven

| | Duur van incubatie (d) | | DO (mg/l) | | | |
|----------------------|-----------------------------|----------------|-----------|----------------|----------------|--|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | |
| Blanco (zonder stof) | 1 | C ₁ | | | | |
| | 2 | C ₂ | | | | |
| Gem. | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ | | | | | |
| Teststof | 1 | a ₁ | | | | |
| | 2 | a ₂ | | | | |
| Gem. | $m_r = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | | |

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

6. CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE (zie Bijlage V)

| Duur van incubatie (d) | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ |
|---|---|----------------|----------------|----------------|
| (i) Concentratie nitraat (mg N/l) | | | | |
| (ii) Verandering in nitraatconcentr. (mg N/l) | — | | | |
| (iii) Zuurstofequivalent (mg/l) | — | | | |
| (iv) Concentratie nitriet (mg N/l) | | | | |
| (v) Verandering in nitrietconcentr. (mg N/l) | — | | | |
| (vi) Zuurstofequivalent (mg/l) | — | | | |
| (iii + vi) Totaal zuurstofequivalent (mg/l) | — | | | |

7. DO-AFNAME: % AFBRAAK

| | Afname na n dagen (mg/l) | | | |
|--|--------------------------|----------------|----------------|--|
| | n ₁ | n ₂ | n ₃ | |
| FLES 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |
| FLES 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |
| FLES 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$ | | | | |
| FLES 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$ | | | | |
| $\% D \text{ gem. } * = \frac{D_1 + D_2}{2}$ | | | | |

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

m_{to} = waarde in de testkolf op tijdstip 0

m_{tx} = waarde in de testkolf op tijdstip x

m_{bo} = gem. blanco waarde op tijdstip 0

m_{bx} = gem. blanco waarde op tijdstip x

Ook de correctie voor nitrificatie uit iii + vi in afdeling 6 dient te worden toegepast.

8. BLANCO DO - AFNAME

Zuurstofverbruik door blanco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Dit verbruik is van belang voor de geldigheid van de test. Het dient minder dan 1,5 mg/l te zijn.

DEEL VII. M.I.T.I.-TEST (Methode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De zuurstofopname door een geroerde oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium dat met speciaal gekweekte, niet-aangepaste micro-organismen is geënt, wordt automatisch gedurende 28 dagen bij 25 ± 1 °C in een verduisterde, afgesloten respirometer automatisch gemeten. Het vrijkomende kooldioxyde wordt door natronkalk geabsorbeerd. De biologische afbreekbaarheid wordt uitgedrukt als het percentage zuurstofopname (gecorrigeerd voor opname door de blanco) van de theoretische opname (ThOD). Het percentage primaire biologische afbreekbaarheid wordt ook berekend uit een aanvullende specifieke chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd en verder, naar keuze, door middel van DOC-analyse.

VII.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VII.2.1. Apparatuur

- a) Automatische elektrolytische BOD-meter of respirometer, doorgaans uitgerust met 6 flessen, met elk 300 ml en voorzien van kommetjes die het absorptiemiddel voor CO₂ bevatten;
- b) Kamer met constante temperatuur en/of waterbad van 25 °C \pm 1 °C of beter;
- c) Membraanfiltratie-eenheid (facultatief);
- d) Koolstof-analysator (facultatief).

VII.2.2. Bereiding van anorganisch medium

De volgende voorraadoplossingen worden uitgaande van reagentia van analytische kwaliteit en water (I.6.1.) bereid:

- | | |
|--|---------|
| (a) Monokaliumdiwaterstorthofosfaat, KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| Dikaliummonowaterstorthofosfaat, K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| Dinatriummonowaterstorthofosfaat-dodecahydraat Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O | 44,60 g |
| Ammoniumchloride, NH ₄ Cl | 1,70 g |
| Deze stoffen worden in water opgelost en de oplossing wordt tot 1 liter aangevuld. | |
| De pH-waarde van de oplossing dient 7,2 te zijn. | |
| (b) Magnesiumsulfaat-heptahydraat, MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 22,50 g |
| wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld. | |
| (c) Calciumchloride, watervrij, CaCl ₂ | 27,50 g |
| wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld | |
| (d) IJzer(III)chloride-hexahydraat, FeCl ₃ ·6 H ₂ O | 0,25 g |
| wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld | |

Van elke oplossing (a), (b), (c) en (d) wordt 3 ml genomen en er wordt tot 1 liter aangevuld.

VII.2.3. Bereiding van entmateriaal

Verse monsters worden verzameld op niet minder dan 10 lokaties, voornamelijk in gebieden waar uiteenlopende chemicaliën worden gebruikt en geloosd. Van plaatsen zoals rioolwaterzuiveringsinstallaties, behandelingsinstallaties voor industrieel afvalwater, rivieren, plassen en zeeën worden monsters van 1 liter slib, oppervlaktebodem, water e.d. verzameld en grondig dooreen gemengd. Na verwijdering van drijvend materiaal en bezinking wordt de bovenstaande vloeistof met natriumhydroxyde of fosforzuur op pH 7 ± 1 gebracht.

Van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof wordt een voldoende volume genomen voor het vullen van een actief-slib-tank van het vul-en-loop-type en de vloeistof wordt ongeveer 23,5 uur belucht. Dertig minuten na beëindigen van de beluchting wordt ongeveer eenderde van het gehele volume van de bovenstaande vloeistof verwijderd en wordt een gelijk volume van een oplossing (pH 7) die telkens 0,1 % glucose, pepton en monokaliumorthofosfaat bevat aan het bezonken materiaal toegevoegd waarna de beluchting wordt hervat. Deze procedure wordt eenmaal per dag herhaald. De slibeenheid dient volgens een verantwoorde praktijk te worden gebruikt: effluenten moeten helder zijn, de temperatuur bedraagt 25 ± 2 °C, de pH 7 ± 1 , slib bezinkt goed, er is voldoende beluchting om het mengsel te allen tijde aëroob te houden, er zijn protozoën aanwezig en de activiteit van het slib wordt ten minste elke drie maanden ten opzichte van een referentiestof getest. Het slib wordt niet eerder als entmateriaal gebruikt dan na een werking van ten minste één maand, maar ook niet meer dan na vier maanden. Daarna wordt op gezette tijden, elke drie maanden, een monster van ten minste 10 lokaties genomen.

Teneinde vers en oud slib op dezelfde activiteit te houden wordt de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een in gebruik zijnde actief slib gemengd met een gelijk volume van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een vers uit tien bronnen verzameld mengsel en wordt de verenigde vloeistof als boven gekweekt. 18-24 uur nadat de eenheid is gevoed wordt slib als entmateriaal genomen.

VII.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

De volgende zes kolven worden bereid:

Nr. 1: teststof in verdunningswater, 100 mg/l

Nr. 2, 3 en 4: teststof in anorganisch medium, 100 mg/l

Nr. 5: referentiestof (b.v. aniline) in anorganische medium, 100 mg/l

Nr. 6: alleen anorganisch medium

Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks op basis van gewicht of volume toegevoegd of behandeld als beschreven in Bijlage III, met dien verstande dat er geen oplosmiddelen of emulgeermiddelen worden gebruikt. In alle kolven wordt in daarvoor bestemde kommetjes absorptiemiddel voor CO₂ gebracht. De pH in de kolven nrs. 2, 3 en 4 wordt op 7,0 ingesteld.

VII.2.5. Uitvoering van de test

De kolven nrs. 2, 3 en 4 (testsuspensies), nr. 5 (activiteitscontrole) en nr. 6 (entmateriaal-blanco) worden geënt met een klein volume entmateriaal tot een concentratie van 30 mg/l gesuspendeerde vaste stof. Aan de kolf 1, die dient als niet-biologische controle, wordt geen entmateriaal toegevoegd. De apparatuur wordt gemonteerd, de luchtdichtheid wordt gecontroleerd, de roeders worden aangezet en de meting van de zuurstofopname in het donker wordt begonnen. De temperatuur, de roerder en het coulometrische registratie-apparaat voor zuurstofopname worden dagelijks gecontroleerd en eventuele kleurverandering van de inhoud van de kolven wordt genoteerd. De opgenomen hoeveelheid zuurstof voor de zes kolven wordt rechtstreeks, met een geschikte methode afgelezen, b.v. van het zes-punts papierregistratie-apparaat, waaruit een BOD-kromme voortkomt. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten en worden de concentraties van de resterende teststof en van eventueel tussenprodukt en, in geval van wateroplosbare teststof, de concentratie DOC bepaald (Bijlage II.4). In geval van vluchtige stoffen wordt bijzondere zorgvuldigheid betracht. Indien nitrificatie wordt verwacht, worden zo mogelijk de nitraat- en nitrietconcentratie bepaald.

VII.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VII.3.1. Verwerking van de resultaten

De door de teststof na een gegeven tijdsduur opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg), die is gecorrigeerd voor de door de blanco-controle van het entmateriaal in dezelfde tijd opgenomen hoeveelheid, wordt gedeeld door het gewicht van de gebruikte teststof. Dit geeft het BOD, uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z.:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg O}_2 \text{ opname door blanco}}{\text{mg teststof in kolf}}$$

$$= \text{mg O}_2/\text{mg teststof.}$$

Het percentage biologische afbraak wordt dan verkregen uit:

$$\% \text{ biologische afbraak} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg stof)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg stof)}} \times 100$$

Voor mengsels wordt het ThOD berekend uit elementairanalyse, net als voor een eenvoudige verbinding. Al naar gelang nitrificatie afwezig danwel volledig is (Bijlage II.2) wordt het bijbehorende ThOD (ThOD_{NH4} of ThOD_{NO3}) gebruikt. Indien echter nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt een correctie aangebracht voor de door nitrificatie verbruikte hoeveelheid zuurstof die is berekend uit de veranderingen in concentraties nitriet en nitraat (Bijlage V).

Het percentage primaire biologische afbraak wordt berekend uit het verlies aan specifieke (moeder)stof (zie I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Indien er in kolf nr. 1, waar fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, een verlies aan teststof is geweest, wordt dit gerapporteerd en wordt de concentratie teststof (S_b) na 28 dagen in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Wanneer bepalingen van de DOC worden uitgevoerd (naar keuze), wordt het percentage uiteindelijke biologische afbraak berekend uit:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

zoals beschreven onder punt I.7.1. Als er verlies aan DOC in kolf nr. 1, waarin fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, is geweest, wordt de DOC-concentratie in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Alle resultaten worden op de bijgaande gegevensformulieren geregistreerd.

VII.3.2. Geldigheid van de resultaten

De zuurstofopname door de entmateriaal-blanco bedraagt normaal 20-30 mg O₂/l en mag over 28 dagen niet meer zijn dan 60 mg/l. Hogere waarden dan 60 mg/l betekenen dat de gegevens en experimentele technieken moeten worden getoetst. Indien de pH-waarde buiten het gebied van een 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de teststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test met een lagere concentratie teststof te worden herhaald.

Zie ook I.5.2.

Indien het percentage afbraak van aniline dat is berekend uit het zuurstofgebruik na 7 dagen niet meer dan 40 % en na 14 dagen niet meer dan 65 % bedraagt, wordt de test als ongeldig beschouwd.

VII.3.3. Rapportage

Zie I.8.

VII.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

MITI (I) TEST

1. LABORATORIUM
2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, C_0 : mg/l als teststof

Volume reactiemengsel, V: ml

ThOD: ... mg O_2 /l

4. ENTMATERIAAL

Verzamelingsplaatsen van slib:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Concentratie gesuspenderde vaste stof in actief slib na acclimatisering met synthetisch rioolwater = ...mg/l

Volume actief slib per liter eindmedium = ...ml

Concentratie slib in eindmedium = ... mg/l

5. ZUURSTOFOPNAME: BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

Gebruikt type respirometer:

| | | Tijd (dagen) | | | | |
|--|--|--------------|---|----|----|----|
| | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| O ₂ opname (mg) teststof | a ₁ | | | | | |
| | a ₂ | | | | | |
| | a ₃ | | | | | |
| O ₂ opname (mg) blanco | b | | | | | |
| Gecorrigeerde O ₂ opname (mg) | (a ₁ - b) (a ₂ - b) (a ₃ - b) | | | | | |
| BOD per mg teststof | $\frac{(a-b)}{C_0 V}$ | Kolf 1 | | | | |
| | | Kolf 2 | | | | |
| | | Kolf 3 | | | | |
| % afbraak $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | | 1 | | | | |
| | | 2 | | | | |
| | | 3 | | | | |
| | | Gem. (*) | | | | |

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

6. KOOLSTOFANALYSE (facultatief)

Koolstofanalyse-apparaat: . . .

| Kolf | DOC | | | %DOC verwijd. | Gemiddelde |
|------------------|---------|--|----------|---------------|------------|
| | Gemeten | | Gecorrig | | |
| Water + teststof | a | | | — | — |
| Slib + teststof | b1 | | b1 - c | | |
| Slib + teststof | b2 | | b2 - c | | |
| Slib + teststof | b3 | | b3 - c | | |
| Blancocontrole | c | | — | — | — |

$$\% \text{ DOC verwijderd: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. GEGEVENS UIT DE SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE

| | Resthoeveelheid teststof bij einde test | % afbraak |
|----------------------|---|-----------|
| blancotest met water | S _b | |
| geënt medium | S _{a1} | |
| | S _{a2} | |
| | S _{a3} | |

$$\% \text{ afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Berekend wordt het % afbraak, respectievelijk voor kolven a₁, a₂ en a₃.

8. OPMERKING

De kromme van het BOD tegen de tijd wordt, indien beschikbaar, bijgevoegd.

BIJLAGE I

AFKORTINGEN EN DEFINITIES

- DO: Opgeloste zuurstof (mg/l) is de concentratie zuurstof die is opgelost in een waterig medium.
- BOD: (BZV), biochemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die door micro-organismen wordt verbruikt bij het metaboliseren van een test- verbinding; wordt ook uitgedrukt als g zuurstofopname per g testverbinding (zie methode C.5).
- COD: (CZV), chemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die tijdens oxydatie van een testverbinding met warm, zuur dichromaat wordt verbruikt; het biedt een maat van de aanwezige hoeveelheid oxydeerbaar materiaal; wordt ook uitgedrukt als g zuurstof verbruikt per g testverbinding (zie methode C.6).
- DOC: Opgeloste organische koolstof is de organische koolstof die in de oplossing aanwezig is of die of door een filter van 0,45 micrometer gaat of na centrifugeren bij $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ($\pm 4\,000\text{ g}$) gedurende 15 min., in de vloeistof blijft.
- ThOD: Theoretisch zuurstofverbruik (mg) is de totale hoeveelheid zuurstof die nodig is om een chemische stof volledig te oxyderen; het wordt berekend op basis van de molecuulformule (zie Bijlage II.2) en wordt ook uitgedrukt als mg zuurstof die nodig is per mg testverbinding.
- ThCO₂: Theoretische hoeveelheid kooldioxyde (mg) is de hoeveelheid kooldioxyde die volgens berekening uit het bekende of gemeten koolstof gehalte van de testverbinding wordt geproduceerd, wanneer deze volledig wordt gemineraliseerd; wordt ook uitgedrukt als mg kooldioxyde ontwikkeld per mg testverbinding.
- TOC: Totale organische koolstof van een monster is de som van de hoeveelheid organische koolstof in oplossing en in suspensie.
- IC: Anorganische koolstoff.
- TC: Totale koolstof is de som van de in een monster aanwezige organische en anorganische koolstof.

Primaire biologische afbraak:

is de wijziging in de chemische structuur van een stof als gevolg van een biologisch proces, hetgeen leidt tot verlies van een bepaalde eigenschap van de stof.

Uiteindelijke biologische afbraak (aëroob):

is de mate van afbraak die wordt verkregen wanneer de testverbinding volledig door micro-organismen wordt omgezet tot kooldioxyde, water, anorganische zouten en nieuwe microbiële celbestanddelen (biomassa).

Gemakkelijk biologisch afbreekbaar:

een arbitraire indeling van chemische stoffen die bepaalde schiftingsproeven op uiteindelijke biologische afbreekbaarheid hebben doorstaan; deze proeven zijn zo streng dat geacht wordt dat dergelijke verbindingen in aquatisch milieu onder aërobe omstandigheden snel en volledig biologisch worden afgebroken.

Inherent biologisch afbreekbaar:

een indeling van chemische stoffen waarvoor welke erkende proef op biologische afbreekbaarheid dan ook een ondubbelzinnig bewijs van biologische afbraak (primair of uiteindelijk) levert.

Behandelbaarheid:

is de geschiktheid van verbindingen tot verwijdering gedurende biologische afvalwaterbehandeling zonder nadelige invloed op de normale werking van de behandlungsprocessen. In het algemeen zijn gemakkelijk biologische afbreekbare verbindingen behandelbaar, maar geldt dat niet voor alle inherent biologisch afbreekbare verbindingen. Niet-biologische processen kunnen ook optreden.

Aanlooptijd

is de duur vanaf de enting in een afvlakkingstest, totdat het percentage afbraak tot ten minste 10 % is gestegen. De aanlooptijd is vaak sterk variabel en slecht reproduceerbaar.

Afbraaktijd

is de tijd van het eind van de aanlooptijd tot het tijdstip dat 90 % van de maximale afbraak is bereikt.

10-dagen venster

is de periode van 10 dagen onmiddellijk na het bereiken van 10 % afbraak.

BIJLAGE II

BEREKENING EN BEPALING VAN GESCHIKTE TOTAAL PARAMETERS

Afhankelijk van de gekozen methode zijn bepaalde totaalparameters nodig. In dit gedeelte wordt de herleiding van deze waarden beschreven. Het gebruik van deze parameters wordt bij de afzonderlijke methoden beschreven.

1. Koolstof gehalte

Het koolstof gehalte wordt berekend uit de bekende elementaire samenstelling of bepaald aan de hand van elementaire analyse van de teststof.

2. Theoretisch zuurstofverbruik (ThOD)

Het theoretische zuurstofverbruik (ThOD) kan worden berekend indien de elementaire samenstelling bekend is of door elementaire analyse is bepaald. Voor de verbinding met samenstelling:



is dit zonder nitrificatie,

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16 (2 c + 1/2 (h - cl - 3 n) + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o)}{MW} \text{ mg/mg}$$

of met nitrificatie,

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 (2 c + 1/2 (h - cl) + 5/2 n + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o)}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Chemisch zuurstofverbruik (COD)

Het chemisch zuurstofverbruik (COD) wordt bepaald volgens methode C.6.

4. Opgeloste organische koolstof (DOC)

Opgeloste organische koolstof (DOC) is per definitie de organische koolstof van een chemische stof of een mengsel in water dat door een filter van 0,45 micrometer gaat.

Uit de testvaten worden monsters getrokken en deze worden onmiddellijk met een geschikt membraanfilter in het filtreerapparaat gefiltreerd. De eerste 20 ml (bij gebruik van kleine filters kan deze hoeveelheid worden verminderd) van het filtraat wordt verwijderd. Hoeveelheden van 10-20 ml, of minder in geval van injectie (volume afhankelijk van de voor de koolstof analysator benodigde hoeveelheid), worden apart gehouden voor koolstof analyse. De DOC-concentratie wordt bepaald met behulp van een analyse-apparaat voor organische koolstof, waarmee een koolstofconcentratie die overeenkomt met of kleiner is dan 10 % van de oorspronkelijke, in de test gebruikte DOC-concentratie nauwkeurig kan worden gemeten.

Gefiltreerde monsters die niet op dezelfde werkdag kunnen worden geanalyseerd kunnen worden bewaard, gedurende 48 uur in een koelkast bij 2-4 °C, of gedurende langere tijden beneden - 18°C.

Opmerkingen:

Membranafilters zijn met het oog op hydrofilisering vaak geïmpregneerd met oppervlakte-actieve stoffen. Een dergelijk filter kan derhalve enkele mg oplosbare organische koolstof bevatten die kunnen storen bij de bepalingen van de biologische afbreekbaarheid. Oppervlakte-actieve stoffen en andere oplosbare organische verbindingen worden uit de filters verwijderd doordat deze driemaal telkens een uur in gedeïoniseerd water worden uitgekookt. De filters kunnen dan gedurende een week in water worden bewaard. Indien er eenmalige filterpatronen worden gebruikt, moet elke partij worden gecontroleerd op het niet-afgeven van oplosbare organische koolstof.

Afhankelijk van het type membraanfilter kan de teststof door adsorptie worden vastgehouden. Het kan daarom raadzaam zijn na te gaan dat de teststof niet door het filter wordt vastgehouden.

*Centrifuger*en bij 40 000 m.sec⁻² (4 000 g) gedurende 15 min. kan worden toegepast in plaats van filtratie, voor het onderscheid tussen TOC en DOC. Bij een beginconcentratie van < 10 mg DOC/l is in deze methode niet betrouwbaar, omdat dan niet alle bacteriën worden verwijderd of koolstof als deel van het bacteriële plasma opnieuw in oplossing gaat.

LITERATUUR

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol 13 (1), 169.

BIJLAGE III

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN SLECHT OPLOSBARE STOFFEN

Bij tests op de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare stoffen dient aan de volgende aspecten bijzondere aandacht te worden geschonken.

Terwijl homogene vloeistoffen zelden bemonsteringsproblemen opleveren, verdient het aanbeveling dat vaste stoffen op geschikte wijze worden gehomogeniseerd opdat fouten als gevolg van het niet-homogeen zijn worden voorkomen. Bijzondere nauwkeurigheid moet worden betracht wanneer representatieve monsters van een aantal milligrammen uit mengsels van chemicaliën of stoffen met grote hoeveelheden verontreinigingen nodig zijn.

Tijdens de tests kunnen uiteenlopende vormen van dooreenmenging worden toegepast. Er moet op worden gelet dat er slechts voldoende wordt geroerd om de stof gedispergeerd te houden, en dat er geen oververhitting, overmatige schuimvorming of overmatige afschuifkrachten optreden.

Er kan een emulgator worden gebruikt die een stabiele dispersie van de stof geeft. Deze dient niet giftig te zijn voor bacteriën en mag niet biologisch worden afgebroken of onder de testomstandigheden schuimvorming veroorzaken.

Dezelfde criteria zijn zowel op oplosmiddelen als op de emulgatoren van toepassing.

Het gebruik van vaste dragers wordt voor vaste teststoffen niet aanbevolen, maar zij kunnen wel geschikt zijn voor olieachtige stoffen.

Wanneer hulpstoffen zoals emulgatoren, oplosmiddelen en dragers worden gebruikt, dient een blanco-proef waarin de hulpstof aanwezig is te worden uitgevoerd.

De drie respirometrische tests CO₂, BOD en MITI kunnen alle worden gebruikt voor het bestuderen van de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare verbindingen.

LITERATUUR

- de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol 16, 833.
- Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol 13, 169.

BIJLAGE IV

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN STOFFEN DIE VAN GIFTIGHEID VOOR HET ENTMATERIAAL WORDEN VERDACHT

Wanneer een chemische stof wordt onderworpen aan onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid en niet biologisch afbreekbaar blijkt te zijn, wordt de volgende procedure aanbevolen indien onderscheid tussen remming en inertheid wordt gewenst (Reynolds et al., 1987).

Voor de toxiciteitsproef en de biologische afbraakproef moet hetzelfde of een soortgelijk entmateriaal worden gebruikt.

Voor het bepalen van de toxiciteit van chemicaliën die in tests op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden onderzocht komt de toepassing van de remming van de slibademhalingssnelheid (test op de remming van de ademhaling van actief slib — Richtlijn 88/302/EEG), BOD en/of groeiremming of een combinatie daarvan in aanmerking.

Indien remming als gevolg van giftigheid moet worden voorkomen, kan het aanbeveling verdienen dat de concentraties teststof die in het onderzoek op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden gebruikt minder dan 1/10 van de EC₅₀-waarden (of minder dan de EC₂₀-waarden) die zijn verkregen bij de toxiciteitstest bedragen. Verbindingen met een EC₅₀-waarde van meer dan 300 mg/l hebben waarschijnlijk geen toxische effecten bij het onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

EC₅₀-waarden van minder dan 20 mg/l geven waarschijnlijk wel ernstige problemen bij het navolgende onderzoek. Er dienen dan lage testconcentraties te worden toegepast en gebruik dient dan te worden gemaakt van de strenge en gevoelige gesloten-flesproef of van met ¹⁴C gemerkt materiaal. Anderzijds kunnen met een geacclimatiseerd entmateriaal hogere concentraties teststof worden gebruikt. In het laatste geval gaat echter het specifieke criterium van de test op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid verloren.

LITERATUUR

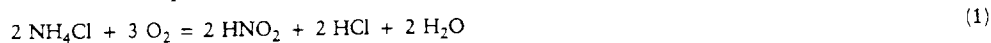
- Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol 16, 2259.

BIJLAGE V

CORRECTIE VAN ZUURSTOFOPNAME VOOR HET OPTREDEN VAN NITRIFICATIE

Fouten die het gevolg zijn van het niet in aanmerking nemen van nitrificatie bij de bepaling door middel van de zuurstofopname van de biologische afbreekbaarheid van teststoffen die geen stikstof bevatten zijn zeer gering (niet meer dan 5%), zelfs indien oxydatie van de ammonium-N in het medium ongeregeld voorkomt tussen test- en blanco-vaten. Bij teststoffen die stikstof bevatten kunnen echter aanzienlijke fouten ontstaan.

Indien nitrificatie is opgetreden maar niet volledig is, kan de waargenomen zuurstofopname door het reactiemengsel worden gecorrigeerd voor de hoeveelheid zuurstof die is gebruikt voor het oxyderen van ammonium tot nitriet en nitraat, indien de veranderingen in de concentratie tijdens incubatie van nitriet en nitraat worden bepaald met inachtneming van de volgende vergelijkingen:



Totaal:



Uit vergelijking (1) volgt dat de zuurstofopname door 28 g stikstof in ammoniumchloride (NH_4Cl) die wordt geoxydeerd tot nitriet 96 g bedraagt, d.w.z. een factor van 3,43 (96/28). Op dezelfde wijze volgt uit vergelijking (3) dat de zuurstofopname door 28 g stikstof bij oxydatie tot nitraat 128 g bedraagt, d.w.z. een factor 4,57 (128/28).

Aangezien de reacties *na* elkaar verlopen, en worden bewerkstelligd door afzonderlijke en verschillende bacteriesoorten, is het mogelijk dat de concentratie nitriet toeneemt *of* afneemt, in het laatste geval zal een overeenkomstige concentratie nitraat worden gevormd. De bij de vorming van nitraat verbruikte hoeveelheid zuurstof bedraagt dus 4,57 maal de toename van de nitraatconcentratie, terwijl de hoeveelheid zuurstof die samenhangt met de vorming van nitriet 3,43 maal de toename van de nitrietconcentratie is of bij afname van de concentratie het zuurstof-verlies -3,43 is maal de afname in de concentratie.

Dus:

$$\text{O}_2 \text{ verbruikt bij nitraatvorming} = 4,57 \times \text{toename N-nitraatconcentratie} \quad (4)$$

en

$$\text{O}_2 \text{ verbruikt bij nitrietvorming} = 3,43 \times \text{toename N-nitrietconcentratie} \quad (5)$$

en

$$\text{O}_2 \text{ verloren bij verdwijning nitriet} = -3,43 \times \text{afname N-nitrietconcentratie} \quad (6)$$

zodat

$$\text{O}_2\text{-opname als gevolg van nitrificatie} = \pm 3,43 \times \text{wijziging in N-nitrietconcentratie} + 4,57 \times \text{toename N-nitraatconcentratie} \quad (7)$$

en dus

$$\text{O}_2\text{-opname als gevolg van C-oxydatie} = \text{totaal waargenomen opname} - \text{opname als gevolg van nitrificatie} \quad (8)$$

Anderzijds kan, indien alleen totaal geoxydeerde N wordt bepaald, de zuurstofopname als gevolg van nitrificatie in eerste benadering worden gesteld op $4,57 \times$ toename van geoxydeerde N.

De correctiewaarde voor zuurstofverbruik als gevolg van C-oxydatie wordt vervolgens vergeleken met $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$, zoals berekend in Bijlage II.

C.5. AFBRAAK — BIOCHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de proef is de meting van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) van vaste of vloeibare organische stoffen.

De gegevens die in deze test zijn verwerkt, hebben betrekking op in water oplosbare verbindingen; vluchtige verbindingen en verbindingen die slechts in geringe mate in water oplosbaar zijn, kunnen echter in principe ook worden getest.

De methode is alleen van toepassing op die organische teststoffen die bij de in de test gebruikte concentratie niet remmend werken op bacteriën. Als de teststof niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, kunnen speciale maatregelen zoals de toepassing van ultrasone dispersie nodig zijn om de teststof goed te dispergeren.

Gegevens over de toxiciteit van de stof kunnen van nut zijn bij de interpretatie van lage gevonden waarden en bij de keuze van geschikte concentraties.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het BZV is gedefinieerd als de massa opgeloste zuurstof die onder voorgeschreven omstandigheden nodig is voor de biochemische oxydatie van een bepaald volume van een oplossing van de stof.

De resultaten worden weergegeven als g BZV per g geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het gebruik van referentiestoffen om de activiteit van het inoculum te controleren, is wenselijk.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de stof wordt opgelost of gedispergeerd in een geschikt, goed belucht medium, geënt met micro-organismen en bij een constante vastgestelde omgevingstemperatuur in het donker geïncubeerd.

Het BZV wordt bepaald door het verschil in de hoeveelheid opgeloste zuurstof bij het begin en bij het einde van de test. De testduur mag niet minder dan 5 dagen en niet meer dan 28 dagen bedragen.

Parallel wordt een blanco proef uitgevoerd zonder teststof.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De bepaling van het BZV geldt niet zonder meer als bepaling van de biologische afbreekbaarheid van de stof. Deze test is alleen te beschouwen als oriënterende proef.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Eerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid om een BZV-concentratie te verkrijgen die verenigbaar is met de gebruikte methode. Vervolgens wordt het BZV bepaald volgens een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Het BZV van de oplossing wordt berekend volgens de gekozen genormaliseerde methode en herleid naar gram BZV per gram teststof.

3. RAPPORTAGE

De gebruikte methode moet worden vermeld.

Het biochemisch zuurstofverbruik moet het gemiddelde zijn van ten minste drie geldige metingen.

Alle informatie en opmerkingen die van belang kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, vooral wat betreft verontreinigingen, fysische toestand, toxische effecten en de oorspronkelijke samenstelling van de stof welke van invloed zouden kunnen zijn op de resultaten.

Indien een stof is toegevoegd om de biologische nitrificatie te remmen, moet dit worden vermeld.

4. LITERATUUR

Lijst van genormaliseerde methoden, bij voorbeeld:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. AFBRAAK — CHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de methode is de meting van het chemisch zuurstofverbruik (CZV) van vaste en vloeibare organische stoffen onder vaste laboratoriumomstandigheden op een genormaliseerde manier, die identiek is voor alle organische stoffen.

Informatie betreffende de formule van de stof is nuttig voor de uitvoering van deze test en de interpretatie van de resultaten (bij voorbeeld halogeenzouten, ijzer(II)zouten van organische verbindingen, organochloorverbindingen).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het chemisch zuurstofverbruik is een maat voor de oxydeerbaarheid van een stof, uitgedrukt als de door de stof onder vaste laboratoriumomstandigheden verbruikte equivalente hoeveelheid zuurstof van een oxyderend reagens.

Het resultaat wordt uitgedrukt in gram CZV per gram geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de methode te ijken en om de resultaten te kunnen vergelijken als een andere methode wordt gebruikt.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een bekende in water opgeloste of gedispergeerde hoeveelheid van de stof wordt geoxydeerd met kaliumdichromaat in sterk zwavelzuur met zilversulfaat als katalysator; deze laat men gedurende 2 uur „refluxen”. Het resterende dichromaat wordt bepaald door titratie met gestandaardiseerd ijzer(II) ammoniumsulfaat.

Bij chloorhoudende stoffen wordt kwik(II)sulfaat (*) toegevoegd om de storing door chloride te verminderen.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Aangezien de bepaling identiek is voor alle organische stoffen, is de CZV-waarde een „oxydeerbaarheidsindicator” en wordt als zodanig gebruikt als een praktische methode om de hoeveelheid organische stof te meten.

Deze test kan worden gestoord door chloride; ook kan de CZV-bepaling worden gestoord door anorganische reducerende of oxyderende agentia.

Enkele cyclische verbindingen en vele vluchtige stoffen (bij voorbeeld lagere vetzuren) worden niet volledig geoxydeerd in deze test.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Allereerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid met een CZV tussen 250 en 600 mg/l.

„Opmerkingen”:

Van slecht oplosbare en niet-dispergeerbare stoffen kan een hoeveelheid fijn verpulverde stof of een hoeveelheid vloeistof worden afgewogen die overeenkomt met ongeveer 5 mg CZV. Dit wordt met water in de opstelling voor het experiment gebracht.

Het CZV wordt vaak, en speciaal bij moeilijk oplosbare stoffen, beter bepaald met een variant van de methode, bij voorbeeld in een gesloten systeem met drukregulator (H. Kelkenberg, 1975). Met deze wijziging kunnen stoffen die met de conventionele methode slechts moeizaam bepaald kunnen worden — bij voorbeeld azijnzuur — vaak met succes worden gemeten. Ook deze methode faalt echter met pyridine. Indien de kaliumdichromaat-concentratie, zoals beschreven in referentie (1) wordt verhoogd tot 0,25 N (0,0416 M), kan het directe afwegen van 5 tot 10 mg stof vereenvoudigd worden, hetgeen essentieel is voor de CZV-bepaling van slecht in water oplosbare stoffen (referentie (2)).

Anders wordt vervolgens het CZV bepaald aan de hand van een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Het CZV van de inhoud van het testvat wordt berekend aan de hand van de gekozen genormaliseerde methode en omgerekend tot gram CZV per gram geteste stof.

(*) Na gebruik dienen oplossingen die kwikzouten bevatten te worden nabehandeld om verspreiding van kwik in het milieu te voorkomen.

3. RAPPORTAGE

De gehanteerde referentiemethode moet worden vermeld.

Het chemisch zuurstofverbruik moet een gemiddelde van ten minste drie metingen zijn. Alle informatie en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, met name wat betreft verontreinigingen, fysische toestand en de oorspronkelijke samenstelling van de stof (indien bekend) die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

Het gebruik van kwik(II)sulfaat om de storing door chloride te verminderen, moet worden vermeld.

4. LITERATUUR

- (1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- (2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Enkele gestandaardiseerde methoden:

NBN T 91-201: Determination of the Chemical Oxygen Demand.

ISBN 0 11 7512494: Chemical Oxygen Demand (Dichromate Value) of Polluted and Waste Waters — 1977.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = Water: Determination of the chemical oxygen demand.

Analysis

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg/l.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO DP 6060: Water quality: Chemical Oxygen Demand — Dichromate Methods.

C.7. AFBRAAK — NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK: HYDROLYSE IN AFHANKELIJKHEID VAN DE pH

1. METHODE

Deze methode is gebaseerd op de OESO-testrichtlijn (1).

1.1. INLEIDING

Hydrolyse is een belangrijke reactie voor het bepalen van de niet-biologische afbraak. De reactie is vooral van betekenis voor stoffen die biologisch slecht afbreekbaar zijn en kan van invloed zijn op de persistentie van een stof in het milieu.

De meeste hydrolysereacties zijn *pseudo*-eerste-orde-reacties en daarom zijn de halveringstijden onafhankelijk van de concentratie. Hierdoor kunnen de resultaten van laboratoriumconcentraties worden geëxtrapoleerd naar milieumomstandigheden.

Bovendien zijn er verscheidene gevallen bekend (zie punt 2) waarin een bevredigende overeenstemming werd gevonden tussen de resultaten in zuiver en in natuurlijk water en wel voor verschillende typen chemicaliën.

Informatie vooraf over de dampspanning van de stof is van nut voor de uitvoering van deze test.

Deze methode is alleen toepasbaar op in water oplosbare stoffen. Verontreinigingen kunnen de resultaten nadelig beïnvloeden.

Het hydrolytisch gedrag van stoffen dient te worden onderzocht bij zuurtegraden die normaal in het milieu voorkomen (pH 4 tot 9).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Hydrolyse is een reactie van een verbinding RX met water, die kan worden weergegeven als de uitwisseling van de groep X tegen OH:



De snelheid waarmee de concentratie van RX afneemt wordt gegeven door:

$$\text{snelheid} = k[\text{H}_2\text{O}][\text{RX}] \quad [2]$$

Omdat water in grote overmaat ten opzichte van de uitgangsverbinding aanwezig is wordt dit reactietype doorgaans beschreven als een *pseudo*-eerste-orde-reactie waarin de waargenomen snelheidsconstante (k_{obs}) wordt gegeven door de volgende vergelijking:

$$k_{\text{obs}} = k[\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Deze constante kan voor een bepaalde pH en temperatuur T worden bepaald met behulp van de formule:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

waarin:

t = tijd;

C_0 = concentratie uitgangsstof op het tijdstip 0;

C_t = concentratie uitgangsstof op het tijdstip t;

2,303 = omrekeningsfactor tussen natuurlijke en Briggse logaritmen.

De concentraties worden uitgedrukt in gram per liter of mol per liter.

Deze constante k_{obs} , heeft de dimensie (tijd)⁻¹.

De halveringstijd $t_{\frac{1}{2}}$ is de tijd die nodig is om de concentratie van de teststof met 50 % te verminderen, dat wil zeggen:

$$C_t = \frac{1}{2} \cdot C_0 \quad [5]$$

Combinatie van de formules [4] en [5] levert op:

$$t_{\frac{1}{2}} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Bij het onderzoeken van een nieuwe stof is het niet in alle gevallen nodig referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen dienen in eerste instantie om van tijd tot tijd te controleren of de methode goed werkt en bieden de mogelijkheid tot vergelijking met de resultaten van een andere methode.

De volgende stoffen zijn als referentiestoffen gebruikt (1):

Acetylsalicylzuur (Aspirine)

0,0-diethyl-0-1[6-methyl-2-(1-methylethyl)-pyrimidine-4-yl]thiofosfaat. (Dimpylaat, Diazinon).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt in lage concentratie in water opgelost en de pH en de temperatuur van de oplossing worden gecontroleerd.

De afname van de concentratie van de stof tegen de tijd wordt gevolgd volgens een geschikte analytische methode.

De logaritmen van de concentratie worden uitgezet tegen de tijd en indien de punten een rechte lijn opleveren, wordt de eerste-orde snelheidsconstante verkregen uit de helling van die rechte (zie punt 2).

Als rechtstreekse bepaling van de snelheidsconstante bij een bepaalde temperatuur op moeilijkheden stuit, kan doorgaans een schatting van deze constante worden verkregen met behulp van de Arrhenius vergelijking, die de temperatuurafhankelijkheid van de snelheidsconstante aangeeft. Uit het rechtlijnig verband tussen de logaritme van de bij een aantal temperaturen gemeten snelheidsconstante en de reciproke waarde van de absolute temperatuur (K) kan de waarde van de snelheidsconstante, die niet rechtstreeks meetbaar was, worden geëxtrapoleerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Volgens referentie (2) kunnen metingen van hydrolysesnelheidsconstanten van 13 klassen organische verbindingen zeer nauwkeurig zijn.

De herhaalbaarheid is vooral afhankelijk van de beheersing van de pH en de temperatuur en zou beïnvloed kunnen worden door de aanwezigheid van micro-organismen en in speciale gevallen door de concentratie opgeloste zuurstof.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Bufferoplossingen

De test wordt uitgevoerd bij drie pH-waarden: 4,0, 7,0 en 9,0.

Hiertoe worden bufferoplossingen bereid met zuivere chemicaliën en gedistilleerd of gedeïoniseerd, steriel water. Het aanhangsel bevat een aantal bruikbare buffersystemen.

De keuze van het buffersysteem kan van invloed zijn op de hydrolysesnelheid; als afwijkingen blijken, moet een alternatief buffersysteem worden gebruikt. In referentie (2) wordt het gebruik van boraat- of acetaatbuffers aanbevolen in plaats van fosfaat.

Indien de pH van een bufferoplossing bij de in de test gebruikte temperatuur niet bekend is, kan deze bij de gekozen temperatuur worden gemeten met een geijkte pH-meter met een nauwkeurigheid van $\pm 0,1$ pH-eenheden.

1.6.1.2. Testoplossingen

De teststof wordt opgelost in de gekozen buffer in een concentratie die niet hoger is dan 0,01 M of niet hoger dan de helft van de verzadigingsconcentratie, naar gelang welke van beide waarden de laagste is.

Het gebruik van met water mengbare, organische oplosmiddelen is alleen raadzaam als de stof slecht in water oplosbaar is.

De hoeveelheid oplosmiddel mag niet meer zijn dan 1 % en het hulpoplosmiddel mag het hydrolyseproces niet storen.

1.6.2. Apparatuur

Er wordt gebruik gemaakt van glazen kolven met ingeslepen stop zonder vet op de slijpstukken.

Als de teststof of het buffersysteem vluchtig is of als de test wordt uitgevoerd bij hoge temperatuur, verdienen verzegelde of met een septum afgesloten buizen de voorkeur en moet het gasvolume boven de oplossing zo klein mogelijk zijn.

1.6.3. Analysemethode

De methode moet specifiek zijn om bepaling van de teststof in de concentraties van de testoplossingen mogelijk te maken en kan een combinatie van geschikte analysemethoden omvatten.

De gebruikte analysemethode is afhankelijk van de aard van de te onderzoeken stof en dient voldoende nauwkeurig en gevoelig te zijn om een afname van de beginconcentratie met 10 % aan te tonen.

1.6.4. Testomstandigheden

De proeven worden uitgevoerd in een thermostatisch geregelde ruimte of in een bad met constante temperatuur op $\pm 0,5$ °C van de gekozen temperatuur. De temperatuur wordt geregeld en gemeten op $\pm 0,1$ °C. Ontleding door licht moet met de daartoe strekkende middelen worden voorkomen.

Bij stoffen die gemakkelijk oxydeerbaar zijn, moet opgeloste zuurstof worden uitgesloten (bij voorbeeld door gedurende 5 minuten stikstof of argon door te leiden alvorens de oplossing te bereiden).

1.6.5. Testprocedure

1.6.5.1. Oriënterende proef

Op alle stoffen moet een oriënterende proef bij 50 °C $\pm 0,5$ °C worden uitgevoerd bij drie pH-waarden: 4,0, 7,0 en 9,0. Hierbij dient een voldoende aantal metingen te worden verricht om te kunnen bepalen of bij elke pH-waarde en bij 50 °C de halveringstijd ($t_{1/2}$) kleiner is dan 2,4 uur dan wel of na 5 dagen minder dan 10 % is gehydrolyseerd. (Dit levert voor een temperatuur die meer met de milieu-omstandigheden overeenkomt (25 °C) geschatte halveringstijden op van respectievelijk korter dan een dag en langer dan een jaar.)

Als uit de oriënterende proef naar voren komt dat bij de drie pH-waarden (4, 7 en 9) binnen 2,4 uur bij 50 °C 50 % of meer van de te onderzoeken stof is gehydrolyseerd dan wel na 5 dagen nog steeds minder dan 10 % is gehydrolyseerd, zijn er geen verdere proeven nodig.

Als het resultaat voor een of meer pH-waarden daar tussenin ligt, wordt test nr. 1 uitgevoerd.

1.6.5.2. Test nr. 1

Test nr. 1 wordt uitgevoerd bij één temperatuur, bij voorkeur bij $50 \pm 0,5$ °C en, zo mogelijk, onder steriele omstandigheden, en wel bij die pH's waarvoor op grond van de oriënterende proef nader onderzoek nodig is.

Er wordt een voldoende aantal monsters (ten minste vier) genomen, dat het gebied tussen 20 % en 70 % hydrolyse bestrijkt; hiermee wordt het pseudo-eerste-ordegedrag bij de bewuste pH-waarden gecontroleerd.

Voor elke pH-waarde waarmee test nr. 1 wordt uitgevoerd, wordt de orde van de reactie vastgesteld.

Schatting van de snelheidsconstante bij 25 °C

Als na gelang test nr. 1 oplevert dat de reactie *pseudo*-eerste-orde is of niet, wordt besloten met welke test wordt verder gegaan.

Als op grond van test nr. 1 niet met zekerheid kan worden geconcludeerd dat de reactie *pseudo*-eerste-orde is, moeten de proeven van test nr. 2 worden uitgevoerd.

Als op grond van test nr. 1 met zekerheid kan worden besloten dat de reactie een eerste-ordeverloop heeft, worden de proeven van test nr. 3 uitgevoerd (onder bijzondere omstandigheden is het wel eens mogelijk de snelheidsconstanten bij 25 °C te berekenen uit de constanten bij 50 °C, berekend aan de hand van de resultaten van test nr. 1 (zie punt 3.2)).

1.6.5.3. Test nr. 2

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH-waarde, waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek, en wel:

- hetzij bij één temperatuur, lager dan 40 °C;
- hetzij bij twee temperaturen, hoger dan 50 °C en met een onderling verschil van ten minste 10 °C.

Bij elke pH-waarde en temperatuur worden in deze test ten minste zes gespreide meetpunten genomen, zodanig dat het gebied tussen 20 en 70 % hydrolyse wordt bestreken.

Voor één pH-waarde en één temperatuur wordt een bepaling in duplo uitgevoerd; wanneer deze test geschiedt bij twee temperaturen boven 50 °C, wordt de duplo bij voorkeur uitgevoerd op de laagste van die twee temperaturen.

Zoveel mogelijk wordt voor elke pH en temperatuur waarbij test nr. 2 wordt uitgevoerd, een grafische schatting gegeven van de halveringstijd ($t_{\frac{1}{2}}$).

1.6.5.4. Test nr. 3

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek en wel:

- hetzij bij een temperatuur, lager dan 40 °C;
- hetzij bij twee temperaturen, hoger dan 50 °C en met een onderling verschil van ten minste 10 °C.

Voor elke pH en temperatuur waarbij deze test wordt uitgevoerd, worden drie meetpunten gekozen, het eerste op het tijdstip 0, het tweede en derde bij hydrolysegraden van meer dan 30 %; vervolgens worden de constante k_{obs} en $t_{\frac{1}{2}}$ berekend.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Bij een *pseudo*-eerste-ordegedrag kunnen de waarden van k_{obs} voor elke pH en temperatuur van de test worden verkregen door de logaritme van de concentratie uit te zetten tegen de tijd en gebruik makend van de volgende vergelijking:

$$k_{\text{obs}} = - \text{helling} \times 2,303 \quad [7]$$

Vervolgens kan de $t_{\frac{1}{2}}$ worden berekend met behulp van vergelijking [6].

De $k_{25\text{ °C}}$ kan in voorkomend geval worden berekend met behulp van de Arrhenius-vergelijking.

Voor niet-*pseudo*-eerste-ordegedrag zie punt 3.1.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- specificatie van de stof;
- resultaten verkregen met referentiestoffen;
- principe en bijzonderheden van de gebruikte analysemethode(n);
- voor elke test: temperatuur, pH-waarde, buffersamenstelling en een tabel met alle concentraties en tijden;
- voor *pseudo*-eerste-ordereacties: de waarden van k_{obs} en $t_{\frac{1}{2}}$ en de berekeningswijze;
- voor niet-*pseudo*-eerste-ordereacties: grafische weergave van de logaritme van de concentratie uitgezet tegen de tijd;
- alle inlichtingen en opmerkingen die voor de interpretatie van de resultaten van belang zijn.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Soms is het mogelijk een redelijk betrouwbare berekening van de snelheidsconstante (bij 25 °C) van de teststof te maken, mits er reeds experimentele waarden van de activeringsenergie bestaan voor homologen van de teststof en mits redelijkerwijs kan worden aangenomen dat de activeringsenergie van de teststof ongeveer dezelfde grootte heeft.

4. REFERENTIES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111. Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) W. Mabey en T. Mill, Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions, J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

Aanhangsel

Buffermengsels

A. CLARK EN LUBS

De pH-waarden in deze tabellen zijn berekend uit potentiaalmetingen met behulp van de standaardvergelijkingen van Sørensen (1909). De werkelijke pH-waarden liggen 0,04 eenheid hoger dan de opgegeven waarden.

| Samenstelling | pH |
|---|-----|
| 0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N HCl bij 20 °C | |
| 2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalaat tot 100 ml | 3,8 |
| 0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C | |
| 0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml | 4,2 |
| 0,1 M monokaliumfosfaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C | |
| 23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml | 7,2 |

| | |
|--|-----|
| 0,1 M boorzuur in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH bij 20 °C | |
| 16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml | 9,2 |

B. KOLTHOFF EN VLEESCHOUWER

| | |
|---|-----|
| Samenstelling | pH |
| 0,1 M monokaliumcitraat + 0,1 N NaOH bij 18 °C (kristalletje thymol toevoegen om schimmelgroei te voorkomen) | |
| 2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml | 4,2 |

C. SÖRENSEN

Borax ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) + HCl ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)

| Samenstelling | | pH | | | |
|---------------|--------|-------------------|--------|-------|-------|
| ml Borax | ml HCl | Sörensen 18 °C | Walbum | | |
| | | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| 8,0 | 2,0 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| 8,5 | 1,5 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| 9,0 | 1,0 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| 9,5 | 0,5 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |

Borax ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) + NaOH ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)

| Samenstelling | | pH | | | |
|---------------|---------|-------------------|--------|-------|-------|
| ml Borax | ml NaOH | Sörensen 18 °C | Walbum | | |
| | | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 9,0 | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| 8,0 | 2,0 | 9,50 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| 7,0 | 3,0 | 9,68 | 9,76 | 9,44 | 9,12 |

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% kaolinit;
- 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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 meetkundige 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 LC_{50} -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 LC_{50} 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, dispergeerbaar 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 filtreerpapier 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 clitellum, 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, *Testrictlijn 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 andreii*, deze niet heeft en een onregelmatige roodachtige kleur heeft. Zo mogelijk dient *Eisenia foetida andreii* 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, NH₄Cl, AR: 38,5 g,

natriumdihydrogenfosfaat, NaH₂PO₄ · 2 H₂O, AR: 33,4 g,

kaliumdihydrogenfosfaat, KH₂PO₄, AR: 8,5 g,

di-kaliumwaterstoffosfaat, K₂HPO₄, 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.

Membranefiltrereapparaat.

Membranefilters, mazen van 0,45 µm. Membranefilters zijn geschikt als vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en bij het filtreren 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 aangevoeld 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 basisoniveau (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

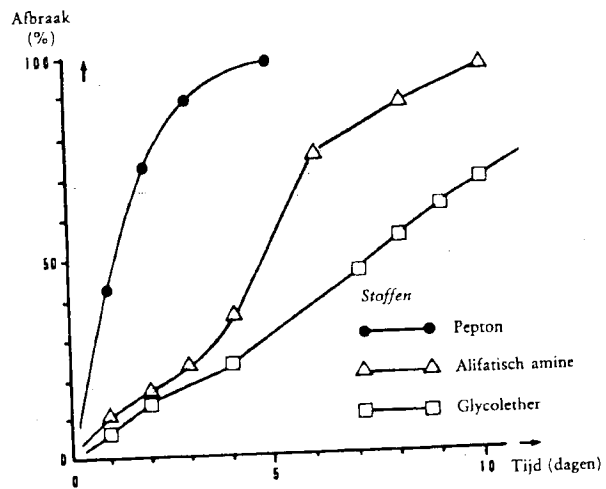
Organische verbinding: 4-Ethoxybenzozuur
 Theoretische testconcentratie: 600 mg/l
 Theoretische DOC: 390 mg/l
 Entmateriaal: Waterzuiveringsinstallatie van ...
 Concentratie: 1 g droge stof per liter
 Adaptatietoestand: niet geadapteerd
 Analyse: DOC-bepaling
 Monstervolume: 3 ml
 Controlestof: Diethyleenglycol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

| 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.

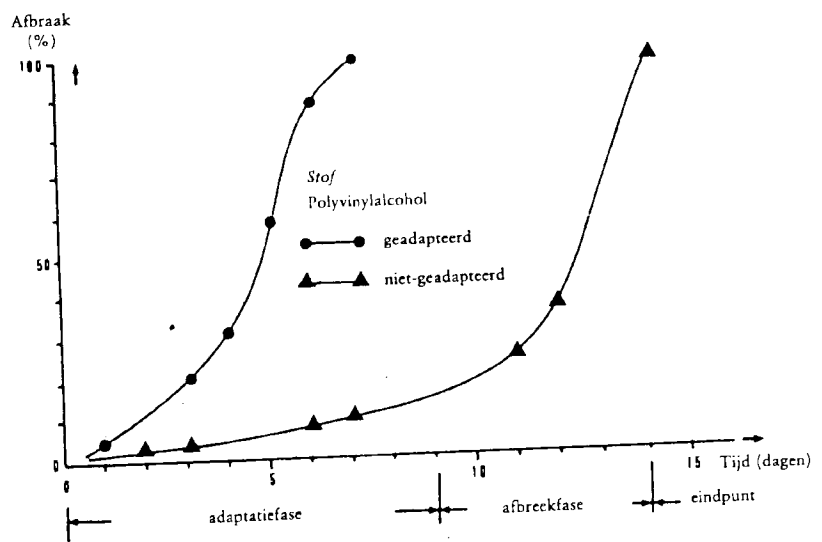
Figuur 1

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. Definitie 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 toevoerstroom in mg DOC/l (of COD/l),

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

E₀ = DOC- of COD-concentratie in de afvoerstroom 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:

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

waarin:
 C_1 = concentratie van de stof in de toevoerstroam van de testeenheid (mg stof/l, bepaald met specifieke analyse),
 C_0 = 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 afbreekproducten 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 effluënten 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 poriegrootte 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 invoerstream en de concentratie zijn verzekerd.

Er moeten enige poreuze binnenpotten 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 poriegrootte 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 weggeworpen. Het filtraat wordt toe aan het gebruik aerobisch gehouden. Het entmateriaal moet op de dag van de monsternamen 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 chloovrij 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 aeroob 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 porengrootte 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 toevoerstroam 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 weggeworpen.

De gefiltreerde monsters moeten op dezelfde dag worden geanalyseerd of anders 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-slibsuspensie 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:

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

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

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

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

waarin:

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

\overline{DR}_c = gemiddelde DR_c-waarde,

n = aantal bepalingen.

Uitschieters van de DR_c-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 DR_c-waarden zonder uitschieters opnieuw berekend.

Het eindresultaat wordt vervolgens berekend met vergelijking [5]:

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

waarin:

$t_{n-1; \alpha}$ = tabelwaarde van t voor n paar waarden van E en E₀ en statistische betrouwbaarheid P (P = 1 - α), 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 DR_c-reeks zonder uitschieters en het aantal uitschieters, bij voorbeeld:

DR_c = 98,6 ± 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_0 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 aanlooperperiode 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.

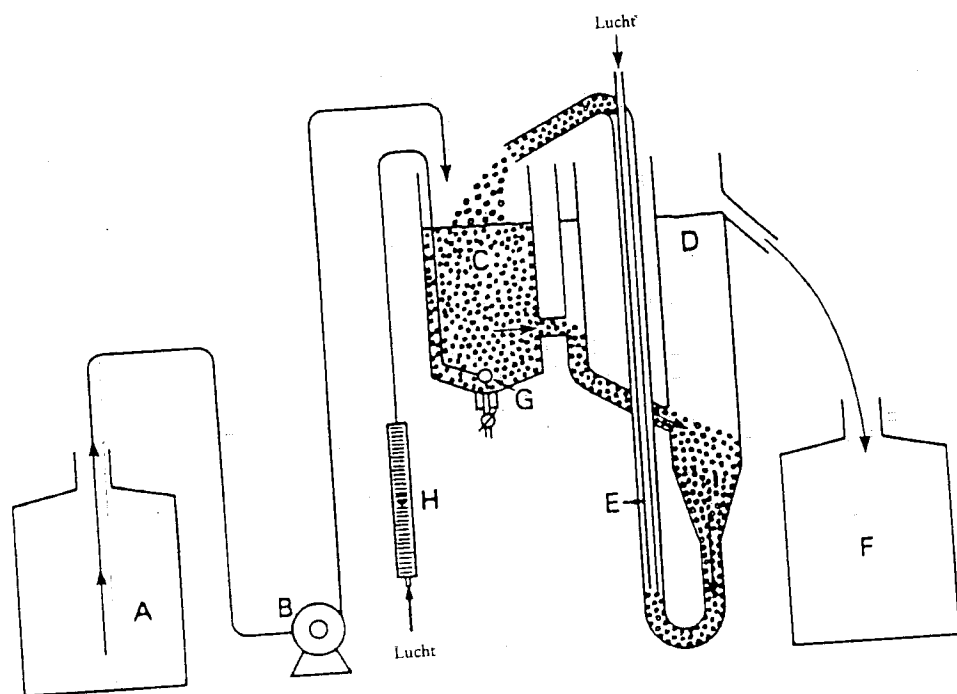
4.

REFERENTIES

- (1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 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 detergenten (*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.



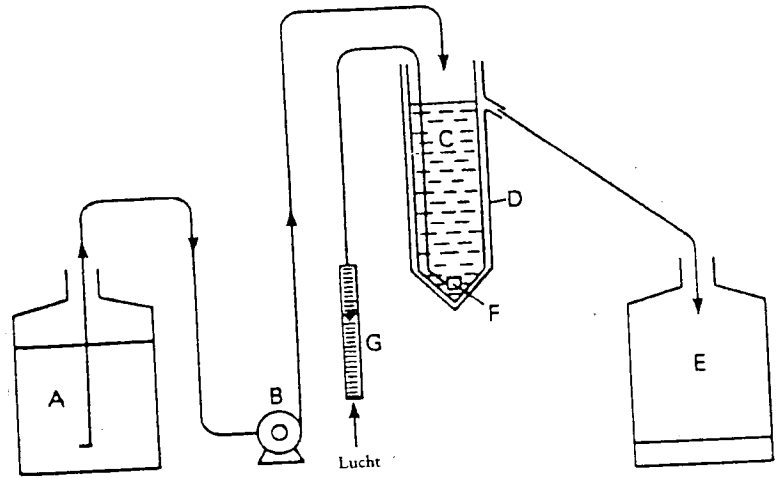
A = Voorraadvat;
B = Doseerpomp;
C = Beluchttingsvat (inh. 3 l);
D = Bezinkvat;

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

Aanhangsel 2

Figuur 1

Apparatuur voor bepaling biologische afbreekbaarheid

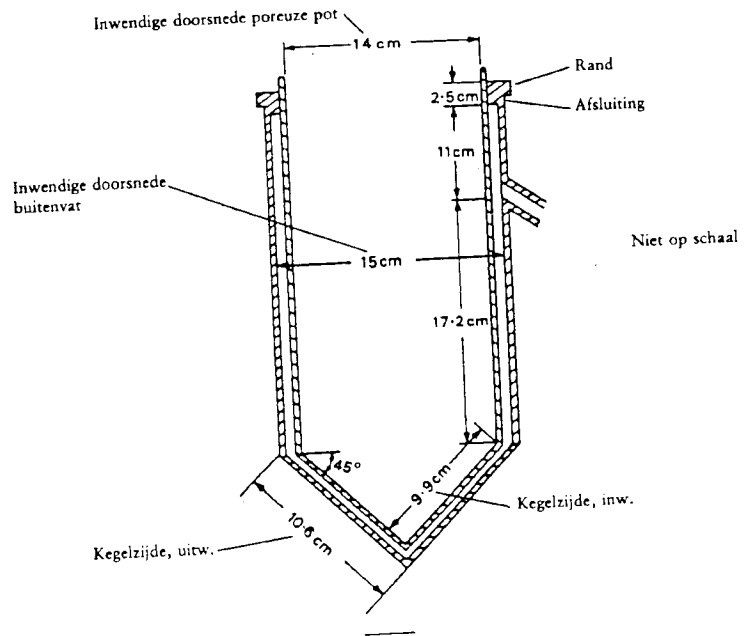


- A = Voorraadvat;
- B = Doseerpomp;
- C = Poreus beluchtingsvat;
- D = Ondoordringbaar buitenvat;

- E = Vergaarbak effluent;
- F = Borrelaar;
- G = Luchtmeter (indien gewenst).

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 EC₅₀ 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 O₂ 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:

$$\left(1 - \frac{2R_1}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{percentage remming}$$

waarin:

- R₁ = ademhalingsnelheid bij de geteste concentratie van de teststof,
- RC₁ = ademhalingsnelheid van de eerste controle,
- RC₂ = ademhalingsnelheid van de tweede controle.

De EC₅₀ 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 EC₅₀ 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 1M 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 microbiel 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 gesuspenderde 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 beerglazen 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 microbiel 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 microbiel 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 $\text{mg O}_2/\text{l.h}$ tussen ongeveer 6,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$ en 2,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$ 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 EC_{30} (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 EC_{50} -waarde herleid.

De 95 % betrouwbaarheidsgrenzen voor de EC_{50} -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 EC_{50} daarvan,
 - abiotische zuurstofopname (indien plaatsvindend);
- resultaten:
 - alle meetgegevens,
 - remmingscurve en methode ter bepaling van EC_{50} ,
 - EC_{50} en zo mogelijk 95 % betrouwbaarheidsgrenzen, EC_{25} en EC_{75} ,
 - alle waarnemingen en alle afwijkingen van deze testmethode die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

3.2. Interpretatie van de gegevens

De EC_{50} -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, *Testrichtlijn 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 voorbezonken 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 gesuspendeerde 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}):

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

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_{isd}):

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

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

D_{isd} = 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 beluchtingskamer 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 beluchtingskamers (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-slib suspensie genomen, dat 1 tot 4 g gesuspenderde 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 gesuspendeerd 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 opgedraaid 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 bezonden 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 gefiltreerd 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 ($D_{0.5}$ of $D_{0.5d}$; 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, *Testrictlijn 302 A*, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

Aanhangsel 1

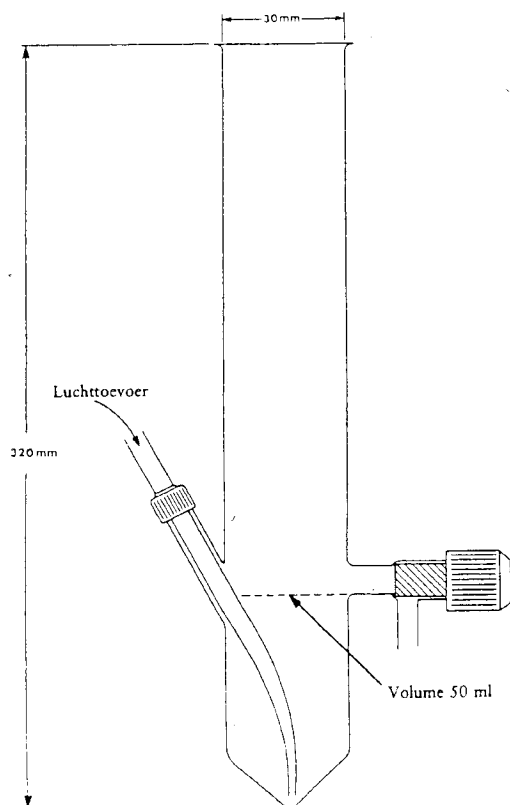
SCAS-test: voorbeeld van resultaten

| Chemische stof | C_T (mg/l) | $C_i - C_e$ (mg/l) | Percentage biodegradatie, D_{45} | Testduur (dagen) |
|---------------------------------|-----------------|-----------------------|--|---------------------|
| 4-acetyl aminobenzeen sulfonaat | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| Tetrapropyleenbenzeen 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 |
| Cyclopentaaan tetracarboxylaat | 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 depuratiesnelheidsconstante (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 weefselsolubilisatie), 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 accumulatietest, 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 depuratiefase (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 depuratie (of netto eliminatie) van de teststof uit de vis (of bepaalde weefsels daarvan) wordt bestudeerd.

De *depuratie- (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 depuratiefase. 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 depuratiefase ingeluid. Een depuratiefase 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 depuratiefase 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 (depuratie), uitgaande van een eersteordekinetiek. Als duidelijk is dat het proces niet door een eersteordekinetiek 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 depuratiefase aangevat.

De opnamesnelheidsconstante, de depuratie- (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, voorzover 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 (tijdonafhankelijke) 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 welk 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 ± 2 °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 pyrethroïden, 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 ten minste 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, 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 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 afbrekbare stoffen worden gebruikt, moet in het bijzonder worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in het doorstroomstelsel 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 doorstroomstelsel 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 datgene dat 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 ziektekenen 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 depuratiefase) 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, stoelend op gegevens betreffende de oplosbaarheid in water of de octanol-water-partiticoëfficiënt 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 depuratiefase

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 depuratiefase 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 depuratiepatroon dan kan worden beschreven met een ééncompartimentmodel dat een eersteordekinetiek vertoont, moet evenwel toch in een langere depuratiefase worden voorzien met het oog op de bepaling van de eliminatiesnelheidsconstanten. De duur van de depuratiefase kan in voorkomend geval overigens mee 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/visverhouding 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 ± 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 grotere 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 (± 2 °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 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 tien 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 organischekoolstofgehalte 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 eersteorde-depuratiekinetiek 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_{ox}-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 voorbereiding 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_{ox} > 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 depuratiefase bestendig worden gecontroleerd.

Bij iedere bemonstering wordt een adequaat aantal vissen (meestal ten minste vier) 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 naargelang de test vordert een benaderde opname- en depuratiesnelheid 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 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 van wat zich het eerst voordoet). Indien de BCF, gemeten op basis van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen, ≥ 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 ≥ 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 (zie de referenties 8 en 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 als datgene 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 drogestofgehalte 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:

$$\frac{C_i \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}{C_a \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}$$

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 eersteordesnelheidsconstanten. De deparatiesnelheidsconstante (k_2) wordt meestal bepaald op de deparatiecurve, 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_i die wordt gehaald uit de opnamecurve (zie ook aanhangsel 5). Het verdient de voorkeur KCF_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 deparatiecurve duidelijk geen eersteordekinetiek 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- respectievelijk de deparatieconstante als bepaald voor de twee testconcentraties behoort niet meer te bedragen dan 20 %. Indien tussen de gemeten waarden van de opname- c.q. de deparatiesnelheidsconstante voor de twee gebruikte testconcentraties een significant verschil bestaat, moet dit worden genoteerd en moeten mogelijk verklaringen worden gesuggereerd. Bij goed opgezette studies is het betrouwbaarheidsinterval voor de BCF in het algemeen niet veel ruimer dan (puntschatting) ± 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 organischekoolstofgehalte);
- indien radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, de precieze positie van het radioactieve atoom (de radioactieve 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 deparatiefase, 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 organischekoolstofgehalte 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 dat water 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 (voorzover 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 (voorzover bekend) worden gerapporteerd. Geef aan welke gegevensverwerkings- en rekenmethoden werden gebruikt;
- indien radioactief gemerkt materiaal werd gebruikt en voorzover 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.

4. REFERENTIES

- (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. 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 organofosforpesticiden | 50 ng/l |
| 6 | Totaal organochloorpesticiden plus polychloorbifenylen | 50 ng/l |
| 7 | Totaal organische chloorverbindingen | 25 ng/l |
| 8 | Aluminium | 1 µg/l |
| 9 | Arseen | 1 µg/l |
| 10 | Chroom | 1 µg/l |
| 11 | Kobalt | 1 µg/l |
| 12 | Koper | 1 µg/l |
| 13 | IJzer | 1 µg/l |
| 14 | Lood | 1 µg/l |
| 15 | Nikkel | 1 µg/l |
| 16 | Zink | 1 µg/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 temperatuurbereik (°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 and 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

| | |
|------------------------|----------------------------|
| Leiostomus xanthurus | (Puntombervis) |
| Cyprinodon variegatus | (Edelsteentandkarper) |
| Menidia beryllina | („Silverside”) |
| Cymatogaster aggregata | („Shiner perch”) |
| Parophrys vetulus | („English sole”) |
| Leptocottus armatus | („Staghorn sculpin”) |
| Gasterosteus aculeatus | (Driedoornige stekelbaars) |
| Dicentrarchus labrax | (Zeebaars) |
| Alburnus alburnus | (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 empirische verband dat is aangetoond tussen k_2 en de n-octanol-water-partiticoëfficiënt (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 empirische 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 referentie (2).

Indien de waarde van de partiticoëfficiënt (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 depuratiekinetiek beschrijft (eerstordekinetiek):

$$\frac{dC_t}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_t$$

of, indien C constant is:

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

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

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

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_{ts}).

Vergelijking 3 kan dan worden herschreven als:

$$C_t = C_{ts} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{of} \quad \frac{C_t}{C_{ts}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{vergelijking 4}).$$

Door toepassing van de 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 (7).

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 en 6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414(4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ d}^{-1} \\ t_{op} = t_{80} &= 1,6/0,652, \text{ d.w.z. } 2,45 \text{ d (59 h)} \\ \text{of } t_{op} = t_{95} &= 3,0/0,652, \text{ d.w.z. } 4,60 \text{ d (110 h)}. \end{aligned}$$

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 de vergelijkingen 1, 2, 5 en 6 als volgt worden berekend:

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0,862 \cdot (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ d}^{-1} \\ t_{op} = t_{80} &= 1,6/0,246, \text{ d.w.z. } 6,5 \text{ d (156 h)} \\ \text{of } t_{op} = t_{95} &= 3,0/0,246, \text{ d.w.z. } 12,2 \text{ d (293 h)}. \end{aligned}$$

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 depuratiefase

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 depuratiekinetiek (eersteordekinetiek) (1) (8).

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

$$\frac{dC_i}{dt} = -k_2 C_i \quad \text{of} \quad C_i = C_{i,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

waarin $C_{i,0}$ de concentratie is bij het begin van depuratiefase. 50 % depuratie wordt verkregen na t_{50} , die als volgt wordt berekend:

$$\frac{C_i}{C_{i,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{of} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Zo ook wordt 95 % depuratie 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 depuratiefase wanneer de eliminatie 95 % beloopt ($3,0/k_2$), bedraagt de duur van de depuratiefase 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 eersteordekinetiek. Als duidelijk is dat een eersteordekinetiek niet van toepassing is, dienen complexere modellen te worden gebruikt (zie bijvoorbeeld referentie (1)).

Referenties (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 bioconcentratietest met een stof waarvoor $\log P_{ow} = 4$

| Bemonstering vissen | Bemonsteringsschema | | 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) | 4 (4) |
| 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 gepocheerd.

NB: De preliminaire, aan de test voorafgaande schatting van k_2 op basis van $\log P_{ow} = 4,0$ bedraagt $0,652 \text{ dag}^{-1}$. De totale duur van het experiment wordt gelijkgesteld aan

$$3 \times t_{op} = 3 \times 4,6 \text{ dagen, d.w.z. } 14 \text{ dagen. Voor de schatting van } t_{op}, \text{ zie aanhangsel 3.}$$

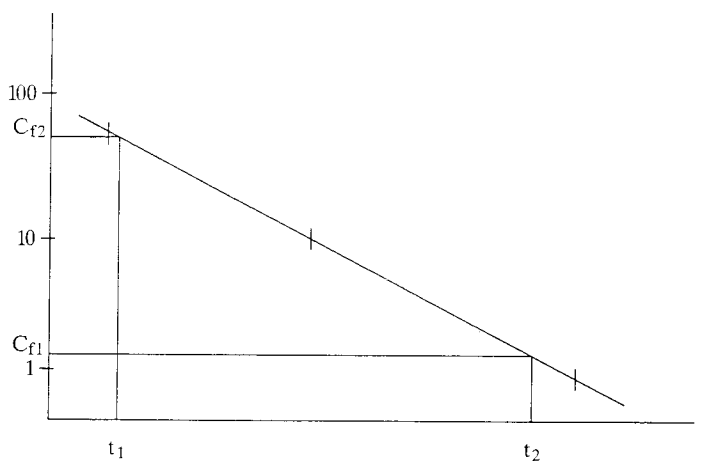
Keuze van een model

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 deparatiefase 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 (referentie 1 in aanhangsel 3).

Grafische methode voor de bepaling van de deparatie-(eliminatie)-snelheidsconstante k_2

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

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



Houd er rekening mee dat afwijkingen van een lineair verband tussen $\log C_f$ en t een aanwijzing kunnen vormen voor een complex deparatiepatroon dat niet door een eersteordekinetiek kan worden beschreven. Om deparatiepatronen door te rekenen die niet door een eersteordekinetiek 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:

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

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 die 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:

$$C_t = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{vergelijking 2})$$

$$C_t = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (\text{vergelijking 3})$$

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) (3), 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 groeitesten uitgevoerd met zebrafissen (*Danio rerio*) (2) (4) (5) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

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 wordt 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.

1.3. 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 EC₁₀, EC₂₀ of EC₃₀). 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.

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. REFERENTIES

- (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, pp. 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, pp. 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 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, pp. 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. De 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 antivarroproducten, 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. Voorbereiding 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. Voorbereiding 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 LD_{50} -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 LD_{50} -24 uur tussen 0.10 en 0.30 $\mu\text{g a.s.}$ 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 (LD₅₀) met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4) (5). 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 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,
- 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 en elke abnormale respons van de bijen,
- elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

3. REFERENTIES

- (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, pp. 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, pp. 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 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, pp. 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/desorptieonderzoek 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 sortiewaarde te verkrijgen die kan worden gebruikt om een prognose te doen omtrent de verdeling onder een scala van milieuomstandigheden; 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 verdeelingscoëfficiënt 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 aanhangsel).

1.3. DEFINITIES EN EENHEDEN

| Symbool | 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 adsorptie-test | 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 | volumen van de waterfase die tijdens de adsorptietest in contact met het bodemmonster is, op het tijdstip $t = 0$ | cm^3 |
| v_a^A | volumen 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 |

| Symbol | Definitie | Eenheid |
|----------------------------|---|-----------------------|
| $m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ | 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 analyse doeleinden 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^E | 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 bodemmonster 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 bodemmonsters 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 bodemmonster 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:

- a) de oplosbaarheid in water (A.6.);
- b) de dampspanning (A.4.) en/of de constante van de wet van Henry;
- c) de niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH (C.7.);
- d) de verdelingscoëfficiënt (A.8.);
- e) de „gemakkelijke” biologische afbreekbaarheid (C.4) of de aerobe en anaerobe omzetting in de bodem;
- f) de pKa van ioniseerbare stoffen
- g) 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 bodemmonster tijdens het schudden in suspensie houden;

- c) centrifuge: bij voorkeur met hoge snelheid, bijvoorbeeld > 3 000 g, instelbare temperatuur, in staat om deeltjes met een diameter van meer dan 0,2 µm 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: filtreerapparatuur; steriele wegwerpfilters met een porositeit van 0,2 µm. 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 °C tot 110 °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 koolstof- gehalte (%) | Kleigehalte (%) | Bodemtextuur ⁽¹⁾ |
|-----------|---|---|------------------------|-----------------------------|
| 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 ⁽²⁾ | < 0,5-1,5 ⁽²⁾ ⁽³⁾ | < 10-15 ⁽²⁾ | lemig zand |
| 6 | > 7,0 | < 0,5-1,0 ⁽²⁾ ⁽³⁾ | 40-65 | kleileem/klei |
| 7 | < 4,5 | > 10 | < 10 | zand/lemig zand |

⁽¹⁾ Volgens het systeem van de FAO en de VS (53).

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ 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. Voorbereiding van de teststof voor de toevoeging aan de bodemmonsters

De teststof wordt opgelost in 0.01 M CaCl_2 in gedestilleerd of gedeïoniseerd water; de CaCl_2 -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 ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻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 oppervlakreactieve 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 CaCl_2 -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 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). Aanhangsel 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), hagedrukvloeistofchromatografie (HPLC), spectrometrie (bv. 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 ten minste twee ordes van grootte onder de nominale concentratie liggen.

De kenmerken en detectiegrenzen van de beschikbare analysemethode voor het adsorptieonderzoek 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 bodemmonster/oplossing

De keuze van een geschikte verhouding bodemmonster/oplossing voor het sorptieonderzoek 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.

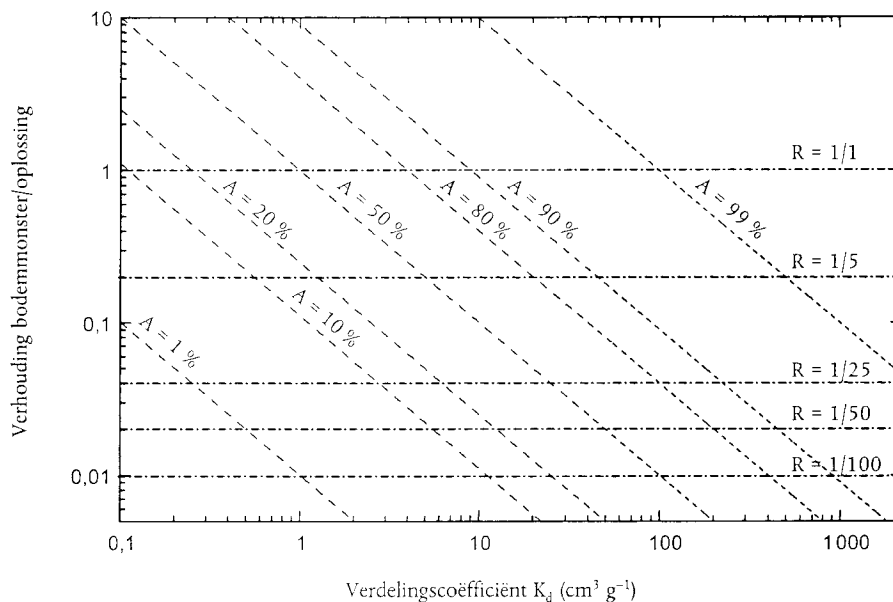
Een geschikte manier om de juiste verhouding bodemmonster/waterfase te kiezen is op basis van een raming van de K_d waarde door voorbereidend onderzoek of erkende schattingstechnieken (zie aanhangsel 3). Vervolgens kan een geschikte verhouding worden gekozen op basis van een grafiek waarin de verhouding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

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

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

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

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



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

Figuur 1 geeft een overzicht van de vereiste verhouding bodemonster/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 bodemonster/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 bodemonster/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 bodemonster/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 aanhangsel 3). Dit kan met name nuttig zijn bij slecht geadsorbeerde/lipofiele stoffen met een $P_{\text{ow}} < 20$ en lipofiele/sterk geadsorbeerde stoffen met een $P_{\text{ow}} > 10^4$.

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. Aanhangsel.4 bevat richtsnoeren om de centrifugeeromstandigheden 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 verlies 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 I: 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 bodemonster/oplossing

Er worden twee bodemtypes en drie verhoudingen bodemonster/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 bodemonster en 50 cm³ oplossing van de teststof in water (verhouding 1:1),
- 10 g bodemonster en 50 cm³ oplossing van de teststof in water (verhouding 1:5),
- 2 g bodemonster en 50 cm³ oplossing van de teststof in water (verhouding 1:25).

De minimale hoeveelheid bodemonster 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 CaCl₂-oplossing (zonder bodemonster) wordt aan exact dezelfde behandeling onderworpen als de testsystemen om de stabiliteit van de teststof in de CaCl₂-oplossing en de mogelijke adsorptie aan de wanden van het proefvat te controleren.

Voor elk bodemtype wordt één blanco-bepaling met dezelfde hoeveelheid bodemonster en een totaalvolume van 50 cm³ 0,01 M CaCl₂-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 bodemonsters worden geëquilibreerd door de nacht vóór de dag van het experiment (gedurende 12 uur) te schudden met een minimaal volume van 45 cm³ 0,01 M CaCl₂-oplossing. Vervolgens wordt een bepaald volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om het uiteindelijke volume op 50 cm³ te brengen. Dit toegevoegde volume stockoplossing: a) mag niet groter zijn dan 10 % van het uiteindelijke volume van de waterfase van 50 cm³ 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 bodemonster (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 oplosbaarheidsgrens aanbevolen.

De concentratie van de stockoplossing (C_{st}) kan analoog aan het volgende voorbeeld worden berekend: Uitgaande van een detectiegrens van 0,01 µg cm⁻³ van 90 % en een adsorptie van 90 % moet de beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemonster bij voorkeur 1 µg 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 cm³ aan 45 cm³ geëquilibreerde 0,01 M CaCl₂-oplossing (=10 % van de stockoplossing t.o.v. het totaalvolume van de waterfase van 50 cm³), moet de concentratie van de stockoplossing 10 µg 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 bodemonster 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 bodemonster; 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 (bv. 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 parallelle methode en b) de seriële methode. Met nadruk moet worden gesteld dat de parallelle methode weliswaar experimenteel omslachtiger is, maar dat de mathematische behandeling van de resultaten eenvoudiger is (zie aanhangsel 5). De keuze van de gevolgde methode wordt echter aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

- a) Parallelle 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 filtreren 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 wordt op elk tijdstip t_i berekend op basis van de nominale beginconcentratie en de gemeten concentratie op het bemonsteringstijdstip t_i en gecorrigeerd voor de waarde van de blanco-bepaling. De A_t wordt uitgezet tegen de tijd (zie figuur 1 in aanhangsel 5) om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt ⁽¹⁾. 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 aanhangsel 5.

1.9.2.2. Bepaling van de evenwichtstijd voor adsorptie en de bij evenwicht geadsorbeerde hoeveelheid teststof

Zoals reeds is vermeld, kan aan de hand van curves waarin A_t 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 aanhangsel 5 zijn voorbeelden van dergelijke curves. De evenwichtstijd 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 geëxtrapoléerd, 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.

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

⁽¹⁾ 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 aanhangsel 5).

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 ten minste 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.

1.9.3. 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 behoeft te worden herhaald.

Op basis van de resultaten van het voorbereidend onderzoek worden de equilibratietijd, de verhouding bodemonster/oplossing, het gewicht van het bodemonster, het volume van de waterfase in contact met het bodemonster 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 bodemonster en één oplossing) wordt ten minste in duplo uitgevoerd om de spreiding van de resultaten te kunnen bepalen. In elk experiment wordt één blanco-bepaling opgenomen. Daarbij worden dezelfde massa bodemonster 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 bodemonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen om onverwachte afwijkingen te kunnen constateren.

Het adsorptiepercentage wordt op elk tijdstip (A_t) en/of over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t}$) 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-50 ⁽¹⁾ (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 bodemonster/oplossing, d.w.z. 1:1, wordt gebruikt. In dit geval wordt een analyse van beide fasen, zowel bodem als oplossing, aanbevolen.

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 bodemonster/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).

1.9.4. Fase 3: Adsorptie-isothermen en desorptiekinetiek/desorptie-isothermen

1.9.4.1. 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 evenwichtsconcentraties in de waterfase. Per bodemonster 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

⁽¹⁾ DT-50: tijd waarin 50 % van de teststof wordt afgebroken.

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 bodemonmonster 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).

1.9.4.2. 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 praktijksituatie 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 desorptieonderzoek 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 desorptiekinetiekexperiment: a) de parallelle methode en b) de seriële methode. De keuze van de gevolgde methode wordt aan de experimenter overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

- Parallelle methode: voor elk bodemonmonster waarvoor het desorptieonderzoek 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 adsorptiekinetiekexperiment 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 CaCl_2 -oplossing (zonder teststof) als bij het experiment. Een controlemonster met de teststof in 0,01 M CaCl_2 -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 CaCl_2 -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.
- 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 CaCl_2 -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 CaCl_2 -oplossing en vervolgens wordt het schudden hervat tot het volgende analysetijdstip.

Het desorptiepercentage wordt op elk tijdstip (D_t) en/of over elk tijdsinterval ($D_{\Delta t}$) 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 aanhangsel 5.

Resultaten van het desorptiekinetiek-experiment

Door het desorptiepercentage D_t en het adsorptiepercentage A_t in één figuur tegen de tijd uit te zetten, kan de omkeerbaarheid van het adsorptieproces worden bepaald. Als het desorptie-evenwicht zich binnen uiterlijk tweemaal de evenwichtstijd voor de adsorptie instelt en in totaal meer dan 75 % van de geadsorbeerde hoeveelheid wordt gedesorbeerd, wordt de adsorptie als reversibel beschouwd.

1.9.4.3. Desorptie-isothermen

Desorptie-isothermen volgens Freundlich worden bepaald voor de bodemmonsters 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 bodemmonster geadsorbeerd blijft, wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof in de oplossing (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage en aanhangsel 5).

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

De analysegegevens worden in de vorm van tabellen weergegeven (zie aanhangsel 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 bodemmonster/oplossing kan in eenheden g/g of g/vol met hetzelfde getal worden weergegeven.

2.1. ADSORPTIE

De 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:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

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).

Aanhangsel 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.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

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:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \frac{V_0}{m_{soil}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (6)$$

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:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

De adsorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

of in de lineaire vorm:

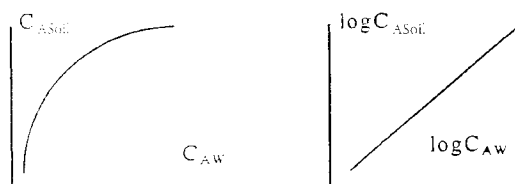
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

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 bodemonmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd):

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

Hierbij is:

MB = massabalans (%);

m_E = totale hoeveelheid teststof die in twee stappen uit het bodemonmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd (μg);

C_0 = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemonmonster 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:

$$D_t = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

Hierbij is:

D_{t_i} = desorptiepercentage op het tijdstip t_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa van de uit het bodemonmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip t_i (μg);

$m_s^{des}(eq)$ = massa van de bij adsorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerde teststof (μg).

Aanhangsel 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:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

Hierbij is:

K_{des} = desorptiecoëfficiënt ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totale massa van de bij desorptie-evenwicht uit het bodemonmonster gedesorbeerde teststof (μg);

V_T = totaalvolume van de waterfase die tijdens de desorptiekinetiektest in contact met het bodemonmonster is (cm^3).

In aanhangsel 5 worden in het hoofdstuk „Desorptie” richtsnoeren gegeven voor de berekening van $m_{aq}^{des}(eq)$.

Opmerking

Als de adsorptietest volgens de parallele 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 bodemonster 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 bodemonster geadsorbeerd blijft, als volgt berekend:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ wordt gedefinieerd als:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \quad (14)$$

Hierbij is:

$C_s^{des}(eq)$ = gehalte aan de teststof dat bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonster geadsorbeerd blijft ($\mu g g^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = 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);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^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:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

of in de lineaire vorm:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

Hierbij is:

K_F^{des} = de desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich;

n = de regressieconstante;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = de massaconcentratie van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht ($\mu g cm^{-3}$).

De vergelijkingen 16 en 17 kunnen worden uitgezet en 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 desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich (K_F^{ads} respectievelijk K_F^{des}) gelijk aan de adsorptie- of desorptie-evenwichtsconstante (K_d respectievelijk $K_{d,eq}$) 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 testverslag 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, enz.),
 - diepte van monsterneming,
 - zand/silt/klei-gehalte,
 - pH-waarden (in 0,01 M CaCl₂),
 - 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 (aanhangsel 6) en grafische afbeeldingen;
- alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de testresultaten.

3. REFERENTIES

- (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) Fränze 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), pp. 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 Schiefferstein R. H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. Weeds, 13, pp. 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, pp. 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, pp. 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) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 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, pp. 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, pp. 961-971.
- (25) Osgerby J. M., (1973), 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.
- (26) Guth J. A., (1972), 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem. Heft 37, pp. 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, pp. 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. 1, pp. 49-143.

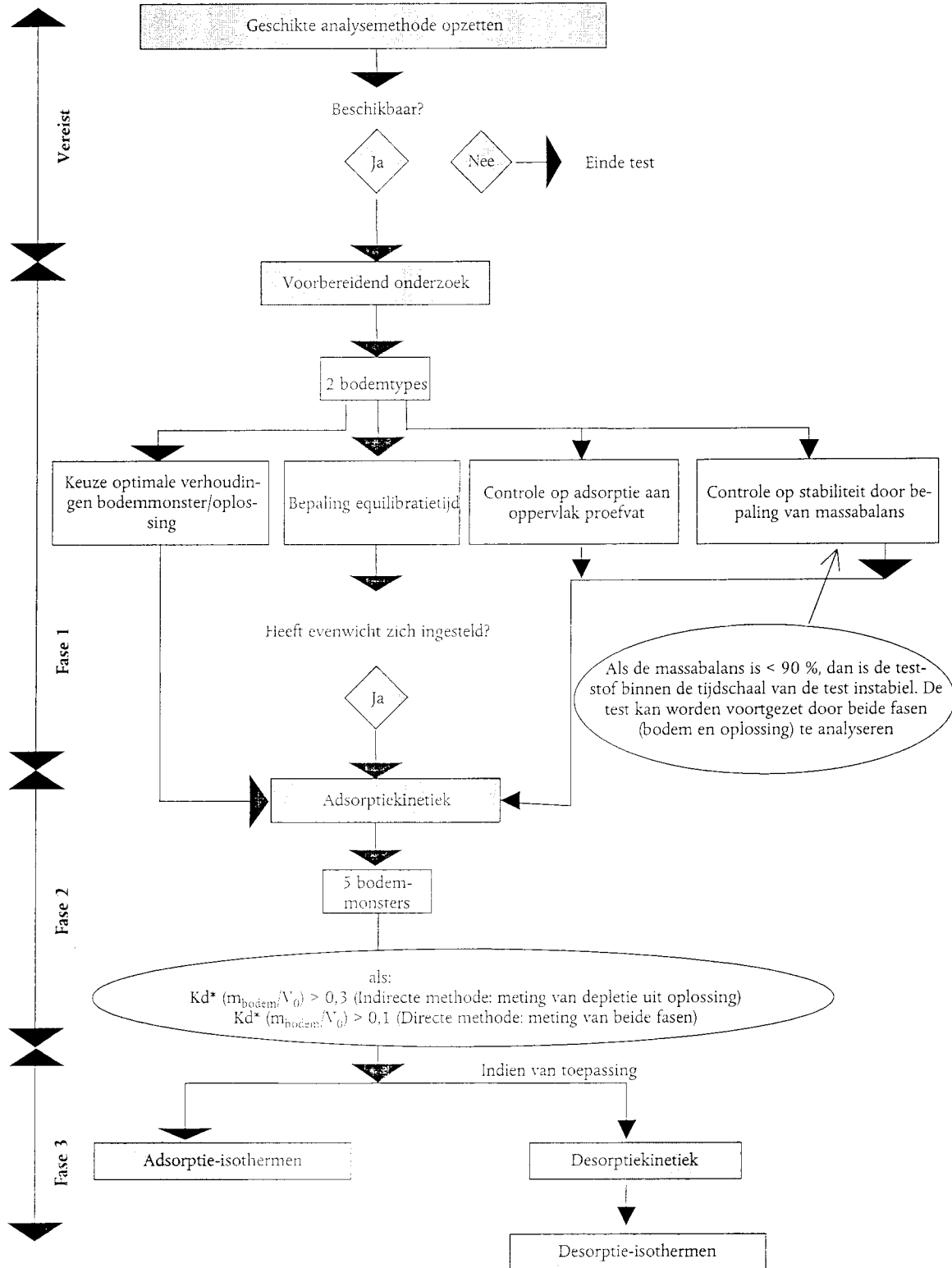
- (30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981). 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system'. *Pestic. Sci.* 12, pp. 37-44.
- (31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), 'Potential 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), pp. 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, pp. 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, pp. 389-395.
- (35) Green R. E., and Karickhoff S. W., (1990), 'Sorption estimates for modeling', in *Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2*, pp. 80-101,
- (36) Lambert S. M., (1967). 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. *J. Agri. Food Chem.*, 15, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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: pp. 222-234.
- (43) Karickhoff S. W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. *Chemosphere* 10, pp. 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, pp. 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: pp. 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, pp. 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, pp. 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.*, pp. 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, pp. 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, pp. 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), pp. 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), pp. 227-231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 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), pp. 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, pp. 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, pp. 38-42.
- (72) Karickhoff S. W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833-846.
- (73) Moreale A., van Biadel R., (1981), 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité'. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319-322.
- (74) Müller M., Kördel W. (1996). 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil'. *Chemosphere*, 32(12), pp. 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), pp. 1373-1384.

- (76) K rdel 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), pp. 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, pp. 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.*, pp. 3973-93.
- (82) Calvet R., Terc  M., and Arvien J. C., (1980), 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caract ristiques g n rales de l'adsorption'. *Ann. Agron.* 31: pp. 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, UK.
- (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).

AANHANGSEL 1

TESTSCHEMA



AANHANGSEL 2

INVLOED VAN DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ANALYSEMETHODE EN DE
CONCENTRATIEVERANDERING OP DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ADSORPTIERESULTATEN

Uit onderstaande tabel (84) blijkt duidelijk dat wanneer het verschil tussen de aanvankelijke massa ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) 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 evenwichtconcentratie leidt tot een fout van 50 % bij de 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: $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
Volume van de oplossing: $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

| | $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg) | $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$) | R | $(m_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg) | $C_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$) | R^{\dagger} | K_d^* | R^{\dagger} |
|--|--|--|-------------|---|---|---------------|---------|---------------|
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ 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 % |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ 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 % |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ 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 % |

waarin:

$$*m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{(m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) V_0)}{m_{\text{bodem}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{bodem}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 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^{\dagger} = fout in berekening ten gevolge van de analysefout R.

SCHATTINGSTECHNIEKEN 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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

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 tegensrijdig.
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 ureumverbindingen | $\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$ | Briggs (1981) (39) |
| Gechloroerde aromaten | $\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$ | Chiou et al (1983) (65) |
| Uiteenlopende pesticiden | $\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$ | Gerstl en Mingelgrin (1984) (66) |
| Aromatische koolwaterstoffen | $\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$ | Vowles en Mantoura (1987) (67) |

Tabel 2. Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de oplosbaarheid in water; zie voor andere voorbeelden (68) en (69).

| Verbindingen | Correlaties | Auteurs |
|-----------------------------------|---|----------------------------------|
| Uiteenlopende pesticiden | $\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$ | Gerstl en Mingelgrin (1984) (66) |
| Gechloroerde alifaten en aromaten | $\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$ | Chiou et al. (1979) (70) |
| α -Naftol | $\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$ | Hasset et al. (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) |

AANHANGSEL 4

BEREKENINGEN VOOR DE BEPALING VAN DE CENTRIFUGEEROMSTANDIGHEDEN

1. Voor de centrifugeertijd geldt, uitgaande van ronde deeltjes, de volgende formule:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Ter vereenvoudiging worden alle parameters in niet-SI-eenheden (g, cm) beschreven.

Hierbij is:

ω = rotatiesnelheid (= $2 \pi \text{ rpm}/60$) 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 $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

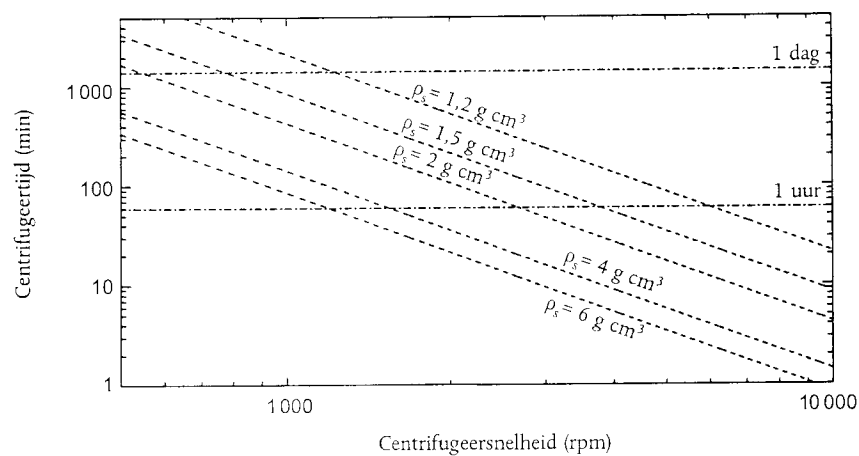
In dat geval geldt voor de centrifugeertijd:

$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

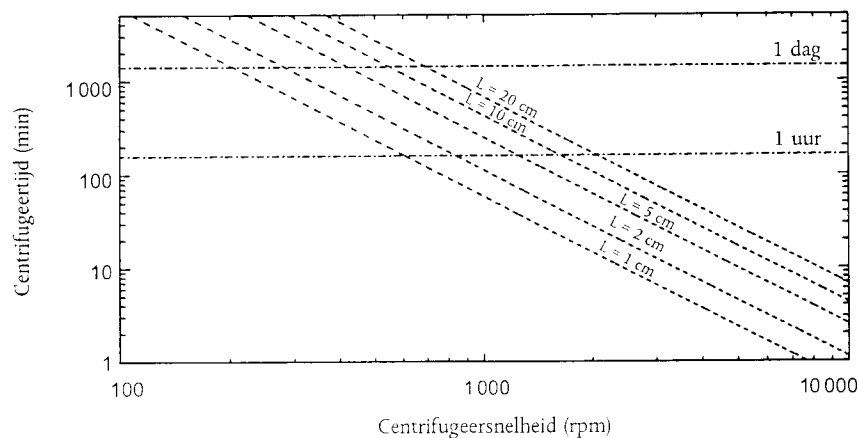
3. Uit vergelijking (2) blijkt dat voor een scheiding van deeltjes met een specifieke grootte (in ons geval een straal van 0,1 μm) twee parameters belangrijk zijn bij de bepaling van de centrifugeeromstandigheden (tijd en snelheid): 1. de dichtheid van het bodemmonster en 2. de hoogte van het mengsel 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 zeven minuten bij een hoogte van 1 cm. Het is echter belangrijk dat er een optimaal compromis wordt gevonden tussen zo kort mogelijk centrifugerend en optimaal gebruiksgemak bij de scheiding van de fasen na het centrifugerend.

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 ultrafiltratiefaciliteiten, 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 $60\,000 \text{ rpm}$ of ultrafiltratie met een porositeit van $100\,000 \text{ Dalton}$ 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). $R_c = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_c = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bij $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

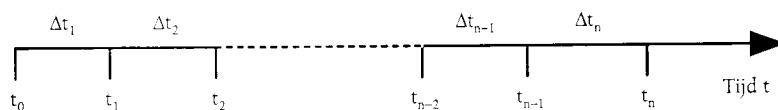


Figuur 1b: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis ($R_c - R_b = L$; $R_c = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bij $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

AANHANGSEL 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:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1) \quad (1)$$

De factoren in deze vergelijking worden als volgt berekend:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

Hierbij is:

A_{t_i} = adsorptiepercentage (%) op het tijdstip t_i

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa van de aan het bodemmonster 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)

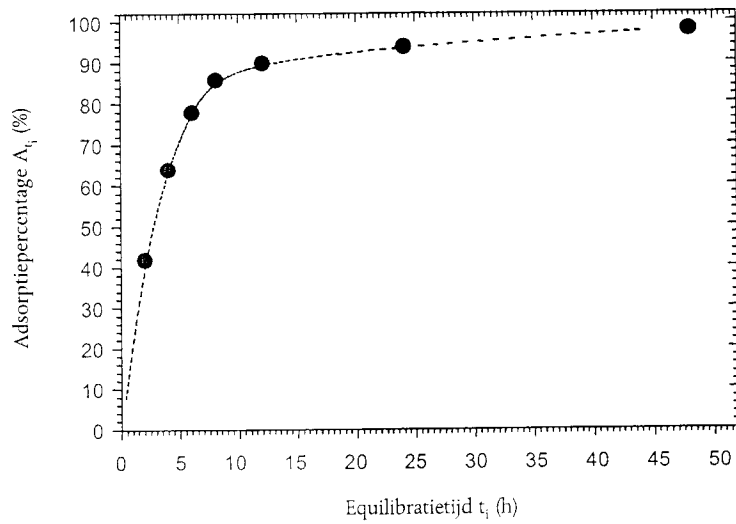
C_0 = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip $t = 0$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = 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 blancobepaling

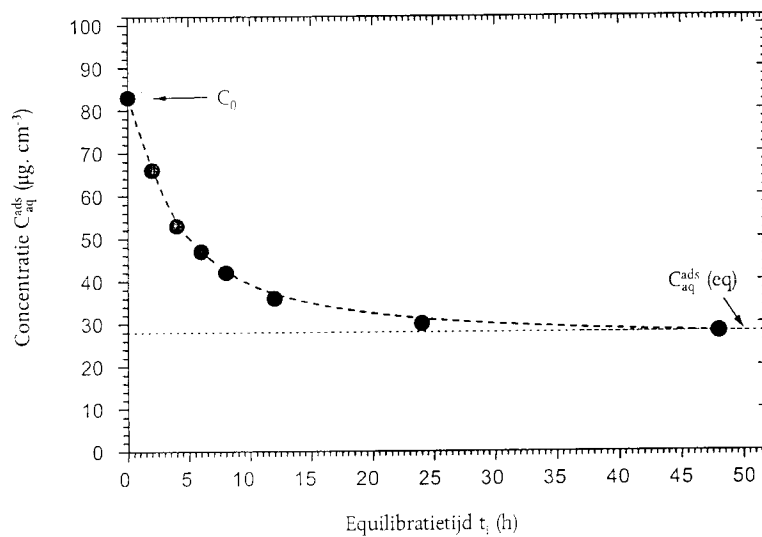
V_0 = volume van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip $t = 0$ (cm^3).

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.

(1) 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 bodemonster wordt geadsorbeerd, wordt als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\Delta t_1}^{ads} = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— voor het tweede tijdsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\Delta t_2}^{ads} = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— voor het derde tijdsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— voor het n^e tijdsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Het adsorptiepercentage over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t_i}$) wordt berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (8) \text{ (1)}$$

terwijl het adsorptiepercentage op het tijdstip t_i (A_{t_i}) wordt berekend met de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (9) \text{ (1)}$$

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:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10) \text{ (1)}$$

— is de massa van de teststof in de oplossing:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11) \text{ (1)}$$

— en is het adsorptiepercentage bij evenwicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (12) \text{ (1)}$$

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 op het tijdstip 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 (%)

(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.

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_i^1) en wordt de gedesorbeerde massa berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_i^1} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad (13)$$

Bij het desorptie-evenwicht is $t_i = t_{\text{eq}}$ en derhalve $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$.

De massa van de gedurende een tijdsinterval (Δt_i) gedesorbeerde teststof is:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Het desorptiepercentage wordt berekend:

— op een tijdstip t_i met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (15)$$

— en gedurende een tijdsinterval (Δt_i) met de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (16)$$

Hierbij is:

D_{t_i} = desorptiepercentage op een tijdstip t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = desorptiepercentage over een tijdsinterval Δt_i (%)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = massa van de op een tijdstip t_i gedesorbeerde teststof (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$ = massa van de gedurende een tijdsinterval Δt_i gedesorbeerde teststof (μg)

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = analytisch bepaalde massa van de teststof in een op een tijdstip t_i voor analyse genomen volumeloplossing V_i^1 (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_i^1 = 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 of $D_{\Delta t}$ (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 bodemonmonster (V_T) gedurende het desorptiekinetiek-experiment constant blijft en wordt gegeven door de vergelijking:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

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:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- 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 wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_t = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (20)$$

Over een tijdsinterval (Δt_i):

Over elk tijdsinterval wordt de hoeveelheid gedesorbeerde stof als volgt berekend:

- voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_m^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad \text{en} \quad m_s^{\text{des}}(t_1) = m_s^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- voor het tweede tijdsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad \text{en}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_2) = m_s^{\text{aq}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

- voor het n^{e} tijdsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_m^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right] \quad \text{en}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_n) = m_s^{\text{aq}}(\text{eq}) - \sum_{i=1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

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 bodemonster 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 gedesorbeerd gedurende de tijdsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg)

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1), m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2), \dots, m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n)$ = 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 bodemonster is (cm^3)

m_{aq}^{A} = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht (μg)

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{a}}^{\text{A}}(i) \right) - V_{\text{R}}}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{a}}^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

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).

$$v_{\text{a}}^{\text{D}} \leq 0,02 \cdot V_{\text{T}} \quad (27)$$

AANHANGSEL 6

ADSORPTIE/DESORPTIE IN DE BODEM: RAPPORTAGEFORMULIEREN

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur):%

Temperatuur:°C

Geschiktheid van de analysemethode

| | | |
|--|---------------------|--|
| Gewicht bodemmonster | g | |
| Droge massa in bodemmonster | 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

Gevolgd analysemethodologie: Indirect Parallel Serieel

Direct

Adsorptietest: testmonsters

| | Symbol | Eenheid | 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_i | % | | | | | |
| | A_{Σ} | % | | | | | |
| Gemiddelde | | | | | | | |
| Adsorptie | K_d | cm ³ g ⁻¹ | | | | | |
| Gemiddelde | | | | | | | |
| Adsorptie | 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 | $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ | 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 | µg | | | | |
| 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 stockoplossing | | cm ³ | | | | | | | | |
| Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster (berekend) | V_0 | cm ³ | | | | | | | | |
| Concentratie oplossing | C_0 | µg cm ⁻³ | | | | | | | | |
| Equilibratietijd | — | uur | | | | | | | | |

Na schudden en centrifugeren

| | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco | $C_{aq}^{ads} (eq)$ | µg cm ⁻³ | | | | | | | | |
| Temperatuur | | °C | | | | | | | | |
| Massa geadsorbeerde teststof per eenheid bodemmonster | $C_s^{ads} (eq)$ | µg g ⁻¹ | | | | | | | | |

Regressie-analyse:

Waarde van: K_d^{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

Gevolgd analysemethodologie: Indirect Parallel Serieel

Desorptietest

| | Symbol | Eenheid | Tijdsinterval | Tijdsinterval | Tijdsinterval | Tijdsinterval |
|--|------------------|----------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| Buis nr. 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 SM | V_0 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_r^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: Seriele 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 sorptiegedrag 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 $ml \cdot g^{-1}$. K_d kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen en concentratieafhankelijk zijn.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

Hierbij is:

C_{soil} = concentratie van de teststof in de bodem bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{sludge} = concentratie van de teststof in slib bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

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 $\mu g \cdot g^{-1}$ 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 ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

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.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (dimensieloos of ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{) of } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

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

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{aq}}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

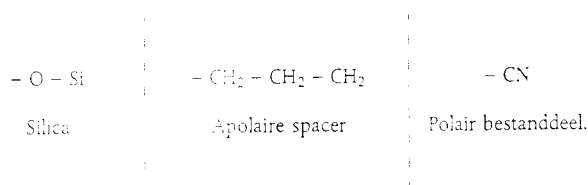
1.3. REFERENTIESTOFFEN

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 teststof-waarde 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 sorptiegedrag. 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 (bijv. 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 kan worden 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 (bijv. trifluralin, 4-chlooraniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naftylamine);
- aromatische carbonzuren esters (bijv. benzoëzure methylester, 3,5-dinitrobenzoëzure ethylester);
- aromatische koolwaterstoffen (bijv. toluen, xyleen, ethylbenzeen, nitrobenzeen);
- aryloxyfenoxypropionzuren esters (bijv. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);
- schimmelwerende middelen, benzimidazol en imidazol (bijv. carbendazim, fuberidazol, triazoxide);
- carbonzuren amiden (bijv. 2-chloorbenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide);
- chloorkoolwaterstoffen (bijv. endosulfan, DDT, hexachloorbenzeen, quintozeen, 1,2,3-trichloorbenzeen);
- organofosfor-insecticiden (bijv. azinfos-methyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos);
- fenolen (bijv. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachloorfenol, 2,4,6-trichloorfenol, 1-naftol);
- fenylureumderivaten (bijv. isoproturon, monolinuron, pencyuron);
- pigmentkleurstoffen (bijv. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

- polyaromatische koolwaterstoffen (bijv. acenafteen, naftaleen);
- 1,3,5-triazine-herbiciden (bijv. prometryn, propazin, simazin, terbutryn);
- triazoolderivaten (bijv. 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 (bijv. vorming van clustercomplexen met kleimineralen). Het is mogelijk dat de methode niet werkt bij oppervlakteactieve 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 elf 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 is 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 (bijv. 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 uitprobeerde, 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, verschijnselen die zich kunnen voordoen bij sommige organische fase/buffer-mengsels, moeten worden voorkomen.

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 iken 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

Gebleden 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 natriumnitrat. 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 geïkt teneinde rekening te kunnen houden met onvoorziene veranderingen in de prestaties van de kolom. Het verdient de voorkeur de ikinjecties 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 in de tabellen 1 en 3 van het aanhangsel vermelde $\log K_{oc}$ -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, bijv. type en maat van analysekolom en voor-kolom, 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;
- gemiddelderetentiegegevens 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, Chap. 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, pp. 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, pp. 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. *J. Environm. Sci. Health*, B19, pp. 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, pp. 831-832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pp. 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), pp. 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pp. 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), pp. 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, pp. 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), pp. 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 |
| Acetanilide | 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), blz. 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), blz. 107-119.

TABEL 2

Resultaten van een vergelijkende laboratoriumtest (elf laboratoria) verricht ter verbetering en validatie van de HPLC-methode ⁽¹⁾

| 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), blz. 1373-1384.

TABEL 3
Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-screeningsmethode op basis van bodemadsorptiegegevens

| Referentiestof | CAS-nr. | Gemiddelde log K_{oc} -waarden van batchevenwicht | 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) |
| Methylbenzoaat | 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 | 4,89 | 4 | 4,46 | (^a) |
| | 12270-13-2 | | | | |
| DDT | 50-29-3 | 5,63 | 1 | — | (^b) |

(^a) W. Kordel, 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. Kordel, W. Klein, (1981). Chemosphere, 22, blz. 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. EC₅₀, EC₂₀ of EC₁₀).

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 acutetoxiciteitstest (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 bekers.

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 standieren 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 drie 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 aanhangsel 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).

In geval 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 „klaarlijkkelijke 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 dan 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 dispergeermiddelen 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, dime-thylformamide en triëthyleenglycol. Voorbeelden van geschikte dispergeermiddelen 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.

Dispergeermiddelen 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 dispergeermiddelen 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 tien 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 tien dieren afzonderlijk gehouden bij elke testconcentratie en ten minste tien dieren afzonderlijk gehouden in de controlereeks.

Wat doorstroomtests betreft is gebleken dat een aantal van 40, in vier groepen van tien 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 aanhangsel 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 celd aantal (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 $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

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 op verdeling gerichte 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 verversd 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. drie dagen), moet worden overwogen het medium vaker te verversen of gebruik te maken van een doorstroomtest.

Wanneer het medium wordt verversed 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 de aanhangsels 3 en 4). Indien er nog andere metingen gedaan moeten worden (zie de punten 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 $\pm 20\%$ van de nominale waarde zal blijven (d.w.z. binnen het bereik van 80-120 %, zie de punten 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 $\pm 20\%$ 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 $\pm 20\%$ 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 doorstromingstests is een gelijksoortige monstermethode van toepassing als bij semi-statische tests (met dien verstande dat de meting van 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 aanhangsel 5).

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1. VERWERKING VAN DE RESULTATEN

Het 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 variantie-analyse (ANOVA). Vervolgens moet per concentratie het gemiddelde worden vergeleken met het controlegemiddelde aan de hand van een geschikte meervoudigevergelijkingsmethode. 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 zoals 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 referentie 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 aangekend 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 cultuuromstandigheden. 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 aanhangsel 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 aanhangsel 3).
- De volledige gegevens over de levende nakomelingen per moederdier (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 3).
- Sterftecijfer onder de moederdieren en de dag(en) waarop de sterfte plaatsvond (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 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 EC₅₀ betreffende de voortplanting en betrouwbaarheidsintervallen en een grafiek van het voor de berekening daarvan gehanteerde model, de helling van de dosis-responscurve 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. **REFERENTIES**

- (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, blz. 257-265.
- (4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, blz. 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, blz. 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. Copenhagen 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, blz. 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), blz. 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, blz. 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, blz. 459-466.
- (14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, blz. 1096-1121.
- (15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, blz. 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, blz. 103-117.
- (17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, blz. 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, blz. 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*. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, blz. 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, blz. 1156-1166.

AANHANGSEL I

BEREIDING VAN VOLLEDIG BESCHREVEN MEDIA ELENDT M7 EN M4

Acclimatisering aan Elendt M7- en Elendt M4-media

Sommige laboratoria hebben problemen ondervonden bij het rechtstreeks overbrengen van Daphnia in M4- (I) 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 Na₂EDTA- als de FeSO₄-oplossingen worden enkelvoudig bereid, samengebracht en onmiddellijk met een autoclaaf gesteriliseerd. Hiermee wordt verkregen:

| | | | | |
|----------------------|--|-------|------|-----|
| 21 Fe-EDTA-oplossing | | 1 000 | 20,0 | 5,0 |
|----------------------|--|-------|------|-----|

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 sporelementen | | 20 | 50 | 50 |

Macro-nutriëntstamoplossingen

| | | | | |
|---|---------|--------|-----|-----|
| 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.

NB: 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.

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, blz. 25-33.

AANHANGSEL 2

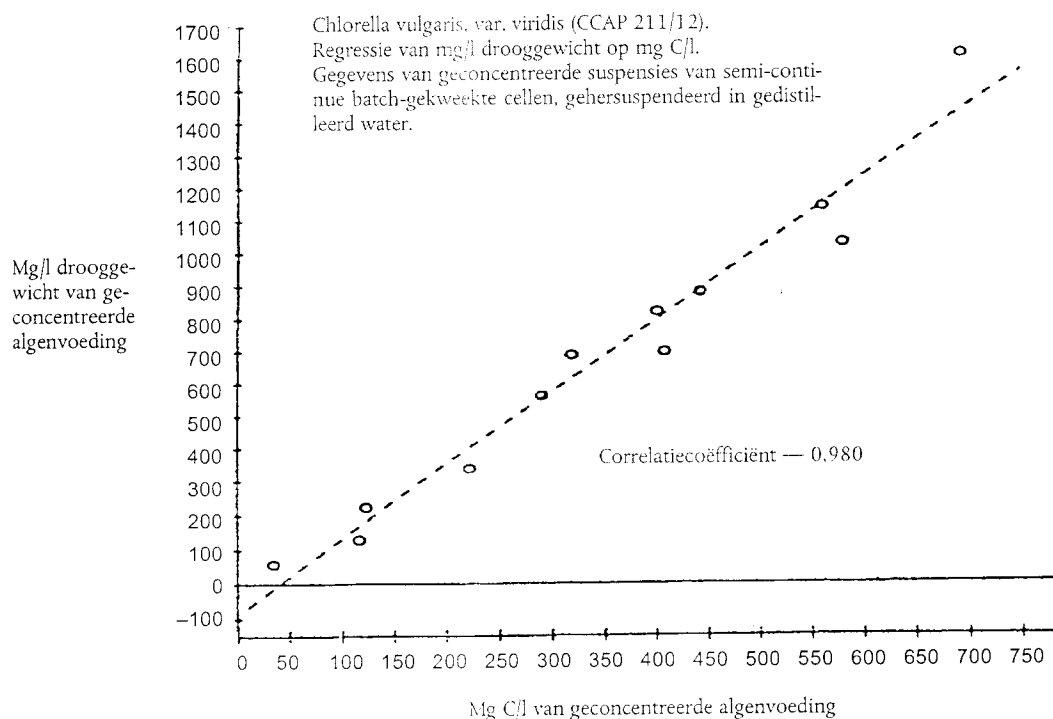
TOTALE ORGANISCHE KOOLSTOF (TOC) ANALYSE EN OPSTELLING VAN EEN NOMOGRAFIE VOOR TOC-GEHALTE VAN ALGENVOEDING

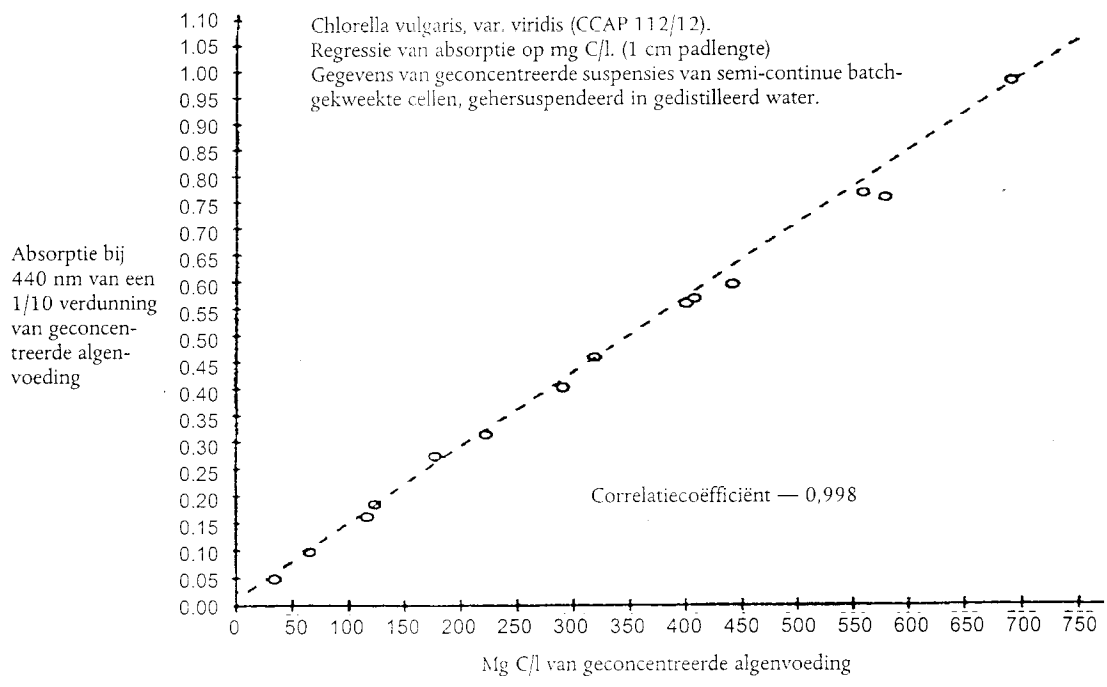
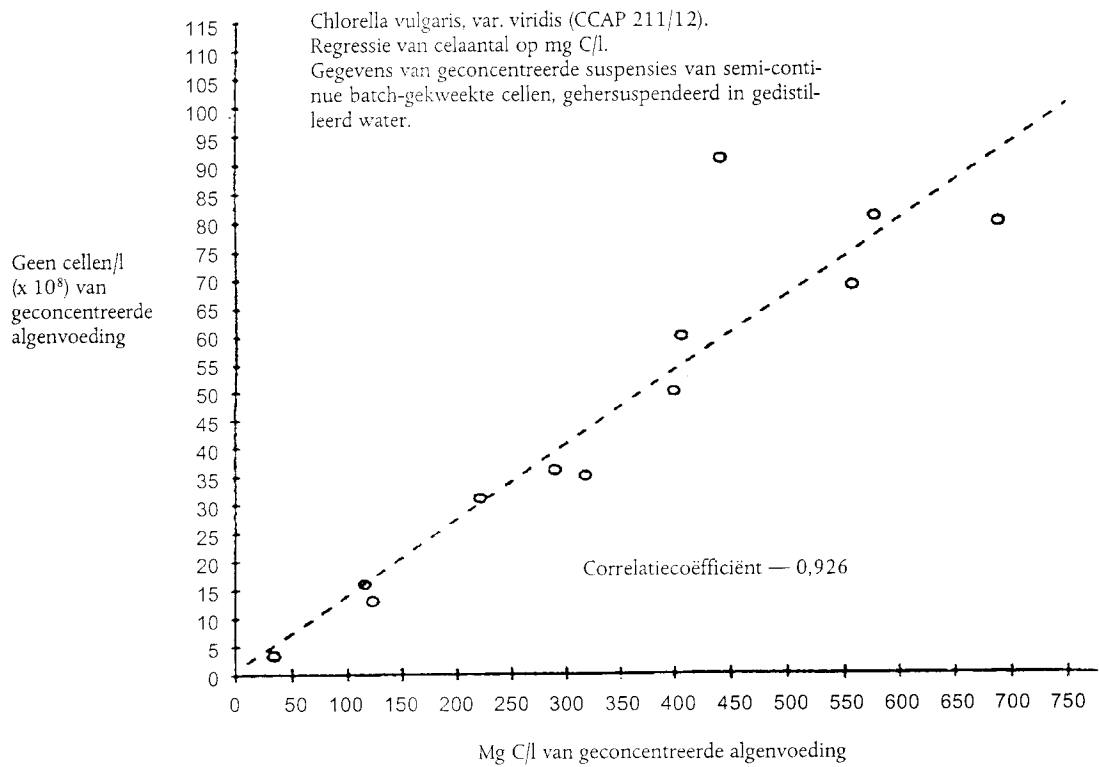
Normaal gesproken wordt het koolstofgehalte van de algenvoeding niet rechtstreeks gemeten, maar afgeleid uit correlaties (d.w.z. nomografieën) met alternatieve middelen zoals algencelaantal of lichtabsorptie. De TOC moet worden gemeten via hogetemperatuuroxidatie en niet met methoden op basis van UV 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.

NB: Deze grafieken mogen niet worden gebruikt voor conversiedoeleinden; het is van wezenlijk belang dat laboratoria hun eigen nomografieën opstellen.





AANHANGSEL 3

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN MEDIUMVERSIJNG, FYSISCH-CHEMISCHE CONTROLEGEDEVEN, VOEDING, DAPHNIA-VOORTPLANTING EN MORTALITEIT VOLWASSEN DIEREN

| Experiment nr.: | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | Nominale concentratie: | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------|--------|
| Dag | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mediumversiering (aangeven) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PH (°) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Nieuw |
| O ₂ mg/l (°) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Oud |
| Temp (°C) (°) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Nieuw |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Oud |
| Voeding gegeven (aangeven) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aantal levende nakomelingen (°) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Totaal |
| Vat 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cumulative mortaliteit volwassen dieren (°) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Totaal |

(°) Aangeven welk vat voor het experiment werd gebruikt.

(°) Niet-uitgekomen eitjes aangeven als „AB” in het desbetreffend hokje.

(°) Eventuele mortaliteit van volwassen dieren aangeven als „M” in het desbetreffend hokje.

AANHANGSEL 4

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN RESULTATEN CHEMISCHE ANALYSE

a) **Gemeten concentraties**

| Nominale concentratie | Monster week 1 | | Monster week 2 | | Monster week 3 | |
|--------------------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|
| | Vers | Oud | Vers | Oud | Vers | Oud |
| | | | | | | |

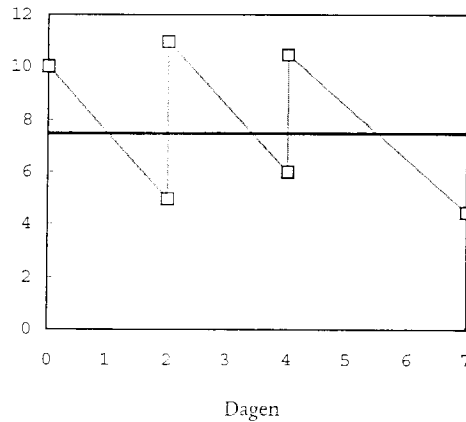
b) **Gemeten concentraties als percentage van nominale concentratie**

| Nominale concentratie | Monster week 1 | | Monster week 2 | | Monster week 3 | |
|--------------------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|
| | Vers | Oud | Vers | Oud | Vers | Oud |
| | | | | | | |

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 zeven 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 zes vierkantjes geven de waargenomen concentraties weer zoals gemeten aan het begin en het 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 |
| | | | | | | Tijdgewogen gemiddelde | 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 exponentiele kromme voor elke verversingsperiode. Het wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

$$\text{Oppervlak} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{dagen}$$

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 achteruitgangproces 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 achteruitgangproces 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.