I

(Rättsakter som antagits i enlighet med EG- och Euratomfördragen och som ska offentliggöras)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 761/2009

av den 23 juli 2009

om ändring, för anpassning till tekniska framsteg, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG [1], särskilt artikel 13.3, och

av följande skäl:

(1) Kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 [2] innehåller testmetoderna för bestämning av ämnens fysikalisk-kemikaliska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet för de syften som avses i förordning (EG) nr 1907/2006.

(2) Förordning (EG) nr 440/2008 måste uppdateras genom att det görs ändringar av vissa testmetoder och införs flera nya testmetoder som antagits av OECD. Berörda parter har rådfrågats angående detta förslag. Genom dessa ändringar anpassas de berörda metoderna till vetenskapliga och tekniska framsteg.

(3) Bestämmelserna om ångtryck bör revideras så att den nya effusionsmetoden införs.

(4) Det måste läggas till en ny metod för mätning av fibrers längdviktade geometriska medeldiameter.

(5) Förordning (EG) nr 440/2008 bör uppdateras så att det med prioritet införs en ny in vitro-testmetod för hudirritation så att färre försöksdjur behöver användas, i enlighet med rådets direktiv 86/609/EEG av den 24 november 1986 om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål [3]. Även om ett utkast till in vitro-testmetod för hudirritation fortfarande diskuteras inom OECD är det lämpligt att i detta särskilda fall inkludera metod B 46 i den här förordningen. Metod B 46 bör uppdateras så snart som möjligt efter det att en överenskommelse nåtts inom OECD eller om ytterligare information som motiverar en revidering blir tillgänglig.

(6) Det är nödvändigt att revidera bestämmelserna om test av tillväxthämning på alger så att ytterligare arter inbegrips och så att kraven beträffande riskbedömning och klassificering av kemikalier uppfylls.

(7) Det måste läggas till en ny metod för mätning av aerob mineralisering i ytvatten, genom ett simuleringstest av biologisk nedbrytbarhet, och en ny metod för bedömning av toxiciteten för släktet Lemna, genom ett tillväxthämningstest.

[1] EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

[2] EUT L 142, 31.5.2008, s. 1.

[3] EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

(8) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.

(9) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats enligt artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras på följande sätt:

1. Del A ska ändras på följande sätt:

   a) Kapitel A.4 ska ersättas med kapitel A.4 i bilaga I till denna förordning.

   b) Kapitel A.22 i bilaga II till denna förordning ska läggas till.

2. Del B ska ändras på följande sätt:

   Kapitel B.46 i bilaga III till denna förordning ska läggas till.

3. Del C ska ändras på följande sätt:

   a) Kapitel C.3 ska ersättas med kapitel C.3 i bilaga IV till denna förordning.

   b) Kapitlen C.25 och C.26 i bilagorna V och VI till denna förordning ska läggas till.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 23 juli 2009.

På kommissionens vägnar
Stavros DIMAS
Ledamot av kommissionen

BILAGA I

A.4 **ÅNGTRYCK**

1. **METOD**

Den här metoden motsvarar OECD TG 104 (2004).

1.1 INLEDNING

Den här ändrade versionen av metod A.4 (1) omfattar ytterligare ett sätt att bestämma ångtrycket: Effusionsmetod: isoterm termogravimetri, avsedd för ämnen med mycket lågt ångtryck (ned till 10^{-10} Pa). Med tanke på behovet av metoder, i synnerhet för att bestämma ångtrycket hos ämnen med lågt ångtryck, pågår en förnyad utvärdering av andra varianter av denna metod för att se inom vilka ångtrycksintervall de kan användas.

Vid termodynamisk jämvikt beror ångtrycket hos ett rent ämne endast på temperaturen. De grundläggande principerna beskrivs i referenslitteraturen (2)(3).

Det finns inte någon mätmetod som kan användas inom hela ångtrycksintervallet, dvs. från mindre än 10^{-10} upp till 10^5 Pa. I det här dokumentet beskrivs därför åtta olika metoder för mätning av ångtrycket som kan användas inom olika ångtrycksintervall. I tabell 1 jämförs de olika metodernas tillämpnings- och mätområde. Metoderna kan endast användas för föreningar som inte sönderdelas under de rådande försöksbetingelserna. Om det av tekniska skäl inte är möjligt att använda någon av de experimentella metoderna är det också möjligt att uppskatta ångtrycket. En lämplig uppskattningsmetod beskrivs i tillägget.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Ett ämnes ångtryck definieras som mättnadstrycket över ett fast eller flytande ämne.

SI-enheten för tryck, som är pascal (Pa), ska användas. Nedan anges andra enheter, som använts tidigare, samt deras omvandlingsfaktorer:

1 Torr = 1 mm Hg = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmosfär = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

SI-enheten för temperatur är kelvin (K). För att omvandla temperaturen i celsiusgrader till kelvin används följande formel:

$T = t + 273{,}15$

där T är temperaturen i kelvin (den termodynamiska temperaturen) och t är temperaturen i celsiusgrader.

Tabell 1

Mätmetod	Ämnen		Uppskattad repeterbarhet	Uppskattad reproducerbarhet	Rekommenderat intervall
	Fasta	Flytande			
Dynamisk metod	Lågsmältande	Ja	upp till 25 % 1–5 %	upp till 25 % 1–5 %	10^3 Pa till 2×10^3 Pa 2×10^3 till 10^5 Pa
Statisk metod	Ja	Ja	5–10 %	5–10 %	10 Pa till 10^5 Pa 10^{-2} Pa till 10^5 Pa (1)
Isoteniskopisk metod	Ja	Ja	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa till 10^5 Pa

Mätmetod	Ämnen		Uppskattad repeterbarhet	Uppskattad reproducerbarhet	Rekommenderat intervall
	Fasta	Flytande			
Effusionsmetod: ångtrycksjämvikt	Ja	Ja	5–20 %	upp till 50 %	10^{-3} till 1 Pa
Effusionsmetod: Knudsencell	Ja	Ja	10–30 %	—	10^{-10} till 1 P
Effusionsmetod: isoterm termogravimetri	Ja	Ja	5–30 %	upp till 50 %	10^{-10} till 1 Pa
Gasmättnadsmetod	Ja	Ja	10–30 %	upp till 50 %	10^{-10} till 10^{3} Pa
Rotormetod	Ja	Ja	10–20 %	—	10^{-4} till 0,5 Pa

(1) Vid användning av en kapacitansmanometer.

1.3 TESTPRINCIP

Ångtrycket bestäms vanligen vid olika temperaturer. Enligt den förenklade Clapeyron-Clausius-ekvationen är logaritmen av ångtrycket för ett rent ämne en linjär funktion av den inverterade termodynamiska temperaturen inom ett begränsat temperaturintervall.

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + konstant$$

där:

p = ångtrycket i pascal

ΔHv = ångbildningsvärmet i J mol^{-1}

R = den allmänna gaskonstanten, dvs. 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperaturen i K

1.4 REFERENSSUBSTANSER

Det är i regel inte nödvändigt att använda referenssubstanser. De behöver endast användas då och då för att kontrollera metodens prestanda och för att möjliggöra resultatjämförelser mellan olika metoder.

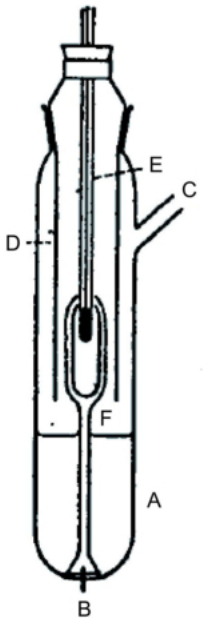
1.5 METODBESKRIVNING

1.5.1 **Dynamisk metod (Cottrells metod)**

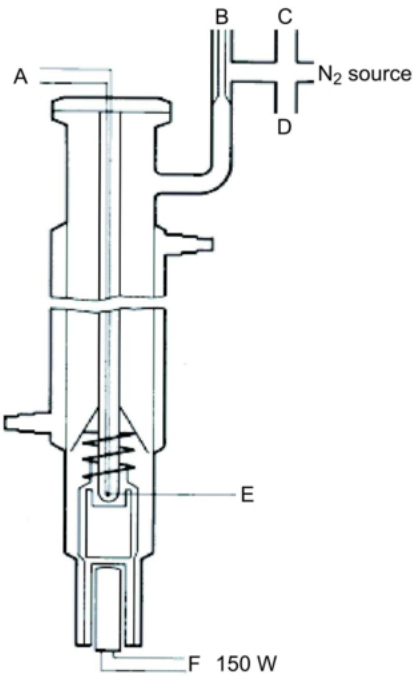
1.5.1.1 *Princip*

Ångtrycket bestäms genom att ämnets kokpunkt mäts vid flera kända tryck mellan ca 10^{3} och 10^{5} Pa. Den här metoden rekommenderas också för bestämning av kokpunkten. Den kan användas för kokpunkter på upp till 600 K. Beroende på vätskepelarens hydrostatiska tryck är vätskors kokpunkt omkring 0,1 °C högre på ett djup av 3–4 cm än på ytan. I Cottrells metod (4) placeras termometern i ångan över vätskeytan så att den kokande vätskan hela tiden sköljer över termometerkulan. Denna täcks då av ett tunt vätskeskikt som vid atmosfärstryck står i jämvikt med ångfasen. Termometern anger således den verkliga kokpunkten utan fel som beror på överhettning eller hydrostatiskt tryck. Den pump som ursprungligen användes av Cottrell visas i figur 1. Rör A innehåller den kokande vätskan. En platinatråd B som är fäst på rörets botten ger en jämn kokning. Sidoröret C leder till en kylare och manteln D förhindrar att det kylda kondensatet når termometern E. När vätskan i A kokar kommer bubblor och vätska som fångats upp av tratten att skölja över termometerkulan via pumpens F båda armar.

Figur 1



Figur 2



Cottrellpump (4)

A: Termoelement

B: Vakuumbuffertvolym

C: Tryckmätare

D: Vakuum

E: Mätpunkt

F: Värmeelement (ca 150 W)

1.5.1.2 *Utrustning*

I figur 2 visas en mycket noggrann mätutrustning som tillämpar Cottrells princip. Den består av ett rör med en sektion som är avsedd för kokning i nedre delen, en kylare i mitten samt ett utlopp och en fläns i den övre delen. Cottrellpumpen placeras i den rörsektion som är avsedd för kokning och denna del av röret värms upp med hjälp av en elpatron. Temperaturen mäts med ett mantlat termoelement eller en resistanstermometer som förs in genom flänsen i rörets övre del. Utloppet ansluts till tryckregleringssystemet, som består av en vakuumpump, en buffertvolym, en manostat för tillförsel av kvävgas (för tryckreglering) och en manometer.

1.5.1.3 *Förfarande*

Ämnet placeras i den rörsektion som är avsedd för kokning. Det kan uppstå problem med fasta ämnen som inte är i pulverform, men detta kan ibland undvikas genom att man värmer kylmanteln. Utrustningen försluts vid flänsen och gaser drivs av. Skummande ämnens ångtryck kan inte mätas med denna metod.

Det lägsta önskade trycket ställs in och värmen slås på. Samtidigt ansluts temperaturgivaren till en skrivare.

Jämvikt har nåtts när en konstant kokpunkt registreras vid konstant tryck. Det är viktigt att undvika stötkokning. Dessutom måste ämnet kondenseras helt på kylaren. Vid bestämning av ångtrycket för lågsmältande fasta ämnen är det viktigt att se till att kylaren inte täpps till.

När jämviktspunkten har registrerats ställs ett högre tryck in. Man fortsätter på samma sätt tills ett tryck på 10^5 Pa nås (totalt omkring 5–10 mätpunkter). För att kontrollera mätvärdena måste man upprepa mätningarna vid stegvis lägre tryck.

1.5.2 **Statisk metod**

1.5.2.1 *Princip*

I den statiska metoden (5) bestäms ångtrycket vid termodynamisk jämvikt vid en viss temperatur. Den här metoden lämpar sig för ämnen och flerkomponentblandningar i flytande eller fast form med ett ångtryck från 10^{-1} till 10^5 Pa. Om man är försiktig kan den också användas i intervallet 1 till 10 Pa.

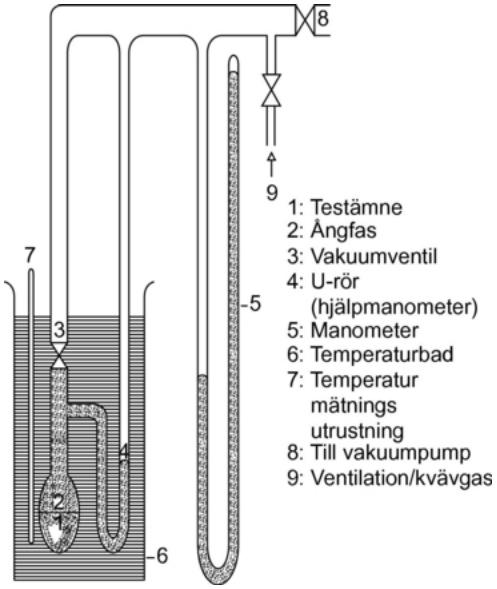
1.5.2.2 *Utrustning*

Utrustningen består av ett bad som hålls vid konstant temperatur (precision på ± 0,2 K), en provbehållare ansluten till en vakuumledning, en manometer och ett tryckregleringssystem. Provkärlet (figur 3 a) ansluts till vakuumledningen via en ventil och en differentialmanometer (U-rör innehållande en lämplig manometervätska) som fungerar som nollindikator. Beroende på tryckintervallet och det testade ämnets kemiska egenskaper kan kvicksilver, silikoner eller ftalater användas i differentialmanometern. Av miljöskäl bör man emellertid om möjligt undvika att använda kvicksilver. Testsubstansen bör inte vara märkbart löslig i eller reagera med vätskan i U-röret. En tryckmätare kan användas i stället för ett U-rör (figur 3 b). Kvicksilver kan användas i manometern från normaltryck ned till 10^2 Pa, medan silikoner och ftalater lämpar sig i tryckintervallet 10 Pa till 10^2 Pa. Det finns andra tryckmätare som kan användas vid lägre tryck än 10^2 Pa, och manometrar med uppvärmningsbara membran kan till och med användas under 10^{-1} Pa. Temperaturen mäts på provbehållarens yttre vägg eller i själva kärlet.

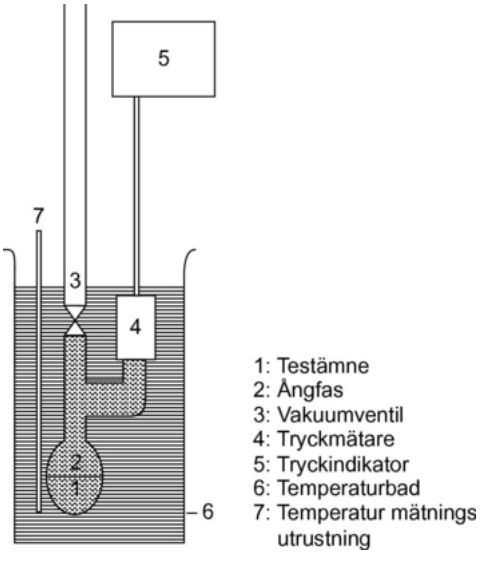
1.5.2.3 *Förfarande*

Vid användning av den utrustning som beskrivs i figur 3 a fylls U-röret med den valda vätskan och gaser drivs av vid hög temperatur innan några avläsningar görs. Testsubstansen placeras i provkärlet och gaser drivs av vid lägre temperatur. Om provet består av flera komponenter måste temperaturen vara så låg att provets sammansättning inte förändras. Jämvikt nås snabbare vid omrörning. Provet kan kylas ned med flytande kväve eller kolsyreis, men det är då viktigt att undvika att luft eller pumpvätska kondenserar. Ventilen över provkärlet öppnas och luften sugs ut under flera minuter. Om det behövs kan avdrivningen av gaser upprepas flera gånger.

Figur 3 a



Figur 3 b



När provet värms upp med ventilen stängd ökar ångtrycket. Därmed rubbas jämvikten hos vätskan i U-röret. För att kompensera för detta tillförs kvävgas eller luft tills tryckskillnadsindikatorn åter visar noll. Det tryck som behövs för att återställa jämvikten kan avläsas på manometern eller på ett instrument med högre precision. Detta tryck motsvarar ämnets ångtryck vid den temperatur där mätningen äger rum. Vid användning av den utrustning som visas i figur 3 b kan ångtrycket avläsas direkt.

Ångtrycket bestäms med tillräckligt små temperaturintervall (totalt omkring 5–10 mätpunkter) upp till den önskade högsta temperaturen.

Avläsningar vid låga temperaturer måste upprepas för att kontrollera att samma värde erhålls. Om de värden som erhålls vid sådana upprepade avläsningar inte överensstämmer med den kurva som erhölls vid stigande temperaturer kan detta bero på att

i) provet fortfarande innehåller luft (detta kan till exempel vara fallet med mycket viskösa ämnen) eller på att lågkokande ämnen avges under uppvärmningen,

ii) ämnet undergår en kemisk reaktion i det undersökta temperaturintervallet (t.ex. sönderdelning eller polymerisering).

1.5.3 **Isoteniskopisk metod**

1.5.3.1 *Princip*

Den isoteniskopiska metoden (6) grundas på samma princip som den statiska metoden. Metoden går ut på att ett prov placeras i en kolv som hålls vid konstant temperatur och som ansluts till en manometer och en vakuumpump. Föroreningar som är mer flyktiga än provet avlägsnas genom att gaserna drivs av vid sänkt tryck. Provets ångtryck vid en viss temperatur balanseras av ett känt tryck av inert gas. Metoden utvecklades för att mäta ångtrycket hos vissa flytande kolväten, men kan även användas för att undersöka fasta ämnen. Den är i allmänhet inte lämplig för flerkomponentsystem. Resultaten är endast behäftade med små fel för prov som innehåller icke-flyktiga föroreningar. Det rekommenderade tryckintervallet är 10^2 till 10^5 Pa.

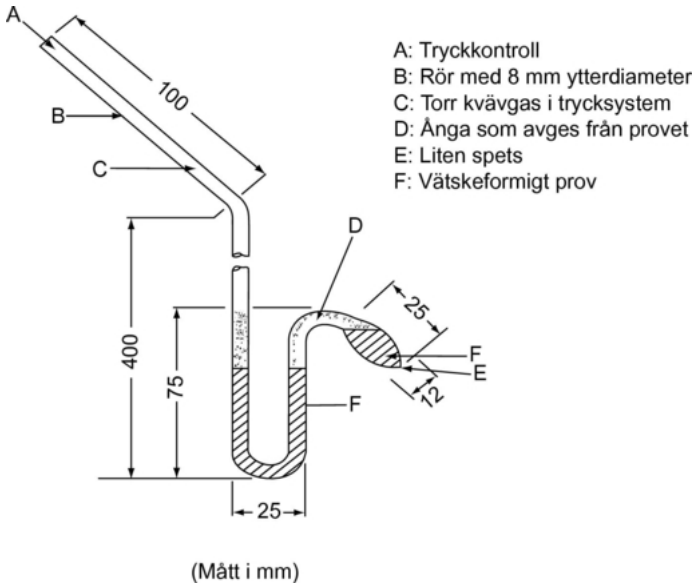
1.5.3.2 *Utrustning*

Ett exempel på mätutrustning visas i figur 4. En fullständig beskrivning återfinns i ASTM D 2879-86 (6).

1.5.3.3 *Förfarande*

Om provet är en vätska är det själva ämnet som används som vätska i differentialmanometern. En vätskemängd som är tillräckligt stor för att fylla kolven och manometerns kortare rör tillsätts isoteniskopet. Isoteniskopet, som är anslutet till ett vakuumsystem, evakueras och fylls därefter med kvävgas. Evakueringen och genomblåsningen av systemet med kvävgas upprepas två gånger för att avlägsna kvarvarande syre. Det fyllda isoteniskopet placeras horisontellt så att provet sprids ut i ett tunt skikt i provkolven och manometern. Systemets tryck minskas till 133 Pa och provet värms försiktigt tills det precis börjar koka (avdrivning av lösta gaser). Isoteniskopet placeras därefter så att provet återgår till kolven och fyller manometerns kortare rör. Trycket bibehålls vid 133 Pa. Provkolvens utdragna spets värms med en liten låga tills den ånga som avges från provet utvidgas så mycket att en del av provet pressas ut ur kolvens övre del och manometerröret in i manometern och skapar ett ångfyllt, kvävgasfritt utrymme. Isoteniskopet placeras sedan i ett bad med konstant temperatur och kvävgastrycket justeras tills det är lika högt som provets tryck. Vid jämvikt är kvävgastrycket lika högt som ämnets ångtryck.

Figur 4



För fasta ämnen används manometervätskor som silikoner och ftalater. Valet av manometervätska beror på de aktuella tryck- och temperaturintervallen. Manometervätskan, från vilken gaser drivits av, placeras i en utbuktning på isoteniskopets längre arm. Det fasta ämne som ska undersökas placeras sedan i provkolven och gaser drivs av vid hög temperatur. Därefter lutas isoteniskopet så att manometervätskan kan flöda in i U-röret.

1.5.4 **Effusionsmetod: ångtrycksjämvikt** (7)

1.5.4.1 *Princip*

Ett prov av det ämne som ska testas värms upp i en liten ugn och placeras i en evakuerad glaskupa. Ugnen täcks med ett lock med små hål av kända diametrar. Den ånga som avges från ämnet och som sipprar ut genom ett av hålen riktas mot vågskålen på en ytterst känslig våg som också befinner sig i den evakuerade glaskupan. I vissa försöksuppställningar omges vågskålen av en kyllåda, varifrån värme avleds till utsidan genom värmeledning, och kyls genom strålning så att den ånga som sipprar ut kondenserar på vågskålen. Ångstrålens rörelsemängd agerar som en kraft på vågen. Ångtrycket kan bestämmas på två sätt: antingen direkt från den kraft som utövas på vågskålen eller från avdunstningshastigheten enligt Hertz-Knudsens ekvation (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

där:

G = avdunstningshastigheten (kg s^{-1} m^{-2})

M = molmassan (g mol^{-1})

T = temperaturen (K)

R = den allmänna gaskonstanten (J mol^{-1} K^{-1})

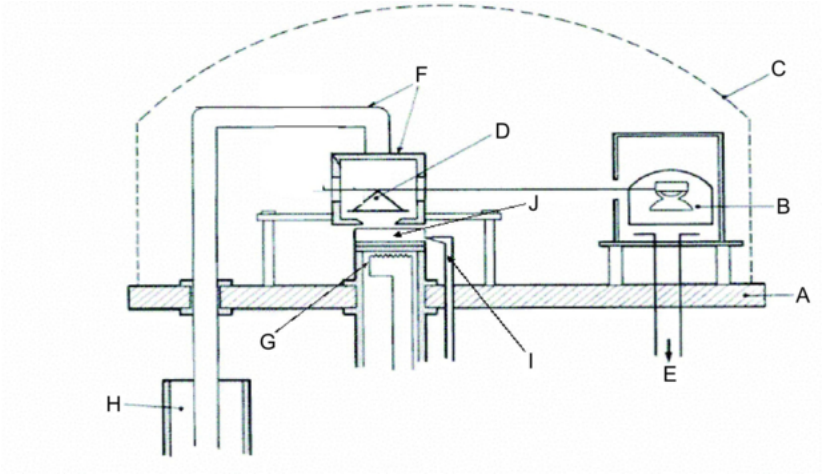
P = ångtrycket (Pa)

Det rekommenderade tryckintervallet är 10^{-3} till 1 Pa.

1.5.4.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 5.

Figur 5



A: Bottenplatta
B: Vridspoleinstrument
C: Glaskupa
D: Våg med vågskål
E: Vakuummätare
F: Kyllåda och kylstav
G: Förångningsugn
H: Termos med flytande kväve
I: Mätning av provets temperatur
J: Testsubstans

1.5.5 **Effusionsmetod: Knudsencell**

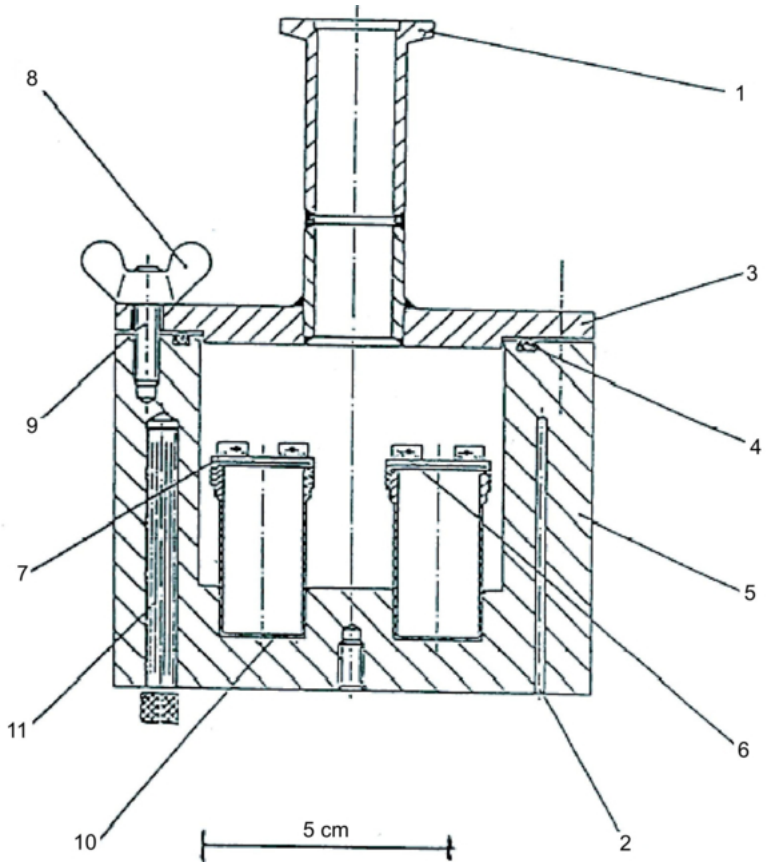
1.5.5.1 *Princip*

Metoden grundas på en uppskattning av den massa av testsubstansen som per tidsenhet strömmar ut från en Knudsencell (8) i form av ånga genom en ytterst liten mynning under ultrahögt vakuum. Den avgivna ångans massa kan erhållas antingen genom att man bestämmer cellens massförlust eller genom att ångan kondenseras vid låg temperatur, varefter mängden förångat ämne bestäms med kromatografi. Ångtrycket beräknas med hjälp av Hertz-Knudsens ekvation (se avsnitt 1.5.4.1) med korrektionsfaktorer som beror på utrustningens parametrar (9). Det rekommenderade ångtrycksintervallet är 10^{-10} till 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 6.

Figur 6



1: Anslutning till vakuum
2: Öppningar för resistanstermometer av platina eller för mätning och kontroll av temperatur
3: Lock till vakuumbehållare
4: O-ring
5: Vakuumbehållare av aluminium
6: Anordning för införande och borttagande av effusionsceller
7: Skruvlock
8: Vingmuttrar
9: Bultar
10: Effusionsceller av rostfritt stål
11: Värmepatron

1.5.6 **Effusionsmetod: isoterm termogravimetri**

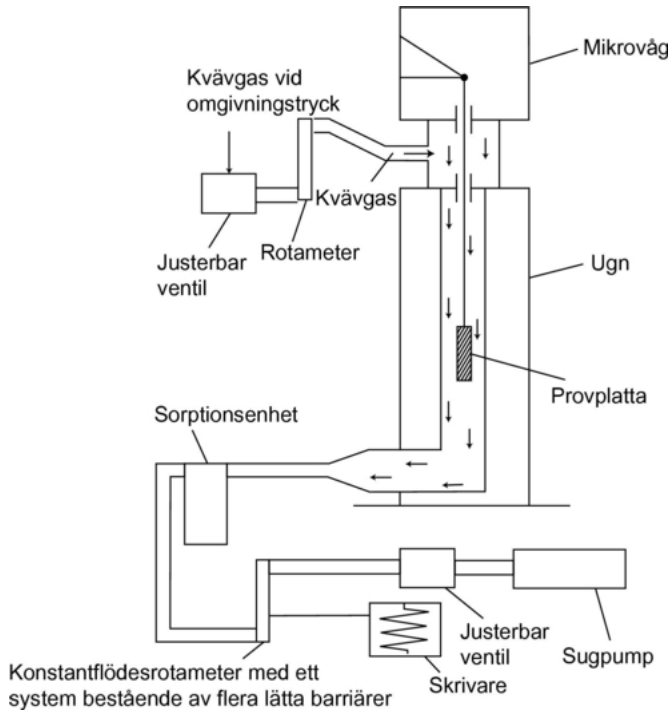
1.5.6.1 *Princip*

Metoden går ut på att testsubstansens påskyndade avdunstningshastigheter bestäms vid höga temperaturer och omgivningstryck med hjälp av termogravimetri (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Avdunstningshastigheterna v_T är en följd av att man exponerar det valda ämnet för en långsamt strömmande inert gasatmosfär och registrerar viktförlusten vid kända isotermiska temperaturer T (i Kelvin) under lämpliga tidsperioder. Ångtrycket p_T kan beräknas utifrån v_T-värdena genom att man utnyttjar det linjära förhållandet mellan logaritmen av ångtrycket och logaritmen av avdunstningshastigheten. Vid behov kan resultaten extrapoleras till temperaturer på 20 och 25 °C genom regressionsanalys av log p_T som en funktion av 1/T. Den här metoden lämpar sig för ämnen med ångtryck som är så låga som 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) och med en renhet på nära 100 % för att undvika feltolkning av de uppmätta viktförlusterna.

1.5.6.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för försöksuppställningen visas i figur 7.

Figur 7



Provplattan, som hänger på en mikrovåg i en temperaturkontrollerad kammare, spolas med en kvävgasström som för bort förångade molekyler av testsubstansen. När gasströmmen kommer ut från kammaren renas den i en sorptionsenhet.

1.5.6.3 *Förfarande*

Testsubstansen appliceras i ett jämnt skikt på en uppruggad glasplatta. Fasta ämnen löses i lämpligt lösningsmedel och lösningen appliceras i ett jämnt skikt på plattan, som sedan får torka i en inert atmosfär. Vid mätningen hängs den belagda plattan upp i den termogravimetriska analysatorn och viktförlusten mäts kontinuerligt som en funktion av tiden.

Avdunstningshastigheten v_T vid en given temperatur beräknas utifrån provplattans viktförlust Δm enligt följande formel:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}\left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}}\right)$$

där F är det applicerade testsubstansens ytarea (normalt densamma som provplattans ytarea) och t är den tid under vilken viktförlusten Δm registreras.

Ångtrycket p_T kan sedan beräknas som en funktion av avdunstningshastigheten v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D \log v_T$$

där C och D är konstanter som är specifika för den använda försöksuppställningen och som beror på mätkammarens temperatur och på gasflödeshastigheten. Dessa konstanter måste bestämmas genom mätning av ett antal föreningar med känt ångtryck och regression av log p_T som en funktion av log v_T (11)(21)(22).

Förhållandet mellan ångtrycket p_T och temperaturen T i Kelvin erhålls genom följande formel:

$$\text{Log } p_T = A + B\ 1/T$$

där A och B är konstanter som erhålls genom regression av log p_T som en funktion av 1/T. Med hjälp av denna formel kan ångtrycket beräknas för vilken annan temperatur som helst genom extrapolering.

1.5.7 **Gasmättnadsmetod** (23)

1.5.7.1 *Princip*

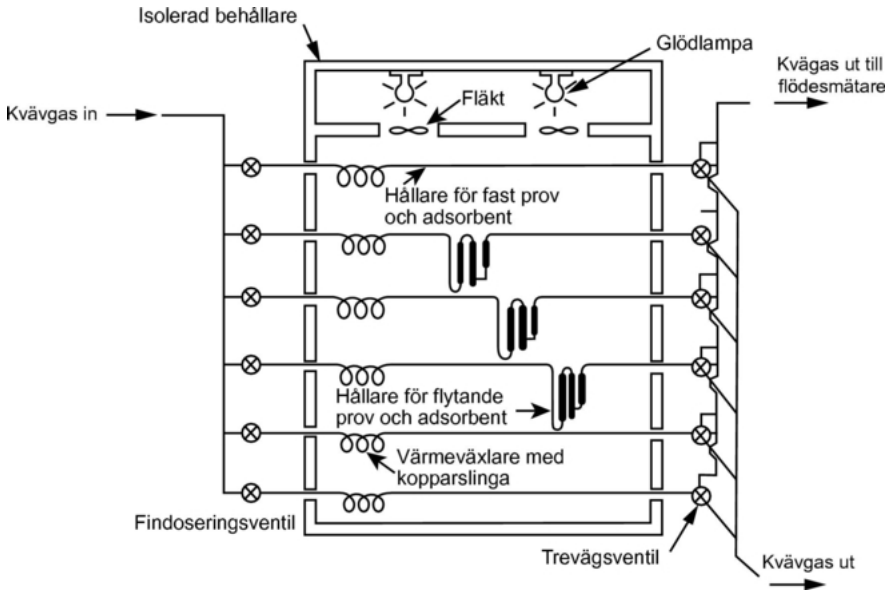
Inert gas vid rumstemperatur och med känd flödeshastighet leds genom eller över ett prov av testsubstansen, så långsamt att gasen mättas. Det är ytterst viktigt att uppnå mättnad i gasfasen. Den substans som transporteras med gasen samlas upp, vanligen med hjälp av en adsorbent, och mängden bestäms. Som ett alternativ till uppsamling av ånga och efterföljande analys kan en metod för direktanalys, t.ex. gaskromatografi, användas för kvantitativ bestämning av den mängd ämne som transporteras. Beräkningen av ångtrycket grundas på antagandet att allmänna gaslagen gäller och att det totala trycket i en gasblandning är lika med summan av de ingående gasernas tryck. Testsubstansens deltryck, dvs. ångtryck, beräknas utifrån den kända totala gasvolymen och utifrån det transporterade materialets vikt.

Gasmättnadsmetoden kan användas för både fasta och flytande ämnen. Den kan användas för ångtryck ned till 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14), men är mest tillförlitlig för ångtryck under 10^3 Pa. Vid högre tryck än 10^3 Pa överskattas vanligen ångtrycket, troligen beroende på aerosolbildning. Eftersom ångtrycket mäts vid rumstemperatur är det inte nödvändigt att extrapolera data från mätningar som görs vid höga temperaturer. Sådan extrapolering kan annars ge upphov till stora fel.

1.5.7.2 *Utrustning*

I den här metoden används en behållare med konstant temperatur. Teckningen i figur 8 visar en behållare innehållande sex provhållare – tre för fasta prover och tre för flytande prover – så att man samtidigt kan göra tre analyser av antingen ett fast eller flytande prov. Temperaturvariationen får vara högst ± 0,5 °C.

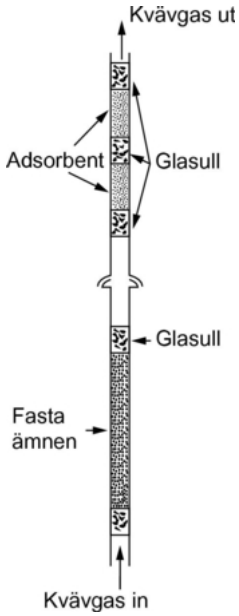
Figur 8



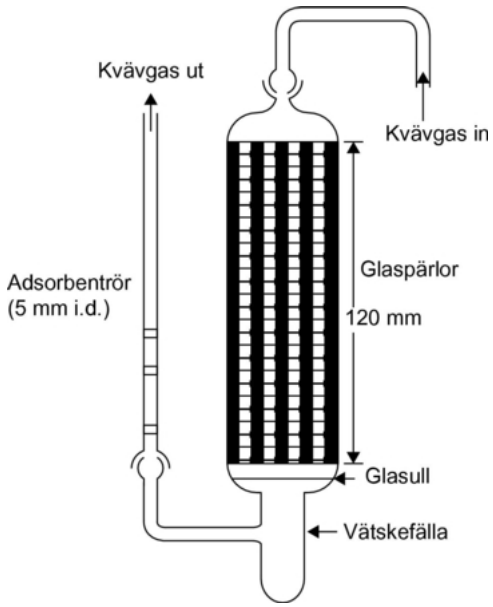
Vanligen används kväve som inert bärgas, men ibland kan det vara nödvändigt att använda en annan gas (24). Bärgasen måste vara torr. Gasströmmen delas upp i sex delströmmar med hjälp av nålventiler (med en öppning på ca 0,79 mm) och leds in i behållaren genom ett kopparrör med 3,8 mm innerdiameter. När en jämn temperatur uppnåtts leds gasen genom provet och adsorbentfällan och därefter ut ur behållaren.

Fasta prover laddas i glasrör med 5 mm innerdiameter som försluts med glasull i båda ändarna (se figur 9). I figur 10 visas en hållare och ett adsorbentsystem för flytande prover. Den mest reproducerbara metoden för att mäta vätskors ångtryck är att belägga glaspärlor eller en inert adsorbent såsom kiseldioxid med vätskan och att packa hållaren med dessa kulor eller denna adsorbent. Alternativt kan man låta bärgasen passera genom grov fritta och bubbla genom en kolonn av den flytande testsubstansen.

Figur 9



Figur 10



Adsorbentröret har två delar som är fyllda med adsorbent – en främre del och en bakre del som fungerar som reserv. Vid mycket låga ångtryck fångas endast små mängder av testsubstansen upp på adsorbenten. Adsorptionen i glasullen och på glasrörets väggar mellan provet och adsorbenten kan då utgöra ett stort problem.

Fällor som kyls med kolsyreis är ett annat effektivt sätt att samla upp förångad substans. De ger inte något baktryck på mättningskolonnen och det är också lättare att avlägsna det uppfångade materialet kvantitativt från kylfällan.

1.5.7.3 *Förfarande*

Den utgående bärgasens flödeshastighet mäts vid rumstemperatur. Flödeshastighten måste kontrolleras ofta under försökets gång för att säkerställa att det finns ett korrekt värde för hela bärgasvolymen. Kontinuerlig mätning med en massflödesmätare är att föredra. Det kan krävas en lång kontakttid och följaktligen relativt låga flödeshastigheter för att uppnå mättnadskoncentration i gasfasen (25).

I slutet av försöket analyseras de båda delarna av adsorbenten var för sig. Den adsorberade substansen i vardera delen av adsorbentröret desorberas genom extraktion med lösningsmedel. De resulterande lösningarna analyseras kvantitativt för att bestämma vikten på den substans som desorberas från varje del av röret. Valet av analysmetod (liksom valet av adsorbent och lösningsmedel för extraktionen) beror på vilken typ av testsubstans det är fråga om. Desorptionseffektiviteten bestäms genom att man injicerar en känd mängd av testsubstans på adsorbenten, desorberar den och analyserar den desorberade mängden. Det är viktigt att kontrollera desorptionseffektiviteten vid samma eller liknande koncentration som provets koncentration och under samma försöksbetingelser.

För att försäkra sig om att bärgasen är mättad med testsubstansen används tre olika gasflödeshastigheter. Om det beräknade ångtrycket är konstant vid olika flödeshastigheter antas gasen vara mättad.

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

där:

p = ångtrycket (Pa)

W = den avdunstade testsubstansens massa (g)

V = den mättade gasens volym (m^3)

R = den allmänna gaskonstanten, dvs. 8,314 ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$)

T = temperaturen (K)

M = testsubstansens molmassa ($g\ mol^{-1}$)

De uppmätta volymerna måste korrigeras för tryck- och temperaturskillnader mellan flödesmätaren och mättningskolonnen.

1.5.8 **Rotormetod**

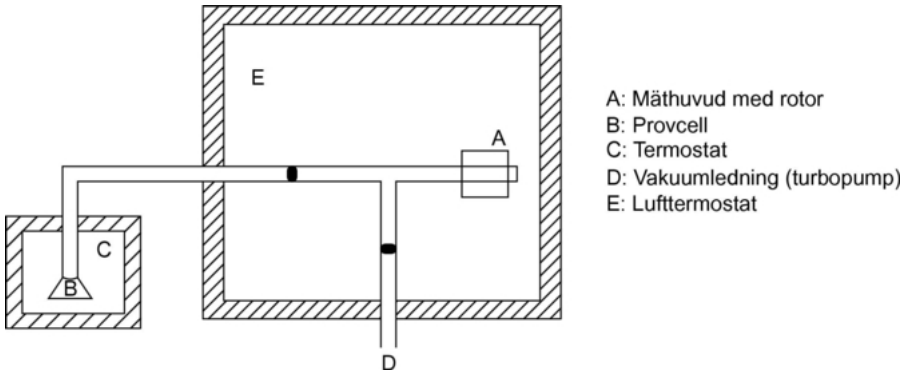
1.5.8.1 *Princip*

I den här metoden används en viskositetsmätare bestående av en rotor, där mätelementet utgörs av en liten stålkula som svävar i ett magnetfält och sätts i rörelse genom roterande fält (26)(27)(28). Kulans rotationshastighet kan mätas med hjälp av detektorspolar. När kulan har nått en viss rotationshastighet, vanligen omkring 400 varv per sekund, avbryts energitillförseln och gasfriktionen börjar bromsa kulans rotation. Minskningen av rotationshastigheten mäts som en funktion av tiden. Ångtrycket bestäms utifrån stålkulans tryckberoende avsaktning. Det rekommenderade ångtrycksintervallet är 10^{-4} till 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Utrustning*

En schematisk ritning av försöksuppställningen visas i figur 11. Mäthuvudet placeras i en inneslutning som hålls vid konstant temperatur, reglerad inom 0,1 °C. Provbehållaren placeras i en separat inneslutning, även den reglerad inom 0,1 °C. För att förhindra kondensation hålls alla andra delar av försöksuppställningen vid högre temperatur. Hela utrustningen ansluts till ett vakuumsystem.

Figur 11



2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Ångtrycket ska bestämmas med en av de ovan beskrivna metoderna och vid minst två temperaturer. För att kontrollera ångtryckskurvans linjäritet är det önskvärt med tre eller fler bestämningar i intervallet 0–50 °C. För effusionsmetoden (Knudsencell och isoterm termogravimetri) och gasmättnadsmetoden rekommenderas att temperaturen varieras inom intervallet 120–150 °C i stället för 0–50 °C.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska omfatta följande information:

— Använd metod.

— Exakt angivelse av ämnet (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningssteg.

— Minst två ångtrycks- och temperaturvärden – helst tre eller fler – i området 0–50 °C (eller 120–150 °C),

— Minst ett av temperaturvärdena bör vara 25 °C eller lägre om detta är tekniskt möjligt med den valda metoden.

— Alla rådata.

— En kurva över log p som funktion av 1/T.

— En uppskattning av ångtrycket vid 20 eller 25 °C.

Om en förändring (ändring av aggregationstillstånd eller nedbrytning) noteras ska följande uppgifter anges:

— Förändringens art.

— Temperatur vid vilken förändringen inträffar vid atmosfäriskt tryck.

— Ångtryck 10 och 20 °C under den temperatur där förändringen inträffar samt 10 och 20 °C över denna temperatur (såvida övergången inte sker från fast form till gasform).

Alla uppgifter och anmärkningar som kan ha betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt vad gäller orenheter och ämnets aggregationstillstånd.

3. **LITTERATUR**

1. *Europeiska gemenskapernas officiella tidning* L 383 A, s. 26–47 (1992).

2. Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B. och Vodar, B., red., Butterworths, London.

3. Weissberger R., red. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3.e uppl., vol. I, del I. kapitel IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2:a uppl., Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20–048 AFNOR (september 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

6. ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20–048 AFNOR (september 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

8. Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, s. 1979; (1911), 34, s. 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, s. 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, s. 521–532.

11. Tomlin, C.D.S. (red.), The Pesticide Manual, 12:e uppl. (2000).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), s. 22–28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), s. 269–278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), s. 117–122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) s. 137–147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974), s. 393–400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Del III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) s. 161–168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Del IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) s. 27–31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Del V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science 53 (1998) s. 300–310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) s. 1512–1520.

21. Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81:a uppl. (2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

22. Meister, R.T. (red.), Farm Chemicals Handbook, vol. 88 (2002)

23. 40 CFR, 796. (1993). s 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

24. Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, s. 435.

25. Westcott m.fl. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, s. 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G., och Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), s. 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K. och Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), s. 642.

28. Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), s. 1715.

Tillägg

Uppskattningsmetod

INLEDNING

Uppskattade värden på ångtrycket kan användas för att

— bestämma vilken försöksmetod som är lämplig,

— göra en uppskattning eller fastställa ett gränsvärde när det av tekniska skäl inte är möjligt att använda någon av försöksmetoderna.

UPPSKATTNINGSMETOD

Vätskors och fasta ämnens ångtryck kan uppskattas genom användning av den modifierade Watson-korrelationen (a). De enda experimentella data som behövs är den normala kokpunkten. Metoden kan användas i ett tryckintervall från 10^5 Pa till 10^{-5} Pa.

Närmare information om metoden finns i ”Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Se även OECD Environmental Monograph nr 67 (c).

BERÄKNINGSFÖRFARANDE

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_b}\right]$$

där:

T = den aktuella temperaturen

T_b = den normala kokpunkten

P_{VP} = ångtrycket vid temperaturen T

ΔH_{Vb} = ångbildningsvärmet

ΔZ_b = kompressionsfaktor (uppskattad till 0,97)

m = empirisk faktor som beror på ämnets aggregationstillstånd och på den aktuella temperaturen.

Dessutom gäller att

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\left(8{,}75 + R \ln T_b\right)$$

där K_F är en empirisk faktor som tar hänsyn till ämnets polaritet. I hänvisning b finns det en förteckning med K_F-faktorer för olika typer av föreningar.

Det är ganska vanligt med data som anger kokpunkten vid sänkt tryck. I sådana fall beräknas ångtrycket enligt följande formel:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

där T_1 är kokpunkten vid det lägre trycket P_1.

RAPPORT

När uppskattningsmetoden används ska rapporten omfatta en detaljerad redovisning av beräkningen.

LITTERATUR

a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, s. 398.

b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

c) OECD Environmental Monograph nr. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

BILAGA II

A.22 **BESTÄMNING AV FIBRERS LÄNGDVIKTADE GEOMETRISKA MEDELDIAMETER**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

I det här dokumentet beskrivs en metod för bestämning av den längdviktade geometriska medeldiametern (nedan ”medeldiametern”) hos syntetiska oorganiska fibrer som bulkmaterial. Eftersom medeldiametern i populationen med 95 procents sannolikhet ligger mellan konfidensgränserna i ett 95-procentigt konfidensintervall (medeldiametern ± 2 medelfel) i stickprovet, kommer det rapporterade värdet (testvärdet) att bli den undre gränsen i konfidensintervallet (dvs. medeldiametern minus 2 medelfel). Metoden grundas på en uppdatering (från juni 1994) av ett metodförslag (HSE industry procedure) som antogs vid ett möte mellan ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) och den brittiska arbetsmiljömyndigheten HSE (Health and Safety Executive) i Chester den 26 september 1993. Den har utvecklats för och utifrån en andra provningsjämförelse mellan laboratorier (1) (2). Mätmetoden kan användas för att bestämma fiberdiametern hos ämnen eller produkter i bulk som innehåller syntetiska oorganiska fibrer, t.ex. eldfasta keramiska fibrer, syntetiska glasartade fibrer eller kristallina och polykristallina fibrer.

Längdviktning är ett sätt att kompensera för den effekt på diameterfördelningen som uppkommer genom att långa fibrer bryts vid provtagning eller hantering av materialet. Det geometriska medelvärdet används för att beskriva diameterfördelningen för syntetiska oorganiska fibrer, eftersom dessa diametrar vanligen kan approximeras med en log-normalfördelning.

Att mäta såväl längden som diametern är både omständligt och tidskrävande, men om man endast mäter de fibrer som korsas eller tangeras av en oändligt tunn linje i ett SEM-synfält är sannolikheten för att man väljer en viss fiber proportionell mot dess längd. Eftersom längden i längdviktade beräkningar kan hanteras på detta sätt är det endast diametern som behöver mätas. Medeldiametern minus 2 medelfel kan sedan beräknas enligt nedan.

1.2 DEFINITIONER

Partikel: Ett föremål med ett längdbreddförhållande som är mindre än 3:1.

Fiber: Ett föremål med ett längdbreddförhållande på minst 3:1.

1.3 TILLÄMPNINGSOMRÅDE OCH BEGRÄNSNINGAR

Metoden är utformad för bestämning av diameterfördelningar med mediandiametrar från 0,5 till 6 μm. Vid mätning av större diametrar kan man använda mindre SEM-förstoringar, men metoden blir alltmer begränsad när man bestämmer storleksfördelningen hos finare fibrer. Om mediandiametern är mindre än 0,5 μm rekommenderas därför att ett transmissionselektronmikroskop (TEM) används.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Ett antal representativa kärnprov tas från fiberduken eller det löst bundna fibermaterialet. Fibrernas längd minskas genom krossning och ett representativt delprov dispergeras i vatten. Alikvoter extraheras och filtreras genom ett polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm och bereds för undersökning med svepelektronmikroskop (SEM). Fibrernas diametrar mäts vid minst 10 000 gångers skärmförstoring ([1]) med hjälp av en ”linjeskärningsmetod”, vilket ger en objektiv uppskattning av mediandiametern. Den undre gränsen i ett 95-procentigt konfidensintervall (baserat på ett ensidigt test) beräknas för att få en uppfattning om det lägsta värdet på fibermaterialets geometriska medeldiameter.

([1]) Denna förstoring används för 3 μm fibrer. För 6 μm fibrer är det lämpligare att använda 5 000 gångers förstoring.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Säkerhetsåtgärder**

För att begränsa exponeringen för luftburna fibrer till ett minimum bör torra fibrer hanteras i ett dragskåp eller en handskbox. Periodisk kontroll av exponeringen bör göras för att säkerställa att säkerhetsåtgärderna är effektiva. Vid hantering av syntetiska oorganiska fibrer bör engångshandskar användas för att minska hudirritationen och förhindra kontaminering.

1.5.2 **Apparatur och utrustning**

— Press (med en kapacitet på 10 MPa).

— Polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm (25 mm diameter).

— Membranfilter av cellulosaester med en porstorlek på 5 μm som används som stödfilter.

— Filtreringsutrustning av glas (eller filtreringssystem för engångsbruk) för 25 mm filter (t.ex. Millipores glasutrustning för mikroanalys, artikelnr XX10 025 00).

— Nydestillerat vatten som filtrerats genom ett filter med en porstorlek på 0,2 μm för att avlägsna mikroorganismer.

— Sputter som belägger provet med en tunn film av guld eller guld/palladium.

— Svepelektronmikroskop med en upplösning på 10 nm som används vid 10 000 gångers förstoring.

— Spatlar, skalpellblad (nr 24), pincett, SEM-rör, kollim eller koltejp och silverlim.

— Ultraljudsstav eller ultraljudsbad.

— Kärnprovtagare eller korkborr för att ta prover tvärsigenom duken av syntetiska oorganiska fibrer.

1.5.3 **Testförfarande**

1.5.3.1 *Provtagning*

För duk, filt och matta används en 25 mm kärnprovtagare eller korkborr för att ta tvärsnittsprover (rätt genom materialet). Om endast en liten längd av duken är tillgänglig ska proverna vara jämnt fördelade längs dukens kortsida. Om större längder är tillgängliga ska proverna tas från slumpmässigt valda ställen. Samma utrustning kan användas för att ta stickprover från lösa fibrer. Om möjligt ska sex prover tas för att spegla variationen i bulkmaterialet.

De sex kärnproverna krossas vid 10 MPa i en press med 50 mm diameter. Materialet blandas därefter med en spatel och pressas igen vid 10 MPa. Materialet avlägsnas sedan från pressen och lagras i förslutna glasflaskor.

1.5.3.2 *Provberedning*

Om nödvändigt kan fiberproverna placeras i ugn vid 450 °C i en timme för att avlägsna organiskt bindemedel.

Dela upp provet i fyra lika stora delar med ”cone and quarter”-metoden (detta bör göras i ett dragskåp eller liknande).

Tillsätt med hjälp av en spatel en liten mängd (< 0,5 g) av provet till 100 ml nydestillerat vatten som har filtrerats genom ett 0,2 μm membranfilter (ultrarent vatten kan även framställas på annat sätt om det kan styrkas att det håller tillfredsställande kvalitet). Blanda om ordentligt med hjälp av en ultraljudsstav som körs vid 100 W och som ställts in så att en virvel uppkommer. (Gör på följande sätt om en ultraljudsstav inte finns att tillgå: skaka och vänd provbehållaren upprepade gånger i 30 sekunder, placera den därefter i ett ultraljudsbad i 5 minuter och skada och vänd sedan provbehållaren i ytterligare 30 sekunder.)

Ta omedelbart efter det att fibermaterialet dispergerats ett antal alikvoter av provet (t.ex. tre alikvoter på 3, 6 respektive 10 ml) med hjälp av en pipett med stor mynning (2–5 ml volym).

Vakuumfiltrera fibrerna från varje alikvot genom ett 0,2 µm polykarbonatfilter med ett 5 µm cellulosaesterfilter som stödfilter med hjälp av en filtrertratt av glas med cylindrisk behållare. Ca 5 ml filtrerat destillerat vatten tillsätts i tratten och alikvoten pipetteras långsamt ned i vattnet med pipettspetsen under vätskeytan. Pipett och behållare måste sköljas noga efter pipetteringen, eftersom fina fibrer har en tendens att ansamlas på ytan.

Avlägsna filtret försiktigt, skilj det från stödfiltret och lägg det i en behållare för att torka.

Använd ett skalpellblad (nr 24) för att skära ut en fjärdedel eller hälften av filterkakan med en ”sågande rörelse”. Fäst försiktigt det utskurna partiet på svepelektronmikroskopets provhållare (stubbe) med hjälp av koltejp eller kollim. Stryk på silverlim på åtminstone tre ställen för att förbättra den elektriska kontakten vid filtrets och provhållarens kanter. Låt limmet torka. Sputtra därefter ca 50 nm guld eller guld/palladium på filterkakans yta.

1.5.3.3 *Kalibrering och användning av svepelektronmikroskopet*

1.5.3.3.1 Kalibrering

Svepelektronmikroskopets kalibrering måste kontrolleras minst en gång i veckan (helst varje dag) med hjälp av ett certifierat kalibreringsgrid. Kalibreringen ska kontrolleras med hjälp av en certifierad standard. Om det uppmätta värdet inte ligger inom ± 2 % av det certifierade värdet måste svepelektronmikroskopets kalibrering justeras och kontrolleras igen.

Svepelektronmikroskopets ska ha en sådan upplösning att en diameter på 0,2 µm kan urskiljas vid en förstoring på 2 000 gånger i en matris av reella prov.

1.5.3.3.2 Användning

Svepelektronmikroskopet ska användas vid 10 000 gångers förstoring ([1]) och vid betingelser som ger goda resultat och en godtagbar bild vid låga svephastigheter, t.ex. 5 sekunder per bild. Även om inställningarna kan variera mellan olika svepelektronmikroskop bör man för att erhålla bästa skärpa och upplösning vid undersökning av material med låg atomvikt i allmänhet använda accelerationsspänningar på 5–10 keV, ett lågt värde på ”spot size” och ett kort arbetsavstånd. Vid användning av den linjära traversmetoden ska lutningen vara 0 grader för att minimera behovet av omfokusering. Om svepelektronmikroskopet har ett eucentriskt läge ska arbetsavståndet för detta användas. En lägre förstoring kan användas om materialet inte innehåller några små fibrer, dvs. om fiberdiametrarna är större än 5 µm.

1.5.3.4 *Storleksbestämning*

1.5.3.4.1 Undersökning av provet vid låg förstoring

Provet bör först undersökas vid låg förstoring för att se om det finns några tecken på att stora fibrer klumpat ihop sig och för att bestämma fibrernas täthet. Vid omfattande ihopklumpning rekommenderas att ett nytt prov bereds.

För att uppnå god statistisk noggrannhet är det nödvändigt att mäta ett visst minsta antal fibrer. Hög fibertäthet kan vara önskvärt, eftersom det är tidskrävande att undersöka tomma synfält och detta inte bidrar till analysen. Om filtrets fibertäthet är för hög blir det emellertid svårt att mäta alla mätbara fibrer och det finns risk för att man missar små fibrer, eftersom de kan döljas av större fibrer.

Om fibertätheten överstiger 150 fibrer per millimeter linjär travers kan det finnas risk för att medeldiametern överskattas. En låg fiberkoncentration ökar å andra sidan analystiden och det är därför ofta kostnadseffektivt att bereda ett prov vars fibertäthet ligger närmare den optimala tätheten än att fortsätta räkningen på filter med låg fiberkoncentration. Den optimala fibertätheten bör ge ett genomsnitt på en eller två räkningsbara fibrer per synfält vid 5 000 gångers förstoring. Den optimala tätheten beror emellertid på fibrernas storlek (diameter), så den som utför testet måste använda sin omdömesförmåga för att avgöra om fibertätheten ligger nära den optimala eller inte.

([1]) För 3 µm fibrer, se föregående fotnot.

1.5.3.4.2 Längdviktning av fiberdiametrarna

Endast de fibrer som tangerar (eller korsar) en (oändligt) fin linje som dras på svepelektronmikroskopets skärm ska räknas. Av denna anledning dras en horisontell (eller vertikal) linje över skärmens mitt.

Alternativt kan en punkt placeras mitt på skärmen, varefter man inleder en kontinuerlig svepning i en riktning över filtret. Diametern mäts på alla fibrer med ett längdbreddförhållande som är större än 3:1 och som tangerar eller korsar denna punkt.

1.5.3.4.3 Storleksbestämning av fibrerna

Det rekommenderas att minst 300 fibrer mäts. Varje fiber ska endast mätas en gång, i den punkt där den skär den linje eller punkt som placerats på skärmen (eller nära skärningspunkten om fiberkanterna inte syns). För eventuella fibrer som inte har enhetliga tvärsnitt används en mätning motsvarande fiberns genomsnittliga diameter. Det är viktigt att noga bestämma var kanten befinner sig och mäta det kortaste avståndet mellan fiberkanterna. Storleksbestämningen kan göras antingen direkt eller på lagrade bilder eller foton. Användning av halvautomatiska mätsystem som laddar ned data direkt till ett kalkylprogram rekommenderas, eftersom man därigenom sparar tid och eliminerar risken för felskrivningar. Dessutom sker beräkningarna automatiskt.

Ändarna på långa fibrer bör undersökas vid låg förstoring för att kontrollera att de endast mäts en gång och inte kröker sig och kommer tillbaka in i synfältet.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Fibrers diametrar är vanligen inte normalfördelade. Genom en logaritmisk transformation är det emellertid möjligt att erhålla en fördelning som närmar sig normalfördelningen.

Beräkna det aritmetiska medelvärdet (mean lnD) och standardavvikelsen (SD_{lnD}) för den naturliga logaritmen (lnD) av n fiberdiametrar (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\Sigma \text{lnD}}{n} \tag{1}$$

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{lnD} - \text{mean lnD})^2}{n-1}} \tag{2}$$

Medelfelet (SE_{lnD}) beräknas genom att standardavvikelsen divideras med kvadratroten ur antalet mätningar (n).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \tag{3}$$

Beräkna det geometriska medelvärdet minus två geometriska medelfel (LWGMD – 2SE) genom att subtrahera två medelfel från medelvärdet och upphöja e till detta värde (medelvärdet minus två medelfel).

$$\text{LWGMD} - 2SE = e^{(\text{mean lnD} - 2SE_{lnd})} \tag{4}$$

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— Värdet på den längdviktade geometriska medeldiametern minus två medelfel.

— Eventuella avvikelser från metoden (särskilt sådana som kan påverka resultatens precision eller noggrannhet) samt skälen för dessa.

4. **LITTERATUR**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Februari 1999.

2. G. Burdett och G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

BILAGA III

B.46 IN VITRO HUDIRRITATIONER: MODELLTEST AV REKONSTRUERAD HUMAN HUD

1. METOD

1.1 INLEDNING

Hudirritation betyder att det uppstår en reversibel skada på huden efter applicering av en testsubstans i upp till 4 timmar (Förenta nationernas [FN] definition enligt det globala klassificerings- och märkningssystemet GHS [Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals])(1). Denna testmetod utgörs av en in vitro-procedur som, beroende på informationsbehoven, gör det möjligt att fastställa hudirritationer orsakade av ämnen som ett fristående ersättningstest inom ramen för en teststrategi som bygger på bevisbörda (weight of evidence) (2).

Det vanligaste har varit att använda försöksdjur i analyser av hudirritationer (se metod B.4)(3). När det gäller djurens välfärd är det med hjälp av metod B.4 möjligt att fastställa hudkorrosion/hudirritation genom att tillämpa en stegvis teststrategi med validerade in vitro- och ex vivo-metoder, och på så vis undvika djurs smärta och lidande. Tre validerade in vitro-testmetoder eller testriktlinjer, B.40, B.40a och TG 435 (4, 5, 6), är användbara för korrosivitetsdelen i den stegvisa teststrategin för B.4.

Denna testmetod baseras på modeller av rekonstruerad human hud som i sin övergripande utformning (användning av keratinocyter i epidermis med humant ursprung som cellkälla, representativ vävnad och cytoarkitektur) är mycket lika de biokemiska och fysiologiska egenskaperna hos den mänskliga överhuden (epidermis). Det förfarande som beskrivs inom denna testmetod gör det möjligt att identifiera irriterande ämnen i enlighet med FN:s GHS-kategori 2. Testmetoden omfattar även en rad prestandastandarder för bedömning av liknande och modifierade testmetoder med rekonstruerad human hud (7).

Förvaliderings-, optimerings- och valideringsstudier har genomförts för två in vitro-testmetoder (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), kommersiellt tillgängliga som EpiSkin™ och EpiDerm™ och där man använder modeller av rekonstruerad human hud. Dessa referenser baserades på R 38. Vissa aspekter av omräkningen för GHS behandlas i referens 25. Metoder med prestanda motsvarande EpiSkin™ (validerad referensmetod 1) rekommenderas som ett fristående ersättningstest för in vivo-hudirritationstester på kaniner för att klassificera irriterande ämnen i GHS-kategori 2. Metoder med prestanda motsvarande EpiDerm™ (validerad referensmetod 2) rekommenderas endast som en screentestmetod, eller som en del av en stegvis teststrategi som bygger på bevisbörda för att klassificera irriterande ämnen enligt GHS-kategori 2. Innan en föreslagen in vitro-modelltest för rekonstruerad human hud kan användas för rättsliga ändamål måste dess tillförlitlighet, relevans (exakthet) och begränsningar för det föreslagna användningsområdet fastställas för att se till att den är jämförbar med den validerade referensmetoden 1, i enlighet med de prestandastandarder som anges enligt denna testmetod (tillägg).

Två andra in vitro-testmetoder med rekonstruerad human hud har validerats i enlighet med kraven för den här testmetoden och uppvisar liknande resultat som den validerade referensmetoden 1 (18). Det rör sig om den modifierade testmetoden EpiDerm™ (modifierad referensmetod 2) och testmetoden SkinEthic RHE™ (”me too-metod” 1).

1.2 DEFINITIONER

Inom denna testmetod tillämpas följande definitioner:

Exakthet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod.

Satskontrollämne: ett referensämne som ger ett medelvärde för cellernas viabilitet i vävnaden.

Cellviabilitet: en parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. för att mäta viabiliteten hos cellulära mitokondriella dehydrogenaser för att reducera det vitala färgämnet MTT ([3–(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolyl blå). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller cellernas vitalitet.

ET_{50}: den exponeringstid som krävs för att minska cellvitaliteten med 50 % vid applicering av markörämnet vid en specificerad, fast koncentration, se även IC_{50}.

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som felaktigt identifieras som positiv. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Infinit dos: den mängd testämne som appliceras på huden och som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka epidermisytan med ett jämnt lager.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad. Syftet är att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) samt miljön (1). Det har genomförts i EU genom förordning (EG) nr 1272/2008.

IC_{50}: den koncentration vid vilken ett markörämne minskar vävnadernas vitalitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid, se även ET_{50}.

Prestandastandarder: standarder som baseras på en validerad referensmetod. De utgör grunden för att utvärdera jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Här ingår I) testmetodens grundläggande komponenter, II) en minimiförteckning över referensämnen som väljs ut bland de ämnen som används för att visa att den validerade referensmetodens prestanda är godtagbara, och III) de jämförbara exakthets- och tillförlitlighetsnivåerna, som baseras på de resultat som erhålls för den validerade referensmetoden, och som den föreslagna testmetoden skulle visa vid en utvärdering som grundas på en minimiförteckning över referensämnen.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier.

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva ämnen som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på exaktheten hos en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva ämnen som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på exaktheten hos en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Hudirritation: när en reversibel skada uppstår på huden efter applicering av ett testämne i upp till 4 timmar. Hudirritation är en lokal icke-immunogenisk reaktion som uppstår kort efter stimulans (24). Den mest utmärkande egenskapen är den reversibla processen som omfattar inflammatoriska reaktioner och de flesta av de kliniskt karakteristiska tecknen på irritation (hudrodnad, ödem, klåda och smärta) som hör samman med en inflammatorisk process.

1.3 TILLÄMPNINGSOMRÅDE OCH BEGRÄNSNINGAR

En begränsning hos de tester med rekonstruerad human hud som omfattas av denna testmetod är att de endast klassificerar ämnen som hudirriterande enligt FN:s GHS-kategori 2. Eftersom det inte är möjligt att klassificera ämnen i den valfria kategori 3 såsom den definieras i FN:s GHS-system, klassificeras inte alla återstående ämnen (ingen kategori). Denna testmetod måste ses över beroende på de rättsliga behoven och beroende på om det i framtiden införs nya endpoints eller förbättringar eller om det utvecklas nya ”me too-tester”.

Testmetoden gör det möjligt att identifiera hudirriterande ämnen (mono- constituent substances) (19), men ger inte tillräcklig information om hudkorrosion. Gaser och aerosoler kan inte testas. Blandningar har ännu inte utvärderats i en valideringsstudie.

1.4 TESTPRINCIP

Testämnet appliceras lokalt på en tredimensionell modell av rekonstruerad human hud, som består av normala epidermala keratinocyter av humant ursprung, som har odlats för att bilda en flerlagrig, starkt differentierad modell av human hud. Det består av ordnade lager: basala lager, taggcellslager och granulära lager, och ett flerlagrigt hornlager som innehåller intercellulära lamellager och som har ordnats i motsvarande mönster som dem som påträffats in vivo.

Principen för testmetoden med rekonstruerad human hud baseras på antagandet att irriterande ämnen kan penetrera hornlagret genom diffusion och är cytotoxiska för de underliggande cellagren. Cellviabiliteten mäts genom dehydrogenasernas omvandling av det vitala färgämnet MTT 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolyl blå, Einecs-nummer 206-069-5, CAS-nummer 298-93-1)], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter det att vävnaderna extraherats (20). Irriterande ämnen identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (dvs. ≤ 50 % för irriterande ämnen i FN:s GHS-kategori 2). Ämnen som producerar cellviabilitetsvärden över det definierade gränsvärdet klassificeras inte (dvs. > 50 %, ingen kategori).

Modellsystemen med rekonstruerad human hud kan användas för att testa fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. När det är möjligt bör fasta ämnen testas i form av fint puder. Eftersom 58 noggrant utvalda ämnen, som representerar ett brett spektrum av kemiska klasser, ingick i valideringen av testsystemen för modellen av rekonstruerad human hud förväntas metoderna vara allmänt tillämpliga på olika kemiska klasser (16). Valideringen omfattade 13 irriterande ämnen i GHS-kategori 2. Det bör noteras att icke-frätande syror, baser, salter och andra oorganiska ämnen inte omfattades av valideringen och att vissa kända klasser av organiska irriterande ämnen, såsom hydroperoxider, fenoler och ytaktiva ämnen, inte omfattades alls eller endast i begränsad utsträckning.

1.5 KVALIFIKATIONSPRÖVNING

Innan en validerad metod som följer denna testmetod börjar användas rutinmässigt kanske laboratorierna vill undersöka om metoden är tekniskt kvalificerad genom att använda de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1. I denna testmetod betraktas FN:s valfria GHS-kategori 3 som ”ingen kategori”. För nya, likartade (”me too”) testmetoder som har utvecklats inom ramen för testmetoden och som är strukturellt och funktionellt lika de validerade referensmetoderna eller för ändringar av validerade metoder, ska de prestandastandarder som beskrivs i tillägget till denna testmetod användas för att visa en jämförbar tillförlitlighet och exakthet för den nya testmetoden innan den börjar användas för rättslig testning.

Tabell 1

Kvalifikationsämnen som är delar av de referensämnen som anges i tillägget

Ämne	CAS-nummer	In vivo-poäng	Fysiskt tillstånd	GHS-kategori
naftalenättiksyra	86-87-3	0	S	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	L	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	1	S	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	L	Valfri kat. 3
hexylsalicylat	6259-76-3	2	L	Valfri kat. 3
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	L	Kat. 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	L	Kat. 2
butylmetakrylat	97-88-1	3	L	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	S	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	4	L	Kat. 2

1.6 BESKRIVNING AV METODEN

Nedan följer en beskrivning av komponenterna och procedurerna för ett test med en modell av rekonstruerad human hud för bedömning av hudirritationer. En modell av rekonstruerad human hud kan konstrueras, prepareras eller erhållas kommersiellt (t.ex. EpiSkin™, EpiDerm™ och SkinEthic RHE™). Protokollen för standardtestmetoder för EpiSkin™, EpiDerm™ och SkinEthic RHE™ finns tillgängliga på [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu] (21, 22, 23). Testningen ska genomföras enligt följande:

1.6.1 **Komponenter i en modell av rekonstruerad human hud**

1.6.1.1 *Allmänna villkor för modellen*

Normala humana keratinocyter ska användas för att konstruera epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basala lager, taggcellslager och granulära lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera lager som har den nödvändiga lipidprofilen för att producera en barriärfunktion som är stark nog att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörämnen, t.ex. natriumdodekylsulfat (SDS) eller Triton X-100. Barriärfunktionen kan antingen analyseras genom att fastställa den koncentration vid vilken ett markörämne minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fastställd exponeringstid, eller genom att fastställa den exponeringstid som krävs för att minska cellernas viabilitet med 50 % (ET_{50}) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markörämnet. Modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att materialet kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en dålig modellering av hudexponeringen. Hudmodellen ska vara fri från föroreningar av bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

1.6.1.2 *Funktionsvillkor för modellen*

1.6.1.2.1 Viabilitet

Den lämpligaste bestämningsmetoden för att fastställa viabiliteten är MTT (20). Den optiska densiteten (OD) av det (lösta) färgämnet som extraherats från den vävnad som behandlats med negativkontrollen (NC) bör vara minst 20 gånger större än den OD som konstaterats enbart för extraktionslösningsmedlet. Det bör dokumenteras att den vävnad som behandlas med NC är en stabil kultur (den ska uppvisa liknande viabilitetsmått) under hela testexponeringstiden.

1.6.1.2.2 Barriärfunktion

Hornlagret och dess lipida sammansättning ska vara tillräckliga för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörämnen, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt beräkningar av IC_{50} eller ET_{50}.

1.6.1.2.3 Morfologi

En histologisk undersökning av den rekonstruerade huden/epidermis ska genomföras av lämpligt kvalificerad personal och ska uppvisa en struktur som liknar mänsklig hud/epidermis (inklusive flerlagrigt hornlager).

1.6.1.2.4 Reproducerbarhet

Resultaten av en metod där en specifik modell används ska visa reproducerbarhet över tiden, företrädesvis genom ett lämpligt satskontrollämne (referensämne) (se tillägget).

1.6.1.2.5 Kvalitetskontroller av modellen

Varje sats av den epidermala modell som används måste uppfylla fastställda kriterier för utsläppande till produktion, varav kriterierna för viabilitet (punkt 1.6.1.2.1) och för barriärfunktionen (punkt 1.6.1.2.2) är de mest relevanta. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC_{50} eller ET_{50} ska fastställas av leverantören av hudmodellen (eller en forskare om en intern modell används). Vävnadens barriäregenskaper ska verifieras av laboratoriet efter mottagande av vävnaderna. Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för en tillförlitlig beräkning av irritationseffekter. De godkända värdena för de validerade referensmetoderna visas i exemplet nedan.

Tabell 2

Exempel på kriterier för kvalitetskontroll för utsläppande av en sats

	Nedre gräns för godkännande	Medelvärde för godkännande	Övre gräns för godkännande
Validerad referensmetod 1 (18 timmars behandling med SDS)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Validerad referensmetod 2 (1 % Triton X100)	ET_{50} = 4,8 tim	ET_{50} = 6,7 tim	ET_{50} = 8,7 tim

1.6.1.3 *Applicering av test- och kontrollämnena*

Ett tillräckligt antal vävnadsbitar ska användas för varje behandling och för kontroller (minst tre bitar per körning). För vätskor och fasta ämnen måste en tillräcklig mängd av testämnet appliceras för att täcka epidermisytan med ett jämnt lager, men en infinit dos måste undvikas (se definitionerna i punkt 1.2), dvs. minst 25 µL/cm^2 eller 25 mg/cm^2 ska användas. När fasta ämnen används ska epidermisytan fuktas med avjoniserat eller destillerat vatten före applicering för att skapa en god hudkontakt. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint puder. Vid slutet av exponeringsperioden ska testämnet noggrant tvättas bort från epidermisytan med buffrad vattenlösning eller 0,9 % NaCl. Beroende på den modell av rekonstruerad human hud som används kan exponeringstiden variera mellan 15 och 60 minuter, och inkubationstemperaturen ska vara mellan 20 och 37 °C. Se standarddriftsförfarandena (Standard Operation Procedures) för de tre metoderna för närmare detaljer (21, 22, 23).

NC och positivkontroller (PC) ska användas jämsides för varje undersökning för att visa att viabiliteten (NC), barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. Det föreslagna PC-ämnet är 5 % vattenlöslig SDS. De föreslagna NC-ämnena är vatten eller fosfatbuffrad saltlösning (PBS).

1.6.1.4 *Mätningar av cellviabilitet*

Den viktigaste faktorn i testproceduren är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testämnet, utan efter det att de sköljda vävnaderna genomgått en tillräckligt lång inkubationstid efter behandlingen i ett färskt medium. Under denna tid kan vävnaden återhämta sig från svagt irriterande effekter och uppkomsten av tydliga cytotoxiska effekter kan visa sig. Under testoptimeringsfasen (9, 10, 11, 12, 13) har en inkubationstid på 42 timmar efter behandlingen visat sig vara optimal och användes därför i valideringen av referenstestmetoderna.

Bestämningsmetoden "MTT conversion" är en kvantitativ validerad metod som bör användas för att mäta cellviabiliteten. Den går att använda på en tredimensionell vävnadsmodell. Hudprovet placeras i en MTT-lösning med lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. Den kondenserade blå formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, surt isopropanol), och koncentrationen av formazan mäts genom att fastställa OD vid 570 nm med ett bandpass på högst ± 30 nm.

Testämnets optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testämnet kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när ett visst testämne inte avlägsnas fullständigt från huden genom sköljning eller när det penetrerar överhuden. Om testämnet reagerar direkt på MTT, är naturligt färgat eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och rätta till testämnets störande inverkan på tekniken för att mäta viabiliteten. En detaljerad beskrivning av hur man testar MTT-reduktion ges i testmetodprotokollet för de validerade referensmetoderna (21, 22, 23). Icke-specifik färgning (NSC) på grund av dessa störningar får inte överstiga 30 % av NC (för korrigeringar). Om NSC är > 30 % anses testämnet vara inkompatibelt med testet.

1.6.1.5 *Godkännandekriterier för bestämning*

För varje bestämning där korrekta satser används (se punkt 1.6.1.2.5) ska de vävnader som behandlats med NC visa ett OD som avspeglar kvaliteten på vävnaderna. Alla transport- och mottagningsförfaranden och hela irritationsprotokollprocessen måste följas. OD-värdena från kontrollerna får inte understiga historiskt fastställda lägre gränser. Likaså ska vävnader som behandlats med PC, dvs. 5 % vattenlöslig SDS, återspegla den sensitivitet som vävnaderna fortfarande har och deras förmåga att reagera på ett irriterande ämne under de förhållanden som föreligger vid varje enskild bestämning (t.ex. viabilitet ≤ 40 % för den validerade referensmetoden 1, och ≤ 20 % för den validerade referensmetoden 2). Lämpliga mått för variationerna mellan vävnadsbitarna bör fastställas (om t.ex. standardavvikelser används ska de vara ≤ 18 %).

2. **DATA**

2.1 DATA

För varje behandling ska data från enskilda testprover av vävnadsbitar (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testämne, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade experiment. Dessutom ska medelvärden ± standardavvikelser för varje försök rapporteras. Observerad interaktion med MTT-reagenser och färgade testämnen ska rapporteras för varje testat ämne.

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

De OD-värden som erhålls för varje testprov kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med NC, som fastställs till 100 %. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testämnen från icke-klassificerade testämnen, och det eller de statistiska förfaranden som tillämpas för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska tydligt definieras och dokumenteras och ska vara bevisat lämpliga. Gränsvärdena för att beräkna irritation i samband med de validerade referensmetoderna anges nedan:

Testämnet anses vara hudirriterande i enlighet med FN:s GHS-kategori 2

i) om vävnadens viabilitet efter exponering och inkubation efter behandling är lägre än eller är lika med (≤) 50 %.

Testsubstansen anses inte tillhöra någon kategori

ii) om vävnadens viabilitet efter exponering och inkubation efter behandling är högre än (>) 50 %.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORTER

Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollämnen:

— Kemisk/a benämning/ar, såsom IUPAC- eller CAS-benämningar och CAS-nummer, om det är känt.

— Ämnets renhet och sammansättning (i procent per vikt).

— De fysisk-kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, stabilitet och flyktighet, pH-värde och vattenlöslighet, om det är känt).

— Eventuell behandling av test-/kontrollämnena före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

— Lagringsförhållanden.

Motivering för den hudmodell och det protokoll som använts.

Testförhållanden:

— Använt cellsystem.

— Kalibreringsinformation för mätapparaten och bandpasset som använts för att mäta cellviabiliteten (t.ex. spektrofotometer).

— Fullständig styrkande information för den specifika hudmodell som använts, inklusive modellens prestanda. Detta ska bland annat omfatta följande punkter:

  i) Viabilitet.

  ii) Barriärfunktion.

  iii) Morfologi.

  iv) Reproducerbarhet och förutsägbarhet.

  v) Utförda kvalitetskontroller av modellen.

— Använd testprocedur.

— Använda testdoser, exponeringens varaktighet och inkubationstid efter behandlingen.

— Beskrivning av eventuella ändringar av testproceduren.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Detta ska bland annat omfatta följande punkter:

i) Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolluppgifterna är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.

ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa medelvärden och värdeområden.

— Beskrivning av använda utvärderingskriterier, inklusive motivering av valet av gränsvärde/n för förutsägbarhetsmodellen.

Resultat:

— Tabelluppställning med data från enskilda testprover.

— Beskrivning av andra observerade effekter.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **LITTERATUR**

1. Förenta nationerna (FN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2007. Finns på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.

2. Reach: Riktlinjer om informationskrav och kemisk säkerhetsbedömning. Finns på: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649.

3. Testmetod B.4. AKUT TOXITITET, HUDIRRITATION/KORROSION.

4. Testmetod B.40. IN VITRO HUDKORROSION: TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST (TER).

5. Testmetod B.40 BIS. IN VITRO HUDKORROSION: TEST MED MODELL AV HUMAN HUD.

6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Antagen den 19 juli 2006. Finns på: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.

7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Finns under "Download Study Documents", på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 15, 57–93.

9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology *in Vitro* 16, 765–770.

10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. ALTEX 21, 107–114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351–367.

12. Cotovio, J., Grandidier, M.–H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329–249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30,109–129.

14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.

15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. s. 135 och framåt + bilagor. Finns under ”Download Study Documents”, på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.

17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. vol.14, 351–358.

18. ESAC:s uttalande om uppdaterade EpiDerm och liknande SkinEthic-bestämningar, den 5 november 2008.

19. Europeiska kommissionen (2006). Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG. *Europeiska unionens officiella tidning*, L 396, 30.12.2006 s. 1, publikationsbyrån, Luxemburg.

20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63.

21. EpiSkin™ SOP, version 1.6 (januari 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test – 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Finns under ”Download Study Documents”, på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

22. EpiDerm™ SOP, version 5.0 (oktober 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Finns under ”Download Study Documents”, på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

23. SkinEthic RHE™ SOP. Kommer att finnas tillgänglig under ”Download Study Documents”, på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

24. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., Maibach, H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, s. 7–18.

25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline, Ispra, den 13 november 2008.

Tillägg

Utvärdering av prestandaegenskaperna hos de föreslagna in vitro-modellerna av rekonstruerad human hud för hudirritation

INLEDNING

De procedurer som föreslås för användning för denna testmetod ska utvärderas för att avgöra deras tillförlitlighet och exakthet genom att använda ämnen som representerar hela urvalet av Draizes irritationspoäng. När modellen utvärderas med hjälp av de 20 rekommenderade referensämnena (tabell 2) ska de föreslagna procedurerna uppvisa tillförlitlighets- och exakthetsvärden som är jämförbara med värdena för den validerade referensmetoden 1 (tabell 3) (1). De standarder för exakthet och tillförlitlighet som ska uppfyllas anges i punkterna II och III nedan. Icke-klassificerade och klassificerade ämnen (FN:s GHS-kategori 2) som representerar relevanta kemiska klasser ska inbegripas, så att tillförlitlighet och prestanda (sensitivitet, specificitet, falska negativa värden och falska positiva värden samt exakthet) för den föreslagna testmetoden kan jämföras med värdena för den validerade referensmetoden 1. Testmetodens tillförlitlighet och metodens användbarhet för att korrekt identifiera irriterande ämnen i FN:s GHS-kategori 2 ska fastställas innan modellen börjar användas för att testa nya ämnen.

PRESTANDASTANDARDER

Prestandastandarderna består av följande tre faktorer: I) testmetodens grundläggande komponenter, II) referensämnen och III) definierade värden för exakthet och tillförlitlighet (2). Prestandastandarderna baseras på de prestandastandarder som definieras efter slutförande av ECVAM:s valideringsundersökning om hudirritation (3).

I) **Testmetodens grundläggande komponenter**

Allmänna villkor för modellen

Normala humana keratinocyter ska användas för att konstruera epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basala lager, taggcellslager och granulära lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera lager som har den nödvändiga lipidprofilen för att producera en barriärfunktion som är stark nog att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörämnen, t.ex. natriumdodekylsulfat (SDS) eller Triton X-100. Barriärfunktionen kan antingen analyseras genom att fastställa den koncentration vid vilken ett markörämne minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fastställd exponeringstid, eller genom att fastställa den exponeringstid som krävs för att minska cellernas viabilitet med 50 % (ET_{50}) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markörämnet. Modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att materialet kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en dålig modellering av hudexponeringen. Hudmodellen ska vara fri från föroreningar av bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

Funktionsvillkor för modellen

Viabilitet

Den lämpligaste bestämningsmetoden för att fastställa viabiliteten är MTT (4). Den optiska densiteten (OD) av det (lösta) färgämnet som extraherats från den vävnad som behandlats med negativkontrollen (NC) bör vara minst 20 gånger större än den OD som konstaterats enbart för extraktionslösningsmedlet. Det ska dokumenteras att den vävnad som behandlas med NC är en stabil kultur (den ska uppvisa liknande viabilitetsmått) under hela testexponeringstiden.

Barriärfunktion

Hornlagret och dess lipida sammansättning ska vara tillräckliga för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörämnen, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt beräkningar av IC_{50} eller ET_{50}.

Morfologi

En histologisk undersökning av den rekonstruerade huden/epidermis ska genomföras av lämpligt kvalificerad personal och ska uppvisa en struktur som liknar mänsklig hud/epidermis (inklusive flerlagrigt hornlager).

Reproducerbarhet

Resultaten av en metod där en specifik modell används ska visa reproducerbarhet över tiden, företrädesvis genom ett lämpligt satskontrollämne (referensämne) (se definitionerna i avsnitt 1.2).

Kvalitetskontroller av modellen

Varje sats av den epitelmodell som används måste uppfylla fastställda kriterier för utsläppande till produktion, varav kriterierna för *viabilitet* och för *barriärfunktionen* är de mest relevanta. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC_{50} eller ET_{50} ska fastställas av leverantören av hudmodellen (eller en forskare om en intern modell används). Vävnadens barriäregenskaper ska verifieras av laboratoriet efter mottagande av vävnaderna. Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för en tillförlitlig beräkning av irritationseffekter. De godkända värdena för de validerade referensmetoderna visas i exemplet nedan.

Tabell 1

Exempel på kriterier för kvalitetskontroll för utsläppande av en sats

	Nedre gräns för godkännande	Medelvärde för godkännande	Övre gräns för godkännande
Validerad referensmetod 1 (18 timmars behandling med SDS)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Validerad referensmetod 2 (1 % Triton X100)	ET_{50} = 4,8 tim	ET_{50} = 6,7 tim	ET_{50} = 8,7 tim

II) **Referensämnen**

Referensämnen används för att fastställa om tillförlitligheten och exaktheten hos en föreslagen ny in vitro-testmodell av rekonstruerad human hud, som strukturellt och funktionellt har visat sig vara tillräckligt lik de validerade referensmetoderna, eller som utgör en mindre ändring av en validerad referensmetod, uppvisar en prestanda som är jämförbar med prestandan hos den validerade referensmetoden 1 (1). De 20 referensämnen som anges i tabell 2 innehåller ämnen som representerar olika kemiska klasser av intresse, samt ämnen i FN:s GHS-kategori 2. Förteckningen utgörs av 10 ämnen i FN:s GHS-kategori 2, 3 ämnen i FN:s valfria GHS-kategori 3 och 7 icke-kategoriserade ämnen. I denna testmetod betraktas den valfria kategori 3 som ingen kategori. Dessa referensämnen representerar det minsta antal ämnen som ska användas för att bedöma exaktheten och tillförlitligheten hos en föreslagen testmetod med rekonstruerad human hud för hudirritationer. I situationer där ett listat ämne inte finns tillgängligt kan andra ämnen som det finns adekvata in vivo-referensdata för användas. Om man vill kan ytterligare ämnen från andra kemiska klasser och som det finns adekvata in vivo-referensdata för läggas till minimiförteckningen med referensämnen för att ytterligare utvärdera den föreslagna testmetodens exakthet.

Tabell 2

Referensämnen för fastställande av exakthets- och tillförlitlighetsvärden för modeller av rekonstruerad human hud för att mäta hudirritation

Ämne (*)	CAS-nr	Einecs-nr	Fysiskt tillstånd	In vivo-poäng	GHS in vitro kat.	GHS in vivo kat.
1-bromo-4-klorobutan	6940-78-9	230-089-3	L	0	Kat. 2	Ingen kat.
dietylftalat	84-66-2	201-550-6	L	0	Ingen kat.	Ingen kat.
naftalenättiksyra	86-87-3	201-705-8	S	0	Ingen kat.	Ingen kat.
allyl-fenoxy-acetat	7493-74-5	231-335-2	L	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	200-661-7	L	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
4-metyl-thio-benzaldehyd	3446-89-7	222-365-7	L	1	Kat. 2	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	203-990-4	S	1	Ingen kat.	Ingen kat.

Ämne (*)	CAS-nr	Einecs-nr	Fysiskt tillstånd	In vivo-poäng	GHS in vitro kat.	GHS in vivo kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	227-526-5	L	1,7	Ingen kat.	Valfri kat. 3
hexyl-salicylat	6259-76-3	228-408-6	L	2	Ingen kat.	Valfri kat. 3
triisobutylfosfat	126-71-6	204-798-3	L	2	Kat. 2	Valfri kat. 3
1-decanol	112-30-1	203-956-9	L	2,3	Kat. 2	Kat. 2
cyklamenaldehyd	103-95-7	203-161-7	L	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromohexan	111-25-1	203-850-2	L	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klorometyl-3,5-dimetyl-4-metoxypyridin hydroklorid	86604-75-3	434-680-9	S	2,7	Kat. 2	Kat. 2
a-terpineol	98-55-5	202-680-6	L	2,7	Kat. 2	Kat. 2
di-n-propyl disulfid	629-19-6	211-079-8	L	3	Nr. kat.	Kat. 2
butylmetakrylat	97-88-1	202-615-1	L	3	Kat. 2	Kat. 2
benzenethiol, 5–(1,1-dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	438-520-9	L	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	431-180-2	S	3,3	Kat. 2	Kat. 2
heptanal	111-71-7	203-898-4	L	4	Kat. 2	Kat. 2

(*) De 20 referensämnena består av ett representativt urval från de 58 ämnen som ursprungligen användes för att validera referensmetod 1 (EpiSkin™). Det finns en fullständig företeckning över testämnen och urvalskriterier för dessa (5).

De ämnen som anges i tabell 2 utgör en representativ fördelning av de 58 ämnen som används i ECVAM:s internationella valideringsundersökning av hudirritationer (1). Urvalet baseras på följande kriterier:

— Ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga.

— De ska vara representativa för hela urvalet av Draizes irritationspoäng (från ej irriterande till starkt irriterande).

— De ska ha en väldefinierad kemisk struktur.

— De ska vara representativa för den validerade metodens reproducerbarhet och förutsägande kapacitet enligt ECVAM:s valideringsundersökning.

— De ska vara representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen.

— De ska inte ha en extremt toxisk profil (t.ex. cancerogena eller toxiska för det reproduktiva systemet) och de får inte medföra prohibitiva kostnader för bortskaffande.

III) **Definierade värden för exakthet och tillförlitlighet**

Den föreslagna testmodellens prestanda (sensitivitet, specificitet, falskt negativt värde, falskt positivt värde och exaktheta) ska vara jämförbara med värdena för den validerade referensmetoden 1 (tabell 3), dvs. sensitiviteten ska vara lika med eller högre (≥) än 80 %, specificiteten ska vara lika med eller högre (≥) än 70 %, och exaktheten ska vara lika med eller högre (≥) än 75 %. Beräkningen av prestanda ska göras genom att använda alla klassificeringar som har erhållits för de 20 ämnena i de deltagande laboratorierna. Klassificeringen av varje ämne vid varje laboratorium ska göras genom att använda viabilitetsmedelvärdet för de olika körningar som gjorts (minst tre godkända körningar).

Tabell 3

Prestanda för validerad referensmetod 1 [1]

Testmetod	Antal ämnen	Sensitivitet	Specificitet	Falskt negativt värde	Falskt positivt värde	Exakthet
Validerad referensmetod 1 [1]	58	87,2 % [2]	71,1 % [3]	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Validerad referensmetod 1 [1]	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

[1] EpiSkin™.
[2] Baserat på 13 irriterande ämnen i GHS-kategori 2.
[3] Baserat på 45 irriterande ämnen som ingår i GHS-kategori 3 eller som inte är kategoriserade i GHS.

Den föreslagna testmetodens tillförlitlighet ska vara jämförbar med de validerade referensmetodernas tillförlitlighet.

Reproducerbarhet inom laboratorier

En utvärdering av variationerna inom laboratorier bör visa en konkordans för klassificeringarna (kategori 2/ingen kategori) som fås fram i olika och oberoende testkörningar av de 20 referensämnena vid ett enda laboratorium. De ska vara lika med eller högre (≥) än 90 %.

Reproducerbarhet mellan laboratorier

En utvärdering av reproducerbarheten mellan laboratorier är inte nödvändig om den föreslagna testmetoden endast ska användas vid ett laboratorium. För metoder som ska överföras mellan laboratorier ska den konkordans för klassificeringarna (kategori 2/ingen kategori) som fås fram i olika och oberoende testkörningar av de 20 referensämnena mellan företrädesvis minst tre laboratorier vara lika med eller högre (≥) än 80 %.

LITTERATUR

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.

2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.

3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Finns under "Download Study Documents", på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu. Finns tillgänglig från den 27.10.2008.

4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007). ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.

[1] I tabell 3 anges prestanda för den validerade referensmetoden 1 med avseende på dess förmåga att korrekt identifiera irriterande ämnen (FN:s GHS-kategori 2) och icke-klassificerade ämnen (ingen kategori, inklusive valfri kategori 3) för de 58 respektive 20 referensämnena (tabell 2).

BILAGA IV

C.3 **BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS SÖTVATTENSALGER OCH CYANOBAKTERIER**

1. **METOD**

Metoden motsvarar OECD TG 201 (2006) (1).

1.1 INLEDNING

Testmetoder utvärderas och moderniseras med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. Det var nödvändigt att revidera metoden C.3 för att ta med ytterligare arter och för att uppfylla kraven beträffande farobedömning och klassificering av kemikalier. Revideringen har gjorts på grundval av tre faktorer: en betydande praktisk erfarenhet, den vetenskapliga utvecklingen när det gäller toxicitetstester på alger, samt en omfattande användning av den tidigare versionen av dokumentet för normerande ändamål.

1.2 DEFINITIONER

I denna metodbeskrivning används följande definitioner och förkortningar:

biomassa: torrvikten av all levande substans i en population, uttryckt per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Biomassa definieras vanligen som en massa, men i det här testet används alltså i stället massa/volym. Begreppet biomassa används också i testet för att ange resultatet av alternativa mätmetoder, t.ex. cellräkning och mätning av fluorescens.

variationskoefficient: dimensionslöst mått på en parameters variabilitet, definierat som förhållandet mellan standardavvikelsen och medelvärdet. Detta kan också uttryckas i procent. Variationskoefficientens medelvärde för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten beräknas enligt följande:

1. Beräkna variationskoefficienten (i procent) för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten utifrån de dagliga sektionsvisa tillväxthastigheterna för respektive replikat.

2. Beräkna medelvärdet för alla värden som erhållits i punkt 1 för att få fram den genomsnittliga variationskoefficienten för den dagliga sektionsvisa specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten.

EC_x: den koncentration av testsubstansen, löst i testmediet, som minskar testorganismens tillväxt med x % (t.ex. 50 %) inom en bestämd exponeringstid (som tydligt måste anges om man avviker från den fulla eller normala testperioden). För att man entydigt ska kunna skilja ett EC-värde som härletts ur tillväxthastigheten från ett som härletts ur den producerade mängden biomassa används symbolerna ”E_rC” resp. ”E_yC”.

odlingsmedium: det kompletta syntetiska medium som algerna växer i när de exponeras för testsubstansen. Testsubstansen är vanligen löst i testmediet.

tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): den logaritmiska ökningen av biomassan under exponeringstiden.

lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – ”Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testsubstansen har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla koncentrationer av testsubstansen som överstiger LOEC måste dock ha en negativ effekt som är minst lika stor som den som observeras vid LOEC. Om dessa båda villkor inte är uppfyllda måste en fullständig redogörelse lämnas för hur LOEC (och därmed NOEC) har valts.

högsta koncentration utan observerad effekt (NOEC – ”No Observed Effect Concentration”): den koncentration av testsubstansen som ligger omedelbart under LOEC.

responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. I den aktuella testmetoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som erhålls genom att biomassan mäts antingen direkt eller genom någon av de angivna alternativa mätmetoderna.

specifik tillväxthastighet: responsvariabel som definieras som kvoten av skillnaden mellan de naturliga logaritmerna för en observerad parameter (i den här testmetoden: biomassa) och motsvarande tidsperiod.

producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden, använt som ett mått på ökningen av biomassa under testet.

1.3 TESTETS TILLÄMPLIGHET

Testmetoden är lättast att tillämpa på vattenlösliga ämnen som under testförhållandena sannolikt kommer att stanna kvar i vattnet. Om man i stället vill testa ämnen som är flyktiga, starkt adsorberande, färgade, svårlösliga i vatten eller som kan påverka tillgången på näringsämnen och mineraler i testmediet kan det krävas vissa modifieringar av den beskrivna metoden (t.ex. slutna system, andra typer av testkärl). Några exempel på lämpliga modifieringar ges i (2)(3) och (4).

1.4 TESTPRINCIP

Syftet med testet är att bestämma vilka effekter ett visst ämne har på tillväxten hos sötvattenslevande mikroalger och cyanobakterier. De exponentiellt växande testorganismerna exponeras för testsubstansen i batchkulturer under en tidsperiod på vanligen 72 timmar. Trots att testperioden är relativt kort kan effekterna på flera generationer bedömas.

Systemets respons innebär att tillväxten i en serie algkulturer (testenheter) som exponeras för olika koncentrationer av en testsubstans minskar. Responsen betraktas som en funktion av exponeringskoncentrationen jämfört med den genomsnittliga tillväxten för icke-exponerade kontrollreplikat. För att testsystemet ska kunna ge full respons på en toxisk testsubstans (optimal känslighet) får kulturerna tillväxa exponentiellt utan några begränsningar, samt med tillräcklig näringstillgång och i kontinuerligt ljus, under den tid som krävs för att minskningen i specifik tillväxthastighet ska bli mätbar.

Tillväxtens och tillväxtminskningens storlek bestäms genom mätningar av algbiomassans förändring över tiden. Algbiomassa definieras som torrvikten alger per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Torrvikt är dock svårt att mäta, varför man kan använda sig av olika alternativa parametrar. Bland dessa är celltal vanligast. Andra alternativa parametrar är cellvolym, fluorescens och absorbans. Omräkningsfaktorn mellan uppmätt värde för den alternativa parametern och biomassa ska vara känd.

Som effektmått för testet används tillväxtminskning, där tillväxt definieras som den logaritmiska ökningen av biomassan (genomsnittlig specifik tillväxthastighet) under exponeringstiden. Från de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som uppmätts i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testsubstansen som ger upphov till en viss, fastställd minskning av tillväxthastigheten, x % (t.ex. 50 %). Värdet uttrycks som E_rC_x (t.ex. E_rC_{50}).

För tillämpning av denna metod inom ramen för EU-lagstiftningen bör resultatberäkningen baseras på en genomsnittlig specifik tillväxthastighet av de skäl som anges i avsnitt 2.2 nedan. I den här testmetoden används även producerad mängd biomassa som responsvariabel, något som kan vara nödvändigt för att uppfylla gällande krav i vissa länder. Denna responsvariabel definieras som skillnaden i biomassa mellan exponeringstidens början och slut. Med utgångspunkt i den mängd biomassa som producerats i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testsubstansen som ger upphov till en viss, fastställd minskning av mängden producerad biomassa, x % (t.ex. 50 %). Detta värde uttrycks som E_yC_x (t.ex. E_yC_{50}).

Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

1.5 TESTSUBSTANS

Uppgifter om testsubstansen kan vara av värde då man bestämmer testförhållandena. Exempel på sådana uppgifter är strukturformel, renhetsgrad, ljusbeständighet, stabilitet under testbetingelserna, ljusabsorberande förmåga, pKa, samt resultat från undersökningar av ämnets omvandling – bland annat genom biologisk nedbrytning – i vatten.

Testsubstansens vattenlöslighet, fördelningskoefficient oktanol/vatten (P_{ow}) och ångtryck ska vara kända, och det ska finnas en validerad metod för kvantitativ bestämning av ämnet i testlösningarna. Metodens utbyte och detektionsgräns ska vara kända.

1.6 REFERENSSUBSTANS

Referenssubstanser, t.ex. 3,5-diklorfenol, som används i det internationella ringtestet (4), kan testas för att kontrollera testförfarandet. För grönalger kan även kaliumdikromat användas som referenssubstans. Referenssubstanser bör testas minst två gånger per år.

1.7 RESULTATENS GILTIGHET

För att testresultaten ska vara giltiga måste följande villkor vara uppfyllda:

— Biomassan i kontrollkulturerna ska ha ökat exponentiellt med minst en faktor 16 inom testperioden (72 timmar). Detta motsvarar en specifik tillväxthastighet på 0,92/dygn. De mest använda arterna har vanligen en betydligt högre tillväxthastighet (se tillägg 1). Kravet kan dock inte alltid uppfyllas när man använder sig av arter som växer långsammare än de i tillägg 1. Testperioden ska då förlängas så att man erhåller en minst 16-faldig tillväxt i kontrollkulturerna, och tillväxten måste vara exponentiell under hela testperioden. Testperioden kan även förkortas ända ner till 48 timmar om detta krävs för att uppnå obegränsad exponentiell tillväxt under testet. Ett villkor för detta är dock att tillväxten är minst 16-faldig.

— Variationskoefficientens medelvärde för sektionsvis specifika tillväxthastigheter (dag 0–1, 1–2 och 2–3 för 72-timmarstester) i kontrollkulturerna (se avsnitt 1.2 under ”variationskoefficient”) får inte överskrida 35 %. I andra stycket i avsnitt 2.2.1 beskrivs hur man beräknar sektionsvis specifik tillväxthastighet. Detta kriterium tillämpas på medelvärdet för de variationskoefficienter som räknats fram för kontrollreplikaten.

— I tester med *Pseudokirchneriella subcapitata* och *Desmodesmus subspicatus* får variationskoefficienten för genomsnittlig specifik tillväxthastighet i kontrollreplikaten inte överskrida 7 % under hela testperioden. För arter som inte används så ofta i testsammanhang får värdet inte överstiga 10 %.

1.8 METODBESKRIVNING

1.8.1 **Utrustning**

Testkärl och annan utrustning som kommer i kontakt med testlösningarna ska vara helt av glas eller annat kemiskt inert material. Utrustningen ska rengöras omsorgsfullt så att inga organiska eller oorganiska föroreningar påverkar algernas tillväxt eller testlösningarnas sammansättning.

Som testkärl används vanligen glaskolvar som rymmer en tillräckligt stor volym algkultur för att möjliggöra mätningar under testet. Kolvarna ska också medge ett tillräckligt högt utbyte av CO_2 med den omgivande luften (se andra stycket i avsnitt 1.8.9). Observera att vätskevolymen måste vara tillräckligt stor för analytiska bestämningar (se femte stycket i avsnitt 1.8.11).

Följande utrustning krävs också (helt eller delvis):

— Odlingsutrymme. Man bör använda ett odlingsskåp eller en odlingskammare där inkuberingstemperaturen kan regleras med en noggrannhet av ± 2 °C.

— Instrument för ljusmätning. Observera att mätvärdena för ljusintensitet påverkas av mätmetoden, särskilt typen av ljussensor. Mätningarna bör helst göras med en sfärisk (4 π) sensor (som mäter både direkt och reflekterat ljus från alla vinklar ovanför och under mätplanet), eller en 2 π-sensor (som mäter ljus från alla vinklar ovanför mätplanet).

— Utrustning för att bestämma algbiomassa. Cellräkning, som är den oftast använda alternativa mätmetoden för algbiomassa, kan utföras med elektronisk partikelräknare, mikroskop utrustat med räknekammare eller flödescytometer. Andra alternativa parametrar för biomassa kan mätas med hjälp av flödescytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Man bör helst ta reda på omräkningsfaktorn mellan celltal och torrvikt. När koncentrationen av biomassa är låg kan det vid spektrofotometriska mätningar vara nödvändigt att använda sig av kyvetter med en strålgång på minst 4 cm för att få fram användbara mätvärden.

1.8.2 **Testorganismer**

Ett stort antal arter av icke-fastsittande mikroalger och cyanobakterier kan användas för testet. En förteckning över lämpliga stammar återfinns i tillägg 1.

Om man använder sig av andra arter ska stammen och/eller ursprunget anges. Man måste också kunna visa att de alger som används kan tillväxa exponentiellt under hela testperioden vid rådande testförhållanden.

1.8.3 **Odlingsmedium**

Det rekommenderas att man använder antingen OECD eller AAP som odlingsmedium. Sammansättningen av dessa medier framgår av tillägg 2. Observera att de två medierna har olika utgångsvärde för pH och olika buffringsförmåga (motverkar pH-ökningar), vilket gör att de kan ge olika testresultat. Detta gäller särskilt när man testar joniserande ämnen.

Det kan ibland vara nödvändigt att modifiera odlingsmedierna, t.ex. då man testar metaller eller kelatbildare, eller då testerna görs vid skilda pH-värden. Man ska alltid ange skälen till en sådan modifiering, och det modifierade mediet ska beskrivas i detalj (3)(4).

1.8.4 **Biomassans startkoncentration**

Biomassans startkoncentration ska vara densamma för alla testkulturer. Den ska också vara tillräckligt låg för att möjliggöra exponentiell tillväxt under hela inkuberingen utan att några näringsämnen tar slut. Startvärdet får inte överskrida 0,5 mg/l, räknat på torrvikt. Följande cellkoncentrationer bör användas:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3–10^4	celler/ml
Desmodesmus subspicatus	2–5×10^3	celler/ml
Navicula pelliculosa	10^4	celler/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	celler/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4–10^5	celler/ml

1.8.5 **Testsubstansens koncentration**

Det koncentrationsintervall där det är troligt att testsubstansen ger effekter kan bestämmas på grundval av resultat från särskilda tester (”range-finding tests”). För det slutliga testet används minst fem koncentrationer i en geometrisk serie vars faktor inte överstiger 3,2. För testsubstanser med plan dos-respons-kurva kan det vara befogat att använda en högre faktor. Koncentrationsserien bör helst omfatta ett intervall som minskar tillväxthastigheten med 5–75 %.

1.8.6 **Replikat och kontroller**

För varje koncentration av testsubstansen ska det finnas tre replikat. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Minst tre kontrollreplikat ska användas, och helst bör de vara dubbelt så många som antalet replikat för varje koncentration av testsubstansen.

En extra serie testlösningar kan beredas för analytisk bestämning av testsubstansens koncentration (se fjärde och sjätte stycket i avsnitt 1.8.11).

Om ett lösningsmedel används för testsubstansen måste man ta med ytterligare kontroller där koncentrationen av lösningsmedel är densamma som i testkulturerna.

1.8.7 **Beredning av ympkultur**

En ympkultur bereds i testmedium 2–4 dagar innan testet påbörjas. Syftet med detta är att algerna ska kunna anpassa sig till testförhållandena och befinna sig i exponentiell tillväxtfas när de senare ympas i testlösningarna. Algbiomassan regleras så att ympkulturen fortsätter att tillväxa exponentiellt till dess att testet inleds. Ympkulturen inkuberas under samma förhållanden som testkulturerna. En mätning görs av ökningen av ympkulturens biomassa, så att man kan förvissa sig om att tillväxten befinner sig inom det normala intervallet för den använda stammen under rådande odlingsbetingelser. I tillägg 3 ges ett exempel på en metod för algodling. Det kan krävas ett andra förökningssteg för ympkulturen om man vill undvika att celldelningarna under testet sker synkront.

1.8.8 **Beredning av testlösningar**

Alla testlösningar ska innehålla samma koncentration av odlingsmediet, och samma startkoncentration av algbiomassan. Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds vanligen genom att man blandar en stamlösning av testsubstansen med odlingsmedium och ympkultur. Stamlösningar brukar beredas genom att man löser ämnet i fråga i testmedium.

Lösningsmedel som aceton, tert-butylalkohol och dimetylformamid kan användas som bärare när man tillsätter ämnen med låg vattenlöslighet till testmediet (2)(3). Koncentrationen av lösningsmedel ska inte överstiga 100 µl/l, och det tillsatta lösningsmedlet ska vara av samma koncentration för alla kulturer (inklusive kontroller) i testserien.

1.8.9 **Inkubering**

Testkärlen försluts med luftgenomsläppliga proppar, skakas om, och placeras sedan i odlingsutrymmet. För att hålla algerna i suspension under hela testet och för att säkra ett tillräckligt stort utbyte av CO_2 måste kärlen hela tiden skakas eller innehållet röras om. Kulturerna inkuberas vid 21–24 °C, och temperaturen ska kunna regleras med en noggrannhet av ± 2 °C. När det gäller arter som inte förtecknas i tillägg 1 (t.ex. tropiska arter) kan det vara lämpligt med en högre temperatur. Detta förutsätter dock att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. Kolvarna bör placeras slumpvis i inkubatorn och sedan flyttas om dagligen.

Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. När det gäller metaller samt ämnen som delvis joniseras vid det använda pH-värdet, kan det vara nödvändigt att justera för pH-förändringar för att få fram reproducerbara och tydliga resultat. Det går att begränsa pH-svängningar till mindre än 0,5 enheter om man ser till att utbytet av CO_2 mellan testlösningen och den omgivande luften är tillräckligt högt, t.ex. genom att öka skakapparatens hastighet. En annan möjlighet är att reducera behovet av CO_2 genom att minska biomassans startkoncentration eller testets längd.

Den yta där kulturerna inkuberas ska kontinuerligt belysas med fluorescerande ljus av enhetligt slag, t.ex. kallt vitt ljus eller dagsljus. Olika stammar av alger och cyanobakterier kan ha olika ljuskrav, och ljusets intensitet ska anpassas efter den testorganism som används. För de rekommenderade grönalgsarterna ska intensiteten, mätt vid testlösningarna, ligga inom intervallet 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ när mätningen görs i det fotosyntetiskt verksamma våglängdsområdet 400–700 nm med lämplig sensor. Vissa arter, särskilt *Anabaena flos-aquae*, tillväxer utan problem vid låga ljusintensiteter och kan även skadas av höga intensiteter. För sådana arter ska den genomsnittliga ljusintensiteten ligga på 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (För mätinstrument som kalibrerats i lux motsvarar den rekommenderade ljusintensiteten 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ för kallt vitt ljus ungefär 4 440–8 880 lux.) Ljusintensiteten över inkuberingsytan får inte variera mer än ± 15 % jämfört med genomsnittsvärdet.

1.8.10 **Testets varaktighet**

Testet ska normalt pågå i 72 timmar. Man kan dock använda kortare eller längre testperioder, förutsatt att samtliga kriterier för testresultatens giltighet i avsnitt 1.7 är uppfyllda.

1.8.11 **Mätningar och analytiska bestämningar**

Algbiomassan i varje kolv bestäms minst en gång per dag under testperioden. Om mätningarna görs på små volymer som pipetterats från testlösningarna ska dessa volymer inte ersättas.

Biomassan bestäms genom manuell cellräkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare (mätning av celltal eller biovolym). Alternativa metoder, t.ex. flödescytometri, klorofyllfluorescens *in vitro* eller *in vivo* (6)(7) och absorbans kan också användas, förutsatt att man kan påvisa en tillfredsställande korrelation med biomassan för de värden på densamma som kan förekomma i testet.

Lösningarnas pH mäts i början och slutet av testet.

Om det finns en analytisk bestämningsmetod för testsubstansen i det valda koncentrationsintervallet ska testlösningarna analyseras för att kontrollera startkoncentrationerna och för att se till att exponeringskoncentrationerna inte förändras under testet.

Om det är troligt att exponeringskoncentrationerna under testet kommer att variera med mindre än 20 % från de nominella värdena kan det räcka med att man i början och slutet av testet bestämmer testsubstansens koncentration på tre nivåer: en hög koncentration, en låg koncentration, och en koncentration runt det förväntade EC_{50}-värdet. Om koncentrationerna av testsubstansen sannolikt inte kommer att hålla sig inom 80–120 % av de nominella värdena bör man i stället bestämma samtliga koncentrationer av testsubstansen vid testets början och slut. För flyktiga, instabila eller starkt adsorberande testsubstanser bör ytterligare prov för analys tas med 24 timmars mellanrum under hela exponeringstiden. På så vis får man ett säkrare mått på hur mycket testsubstans som försvinner. Sådana ämnen kräver också att man använder extra replikat. Under alla omständigheter behöver bestämningar av testsubstansens koncentration bara göras på ett replikatkärl för varje koncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat).

Testmedier som beretts särskilt för bestämning av exponeringskoncentrationer under testet ska behandlas på samma sätt som dem som används för tester, dvs. de ympas med alger och inkuberas under identiska förhållanden. Om den lösta testsubstansens koncentration måste bestämmas kan det vara nödvändigt att isolera algerna från mediet. Separeringen bör helst göras genom centrifugering vid lågt g-tal (men tillräckligt högt för att algerna ska kunna avskiljas).

Om man kan visa att testsubstansens koncentration under hela testet på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen, kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen är större än ± 20 % ska analysen i stället grunda sig på det geometriska medelvärdet för koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver hur testsubstansens koncentration minskar (3)(8).

Bestämning av tillväxthämning hos alger är en mer dynamisk metod än de flesta andra akvatiska toxicitetstester med kort testperiod. De faktiska exponeringskoncentrationerna kan därför vara svåra att bestämma, särskilt för adsorberande ämnen som testas vid låga koncentrationer. Om ämnet i sådana fall adsorberas till den ökande algbiomassan och därför inte längre återfinns i lösningen, innebär detta dock inte att ämnet försvinner från testsystemet. Vid analysen av testresultat ska man undersöka om en minskad koncentration av ämnet under testperioden kan korreleras med en reducerad tillväxthämning. Om så är fallet bör man överväga att genom en lämplig modell beskriva testsubstansens minskande koncentration (8). I annat fall kan det vara motiverat att basera resultatanalysen på testsubstansens nominella eller uppmätta startkoncentration.

1.8.12 **Övriga iakttagelser**

Kontrollera i mikroskop att ympkulturen ser normal och frisk ut. I slutet av testet ska man också notera eventuella avvikelser från normalt utseende (som kan ha orsakats av exponeringen för testsubstansen).

1.8.13 **Gränstest**

Under vissa omständigheter, t.ex. när ett förberedande test tyder på att testsubstansen inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l – eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet, om denna gräns är lägre – kan man utföra ett gränstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla tidigare beskrivna testbetingelser och kriterier för provresultatens giltighet gäller även för gränstestet, sånär som på att testreplikaten ska vara minst sex till antalet. Responsvariablerna i kontroll- och testgruppen kan analyseras med hjälp av ett statistiskt test där man jämför medelvärden, t.ex. Students t-test. Om de två grupperna inte har samma varians måste t-testet anpassas efter detta.

1.8.14 **Anpassning för starkt färgade ämnen**

Bestrålningen (ljusets intensitet) bör ligga i den övre delen av det intervall som beskrivs i denna testmetod, dvs. 120μE m-2 s-1 eller högre.

Strålgången bör kortas genom att lösningarnas volym minskas (med mellan 5 och 25 ml).

Man bör sörja för tillräcklig omrörning (till exempel genom måttlig skakning) så att algerna frekvent utsätts för hög ljusbestrålning vid odlingens yta.

2. DATA

2.1 PLOTTNING AV TILLVÄXTKURVOR

Mängden biomassa i testkärlen kan uttryckas i enheten för den alternativa parameter som använts vid mätningen (t.ex. celltal, fluorescens).

De framräknade värdena för biomassans koncentration i testkulturer och kontroller förs in i en tabell, tillsammans med testmaterialets koncentrationer och mättidpunkterna (noterade med en upplösning på minst hela timmar). Tabellvärdena används sedan för att ta fram plottade tillväxtkurvor. Både logaritmiska och linjära skalor kan vara användbara på detta inledande stadium, men logaritmiska skalor är obligatoriska, och de ger också i allmänhet en bättre uppfattning om variationer i tillväxtmönstret under testperioden. Observera att exponentiellt ökande mätvärden ger en rak linje när de plottas på en logaritmisk skala, och att kurvans lutning anger den specifika tillväxthastigheten.

Kontrollera med hjälp av plottarna om kontrollkulturerna har tillväxt exponentiellt och med förväntad hastighet under hela testet. Alla datapunkter och kurvor bör undersökas kritiskt, och rådata samt metoder bör kontrolleras med avseende på eventuella fel. Kontrollera särskilt alla datapunkter som verkar avvika på grund av systematiska fel. Om man konstaterar uppenbara eller mycket sannolika fel i testutförandet ska de berörda datapunkterna markeras som avvikande värden (”outliers”) och inte tas med i den efterföljande statistiska analysen. (Om algkoncentrationen är noll i hälften eller en tredjedel av kärlen med replikat kan detta tyda på att kärlen inte ympats på rätt sätt eller inte rengjorts ordentligt.) Det ska tydligt framgå av testrapporten varför en datapunkt betraktats som avvikande och därför inte använts. Det enda giltiga skälet är (enstaka) misstag i utförandet av testet. Dålig precision räknas däremot inte som ett giltigt skäl. Statistiska metoder för att identifiera avvikande värden är av begränsat värde när det gäller den här typen av problem, och de kan inte ersätta expertbedömningar. Avvikande värden (som markerats som sådana) bör helst behållas bland de datapunkter som visas i senare presentationer av data i grafisk form eller tabellform.

2.2 RESPONSVARIABLER

Syftet med testet är att bestämma testsubstansens effekt på tillväxten hos alger. Eftersom olika medlemsländer har olika prioriteringar och bestämmelser används två responsvariabler, a och b. Effekten ska bedömas med båda variablerna för att testresultaten ska kunna godtas i alla medlemsländer.

a) Genomsnittlig specifik tillväxthastighet: responsvariabel som beräknas utifrån den logaritmiska ökningen i biomassa under testperioden, uttryckt per dygn.

b) Producerad mängd biomassa: responsvariabel som motsvarar skillnaden mellan den ursprungliga mängden biomassa och biomassan vid testets slut.

För tillämpning av denna metod inom ramen för EU-lagstiftningen bör resultatberäkningen baseras på en genomsnittlig specifik tillväxthastighet av de skäl som anges nedan. Observera att toxicitetsvärden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad måste framgå när man tillämpar testresultaten. Om testet utförts på det sätt som beskrivs i den här handledningen kommer EC_x-värden baserade på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) vanligen att ligga högre än sådana värden som grundar sig på producerad mängd biomassa (E_yC_x). Detta ska dock inte tolkas som skillnader i känslighet mellan de två responsvariablerna; avvikelserna beror i stället på att de båda metoderna är olika matematiskt konstruerade. Variabeln genomsnittlig specifik tillväxthastighet är baserad på den (vanligen exponentiella) tillväxten hos alger i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms på grundval av dess effekter på tillväxthastigheten, utan att vara beroende av vare sig det absoluta värdet på kontrollens specifika tillväxthastighet, på dos-respons-kurvans lutning, eller på testets varaktighet. Resultat som i stället grundar sig på producerad mängd biomassa är däremot beroende av alla dessa övriga variabler. E_yC_x är beroende av den specifika tillväxthastigheten för den algart som används i varje enskilt test samt av den maximala specifika tillväxthastigheten – som kan variera mellan olika arter och t.o.m. mellan olika stammar av en och samma art. Denna responsvariabel ska därför inte användas för att jämföra känsligheten för toxiska ämnen mellan arter eller stammar. Det är ur vetenskaplig synvinkel att föredra om toxiciteten bestäms utifrån den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten. På grund av gällande bestämmelser i vissa länder omfattar den här testmetoden dock även toxicitetsbestämningar baserade på producerad mängd biomassa.

2.2.1 **Genomsnittlig tillväxthastighet**

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten under en period beräknas som den logaritmiska ökningen i biomassa för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar, enligt formeln:

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

där:

μ_{i-j}: genomsnittlig specifik tillväxthastighet under tidsperioden *i–j*;

X_i: biomassa vid tidpunkten *i*

X_j: biomassa vid tidpunkten *j*

För varje test- och kontrollgrupp ska ett medelvärde för tillväxthastigheten liksom en uppskattning av variansen räknas fram.

Beräkna den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för hela testperioden, dvs. vanligen dag 0–3. Som startvärde används det nominella värdet för ympad biomassa. (Motsvarande uppmätta värde ska inte användas eftersom det minskar precisionen.) Om utrustningen för mätning av biomassa (t.ex. flödescytometer) ger ett tillräckligt noggrant värde på den lilla mängd som ympats, kan biomassans uppmätta startkoncentration användas. Bestäm också den sektionsvisa tillväxthastigheten genom att beräkna den specifika tillväxthastigheten för varje dag under hela testperioden (dag 0–1, 1–2 och 2–3), och undersök om kontrollens tillväxthastighet förblir konstant (se kriterierna för testresultatens giltighet i avsnitt 1.7). En påtagligt lägre specifik tillväxthastighet dag ett jämfört med totalvärdet för genomsnittlig specifik tillväxthastighet kan tyda på att kulturen befinner sig i lagfas. I kontrollkulturer kan lagfasen praktiskt taget elimineras genom att förkulturen förökas på lämpligt sätt. I exponerade kulturer kan en lagfas däremot tyda på att algerna återhämtar sig efter inledande toxisk stress eller på att exponeringen minskat på grund av förlust av testsubstans (t.ex. genom adsorption till algbiomassan) efter den inledande exponeringen. Den sektionsvisa tillväxthastigheten kan därför användas när man bestämmer testsubstansens effekter under exponeringstiden. Stora skillnader mellan den sektionsvisa tillväxthastigheten och den genomsnittliga tillväxthastigheten tyder på att tillväxten inte varit konstant exponentiell. I sådana fall bör tillväxtkurvorna undersökas noggrant.

Beräkna den procentuella minskningen av tillväxthastigheten för varje replikat med testlösning, genom formeln:

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

där:

$\%I_r$: procentuell minskning av genomsnittlig specifik tillväxthastighet,

μ_C: medelvärdet för genomsnittlig specifik tillväxthastighet (μ) i kontrollgruppen,

μ_T: genomsnittlig specifik tillväxthastighet för replikatet med testlösning.

Om man använder sig av lösningsmedel vid beredning av testlösningarna ska man vid beräkningen av procentuell tillväxthämning jämföra de erhållna värdena med motsvarande värden för kontroller som också innehåller lösningsmedel.

2.2.2 **Producerad mängd biomassa**

Den producerade mängden biomassa motsvarar biomassan i slutet av testet minus den ursprungliga biomassan. Beräkningen görs för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar. För varje koncentration av testsubstans och kontroll ska ett medelvärde för producerad mängd biomassa liksom en uppskattning av variansen räknas fram. Den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa ($\%I_y$) beräknas för varje replikat med testlösning genom formeln:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

där:

$\%\ I_y$: procentuell minskning av producerad mängd biomassa,

Y_C: medelvärdet för producerad mängd biomassa i kontrollgruppen,

Y_T: producerad mängd biomassa i replikatet med testlösning.

2.3 PLOTTNING AV DOS-RESPONS-KURVA

Plotta den procentuella tillväxthämningen mot logaritmen för testsubstansens koncentration och undersök plotten noggrant. Datapunkter som konstaterats vara avvikande i den första fasen ska inte beaktas. För att man ska få en preliminär uppfattning om förhållandet mellan koncentration och respons sammanbinds datapunkterna genom en mjuk linje, antingen på fri hand eller med hjälp av datorbaserad interpolation. Använd därefter en mer ingående metod, helst en datorbaserad statistisk sådan. Beroende på ett flertal faktorer – t.ex. avsett användningsområde för data, datakvalitet (precision), datamängd, tillgängliga analysverktyg för data – kan man (ibland med goda skäl) bestämma sig för att avsluta utvärderingen av data på det här stadiet och enbart avläsa nyckelvärdena EC_{50} och EC_{10} (och/eller EC_{20}) från den frihandsritade kurvan (se även avsnittet om tillväxtstimulering nedan). Det finns flera giltiga skäl för att inte använda en statistisk metod, bland annat:

— Det är inte troligt att man utifrån befintliga data får fram mer pålitliga resultat med hjälp av datorbaserade metoder än genom expertbedömningar. I sådana situationer kan det t.o.m. hända att vissa dataprogram ger ett helt opålitligt resultat (iterationer kanske inte konvergerar t.ex.).

— Stimulerande tillväxtresponser kan inte hanteras på lämpligt sätt av programvaran (se nedan).

2.4 STATISTISK BEHANDLING

Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (9). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (9). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit-, eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, t.ex. dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data om tillväxt eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (10)(11) och (12). Tillämpningen av icke-linjär regressionsanalys beskrivs utförligare i tillägg 4.

För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska den 95-procentiga konfidensgränsen bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper. Om det är svårt eller omöjligt att göra en icke-linjär kurvanpassning på grund av alltför stor spridning i data kan man i stället göra regressionen utifrån gruppmedelvärden. Detta är en praktisk metod för att minska påverkan från misstänkta avvikande värden. Om man använder sig av denna möjlighet ska det tas med i testrapporten som en avvikelse från det normala förförandet, och motiveras med att kurvanpassningar med enskilda replikat inte gav tillfredsställande resultat.

När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan EC_{50}-skattningar och konfidensgränser också erhållas genom linjär interpolation med s.k. bootstrapping (13).

För skattningar av LOEC (och därmed även av NOEC) och av testsubstansens inverkan på tillväxthastigheten jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (14, 15, 16, 17 och 18). Man måste avgöra om ANOVA-kriteriet om varianshomogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (18), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle kriteriet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (12).

Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta algtest har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör anges i testrapporten.

2.5 TILLVÄXTSTIMULERING

Ibland förekommer tillväxtstimulering (negativ hämning) vid låga koncentrationer. Detta kan antingen bero på hormesis (”toxisk stimulering”) eller på att stimulerande tillväxtfaktorer överförts från testmaterialet till det minimalmedium som används. Observera att tillsats av oorganiska näringsämnen inte bör ha någon direkt effekt, eftersom testmediet innehåller ett överskott av näringsämnen i förhållande till algernas behov under testperioden. Vid beräkningen av EC_{50} kan man vanligen bortse från stimulering vid låga koncentrationer, såvida inte stimuleringen är extremt stor. I det senare fallet – samt då man beräknar EC_x för låga värden på x – kan det krävas särskilda åtgärder. Man ska så långt det är möjligt ta med stimulerande responser vid analysen av data, och om befintliga dataprogram för kurvanpassning inte kan hantera låggradig stimulering kan man i stället använda sig av linjär interpolation med bootstrapping. Om stimuleringen är extremt stor kan man överväga att använda en hormesis-modell (19).

2.6 ICKE-TOXISK TILLVÄXTHÄMNING

Ljusabsorberande testmaterial kan påverka tillväxthastigheten negativt eftersom de minskar mängden tillgängligt ljus. Sådana fysikaliska effekter måste kunna särskiljas från toxiska effekter genom att man ändrar testförhållandena, och fysikaliska effekter ska rapporteras separat. Riktlinjer återfinns i (2) och (3).

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testsubstans:

— fysikalisk form samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, inbegripet löslighetsgräns i vatten,

— kemiska identifieringsuppgifter, inklusive renhetsgrad.

Testart:

— stam, leverantör eller ursprung, samt odlingsförhållanden.

Testförhållanden:

— datum då testet inleds samt dess varaktighet,

— testets upplägg: testkärl, kulturernas volym, biomassans koncentration i början av testet,

— mediets sammansättning,

— testsubstansens koncentrationer, replikat (t.ex. antal replikat, antal koncentrationer av testsubstansen samt geometrisk serie),

— metod för beredning av testlösningar, inbegripet användning av lösningsmedel m.m.,

— odlingsutrymme,

— ljusets intensitet och kvalitet (ljuskälla, homogenitet),

— temperatur,

— koncentrationer som använts i testet: de nominella koncentrationerna av testsubstansen och samtliga resultat från bestämningar av testsubstansens koncentration i testkärlen; metodens utbyte och bestämningsgräns i matrisen,

— alla avvikelser från testmetoden,

— metod för bestämning av biomassa, samt belägg för att det finns en korrelation mellan den uppmätta parametern och biomassans torrvikt.

Resultat:

— pH-värden vid testets början och slut i alla testlösningar,

— biomassa för varje kolv och varje mätpunkt, samt metod för att mäta biomassa,

— tillväxtkurvor (plott där biomassan avsatts mot tiden),

— responsvariabler som beräknats för varje replikat med testlösning, med medelvärden och variationskoefficient för replikat,

— grafisk framställning av förhållandet mellan koncentration och effekt,

— toxicitetsbestämningar för responsvariablerna, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

— om ANOVA-metoder använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),

— alla belägg för tillväxtstimulering i någon av testlösningarna,

— övriga observerade effekter, t.ex. morfologiska förändringar hos algerna,

— analys av testresultaten, liksom en bedömning av hur de kan ha påverkats av eventuella avvikelser från testmetoden.

4. LITTERATUR

1. OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

2. ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, nr 23.

4. ISO 1998: Water quality – Sampling – Del 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

6. Mayer, P., Cuhel, R. och Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31, 2525–2531.

7. Slovacey, R.E. och Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), 919–925.

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. och Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2073–2079.

9. Christensen, E.R. och Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713–718.

10. Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O. och Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157–167.

11. Bruce, R.D. och Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

12. OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50, 1096–1121.

15. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491.

16. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

17. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 510–531.

18. Draper, N.R. och Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, 2:a uppl. Wiley, New York.

19. Brain P. och Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research 29, 93–96.

Tillägg 1

Rekommenderade stammar

Grönalger

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (äldre namn: *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (äldre namn: *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kiselalger

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobakterier

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

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Stammarnas ursprung

De rekommenderade stammarna finns att tillgå som monokulturer från följande samlingar (alfabetisk ordning):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110–2209
FÖRENTA STATERNA

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

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
TYSKLAND

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

Form och övriga egenskaper hos rekommenderade arter

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Form	Böjda och vridna enskilda celler	Ovala, vanligen enskilda celler	Stavar	Kedjor av ovala celler	Stavar
Storlek (längd × bredd) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volym (μm^3/cell)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Torrvikt (mg/cell)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Tillväxthastighet (3) (/dygn)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Uppmätt med elektronisk partikelräknare.
(2) Beräknat på grundval av storleken.
(3) Den vanligast observerade tillväxthastigheten i OECD-medium vid en ljusintensitet på ungefär 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ och temperaturen 21 °C.

Särskilda rekommendationer om odling och hantering av rekommenderade testarter

Pseudokirchneriella subcapitata och *Desmodesmus subspicatus*

Dessa grönalger brukar vara lätta att hålla i olika odlingsmedier. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Cellerna är vanligen enskilda, och celltätheten kan enkelt bestämmas med hjälp av elektronisk partikelräknare eller mikroskop.

Anabaena flos-aquae

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Det är mycket viktigt att batchkulturen fortfarande befinner sig i logfas då den förnyas, eftersom den annars har svårt att återhämta sig.

Anabaena flos-aquae bildar aggregat bestående av hopnystade kedjor av celler. Aggregatens storlek kan variera beroende på odlingsförhållandena. Om biomassan bestäms genom räkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare kan det vara nödvändigt att först bryta sönder aggregaten.

Sonikering av prov kan användas för att bryta sönder kedjor av celler och därigenom minska variabiliteten vid räkning. Längre sonikering än vad som krävs för att bryta sönder kedjorna i småfragment kan dock förstöra cellerna. Sonikeringens intensitet och varaktighet ska vara densamma för varje testlösning.

Räkna tillräckligt många fält på hemocytometern (minst 400 celler) för att kompensera för variabiliteten. På så vis ökar tillförlitligheten hos de mikroskopiska täthetsbestämningarna.

Den totala cellvolymen för *Anabaena* kan bestämmas med hjälp av en elektronisk partikelräknare. Först måste dock cellkedjorna brytas sönder genom försiktig sonikering. Anpassa sonikeringsenergin så att cellerna inte sprängs.

Använd vortexblandare eller liknande för att se till att den algsuspension som används för att ympa testkärlen är väl blandad och har homogen konsistens.

Testkärlen placeras i ett skakbord med rund- eller längsgående rörelse, hastighet ca 150 rpm. Ett alternativ är att man med jämna mellanrum skakar kärlen för att undvika att *Anabaena* bildar klumpar. Om sådana ändå bildas måste man se till att de prov som tas för mätning av biomassa är representativa. Det kan vara nödvändigt att skaka kärlen kraftigt före provtagning för att klumparna ska lösas upp.

Synechococcus leopoliensis

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna.

Synechococcus leopoliensis växer som enskilda, stavformiga celler. Cellerna är mycket små, vilket försvårar bestämning av biomassan genom räkning av celler i mikroskop. Elektroniska partikelräknare anpassade för partiklar ned till ung. 1 μm kan användas, och man kan även göra fluorimetriska mätningar *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Observera att mediet måste innehålla silikat.

Navicula pelliculosa kan under vissa odlingsförhållanden bilda aggregat. Detta beror på att fett som producerats av algerna ansamlas i en ytfilm till vilken de enskilda algcellerna lätt vidhäftas. När detta sker måste man se till att de prov som tas för bestämning av biomassa är representativa, t.ex. genom kraftig skakning i vortexblandare.

Tillägg 2

Odlingsmedier

Man kan välja mellan två odlingsmedier:

OECD-medium: originalmedium enligt OECD TG 201, samt enligt ISO 8692

AAP-medium enligt amerikanska naturvårdsverket (EPA), samt enligt ASTM

Medierna bereds med kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet samt avjonat vatten.

Sammansättning av AAP-medium (enl. EPA) och OECD TG 201-medium

Kemikalie	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Det molara förhållandet mellan EDTA och järn ska vara något större än 1. På så vis förhindras utfällning av järn samtidigt som kelateringen av tungmetalljoner minimeras.

I testet med kiselalgen *Navicula pelliculosa* berikas båda medierna med $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ så att koncentrationen av kisel (Si) blir 1,4 mg/l.

Mediets pH hålls i jämvikt genom karbonatsystemet i mediet och partialtrycket för CO_2 i den omgivande luften. Ett ungefärligt förhållande mellan pH vid 25 °C och den molara koncentrationen av bikarbonat ges av formeln:

$$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$$

Med 15 mg $NaHCO_3$/l är pH_{eq} = 7,5 (AAP-medium enl. EPA), och med 50 mg $NaHCO_3$/l är pH_{eq} = 8,1 (OECD-medium).

Testmediernas grundämnessammansättning

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

Beredning av OECD-medium

Näringsämne	Koncentration i stamlösningen
Stamlösning 1: makronäringsämnen	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stamlösning 2: järn	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Stamlösning 3: mikronäringsämnen	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Stamlösning 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	50 g/l

Sterilisera stamlösningarna genom membranfiltrering (genomsnittlig pordiameter 0,2 µm) eller autoklavering (120 °C, 15 min). Lösningarna förvaras i mörker vid 4 °C.

Stamlösningarna 2 och 4 ska inte autoklaveras. De steriliseras i stället genom membranfiltrering.

Odlingsmediet bereds genom att man tillsätter lämpliga volymer av stamlösningarna 1–4 till vatten.

Till 500 ml sterilt vatten tillsätts:

— 10 ml av stamlösning 1

— 1 ml av stamlösning 2

— 1 ml av stamlösning 3

— 1 ml av stamlösning 4

Späd till 1 000 ml med sterilt vatten.

Vänta till dess att mediet befinner sig i jämvikt med den omgivande luften med avseende på CO_2. Vid behov kan processen påskyndas genom att mediet bubblas med steril, filtrerad luft i några timmar.

Beredning av AAP-medium

A1.1 Tillsätt 1 ml av var och en av stamlösningarna i A1.2.1–A1.2.7 till ung. 900 ml avjonat eller destillerat vatten och späd till 1 liter.

A1.2 Stamlösningar med makronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten. Reagenserna A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 och A1.2.4 kan kombineras till en stamlösning.

A1.2.1 $NaNO_3$ – 12,750 g

A1.2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g

A1.2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g

A1.2.4 *Stamlösning med mikronäringsämnen* – (se A1.3)

A1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g

A1.2.6 K_2HPO_4 – 0,522 g

A1.2.7 $NaHCO_3$ – 7,500 g

A1.2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – se anm. A1.1

Anm.: A1.1 – Används bara för kiselalger. Kemikalien kan tillsättas direkt (202,4 mg) eller via en stamlösning. Slutkoncentrationen av kisel (Si) i mediet ska i båda fallen vara 20 mg/l.

A1.3 Stamlösningen med mikronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten.

A1.3.1 H_3BO_3 – 92,760 mg

A1.3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg

A1.3.3 $ZnCl_2$ – 1,635 mg

A1.3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg

A1.3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg

A1.3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg

A1.3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg

A1.3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg

[dinatrium(etylendinitril)tetraacetat]

A1.3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg. Se anm. A1.2.

Anm.: A1.2 – Används bara för stamkulturer av kiselalger.

A1.4 Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 *N* eller 1,0 *N* NaOH eller HCl.

A1.5 Om man använder sig av en elektronisk partikelräknare ska mediet filtreras över till ett sterilt kärl genom ett membranfilter med en pordiameter på 0,22 µm. Om partikelräknare inte används ska filtrets pordiameter i stället vara 0,45 µm.

A1.6 Mediet lagras i mörker vid ungefär 4 °C tills det används.

Tillägg 3

Exempel på en metod för algodling

Allmänna påpekanden

Syftet med odlingen är att få fram algkulturer för toxicitetstester.

Man måste vidta lämpliga åtgärder för att förhindra att algkulturerna kontamineras med bakterier. Utgångsmaterialet ska bestå av monokulturer, och helst axeniska sådana.

Alla moment ska utföras under sterila förhållanden för att undvika kontaminering med bakterier eller andra alger.

Utrustning och material

Se avsnitt 1.8.1.

Odling av algkulturer

Beredning av näringslösningar (näringsmedier):

Alla närsalter i mediet bereds som koncentrerade stamlösningar och lagras i mörker vid låg temperatur. Lösningarna steriliseras genom filtrering eller autoklavering.

Mediet bereds genom att man tillsätter angiven mängd stamlösning till sterilt destillerat vatten. Kontaminering med mikroorganismer måste undvikas. För fasta medier tillsätts 0,8 % agar.

Stamkultur:

Stamkulturerna är små algkulturer som används som utgångsmaterial för tester. De ska med jämna mellanrum överföras till färskt odlingsmedium. Om kulturerna inte används regelbundet ska de strykas ut på böjda agarrör. Dessa överförs till färskt medium minst en gång varannan månad.

Stamkulturerna odlas i E-kolvar med lämpligt medium (volym ca 100 ml). Om algerna inkuberas vid 20 °C i kontinuerligt ljus måste överföringar göras en gång i veckan.

Vid detta moment överför man med hjälp av en steril pipett en viss mängd ”gammal” kultur till en kolv med färskt medium. Startkoncentrationen för snabbväxande arter ska vara ungefär 100 gånger lägre än i den gamla kulturen.

Tillväxthastigheten för en viss art kan bestämmas med hjälp av tillväxtkurvan. Med hjälp av detta värde kan man sedan räkna fram vid vilken celltäthet kulturen ska överföras till nytt medium. Detta måste göras innan kulturen når deklinationsfasen.

Förkultur:

Avsikten med förkulturen är att få fram alger som är lämpliga för ympning av testkulturer. Förkulturen inkuberas under testbetingelser och används medan den ännu befinner sig i exponentiell tillväxtfas, vanligen efter en inkuberingstid på 2–4 dagar. Algkulturer som innehåller deformerade eller avvikande celler slängs.

Tillägg 4

Analys av data med icke-linjär regression

Allmänna påpekanden

Responsen i algtester och andra tester som gäller mikrobiologisk tillväxt (en typ av biomassetillväxt) är per definition en kontinuerlig, eller metrisk, variabel. Det rör sig om hastigheten hos en process i de fall man mäter tillväxthastighet, och integralen av motsvarande kurva om man i stället mäter biomassa. Båda variablerna jämförs sedan med motsvarande genomsnittsrespons för icke-exponerade kontrollreplikat som uppvisar maximal respons under de rådande förhållandena – med ljus och temperatur som viktigaste faktorer i algtestet. Systemet kan vara uppdelat eller homogent, och biomassan kan anses utgöra en helhet där man inte behöver ta hänsyn till enskilda celler. Variansfördelningen för responsen i ett sådant system beror uteslutande på experimentella faktorer (där felen vanligen är lognormalfördelade eller normalfördelade). Detta ska jämföras med typiska responser i biologiska tester med dikotoma data, där toleransen (som vanligen är binomialfördelad) hos enskilda organismer ofta antas vara det dominerande elementet i variansen. Responsen i kontrollerna är i detta fall noll eller har samma värde som bakgrundsnivån.

I det enklaste fallet minskar den normaliserade eller relativa responsen r monotont från värdet 1 (ingen tillväxthämning) till 0 (100 % tillväxthämning). Man bör vara medveten om att alla responser innehåller fel, och att uppenbar negativ hämning vid beräkningen uteslutande anses bero på slumpmässiga fel.

Regressionsanalys

Modeller

Syftet med en regressionsanalys är att kvantitativt beskriva dos-respons-kurvan i form av en matematisk regressionsfunktion, Y = f (C) eller – vanligare – F (Z), där Z = log C. Använd på motsatt sätt kan funktionen $C = f^{-1}$ (Y) utnyttjas för beräkning av EC_x-värden, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20}, samt motsvarande 95-procentiga konfidensgränser. Ett flertal enkla matematiska funktioner har visat sig vara lämpliga för att beskriva förhållandet mellan koncentration och respons vid bestämning av tillväxthämning hos alger, t.ex. den logistiska ekvationen, den icke-symmetriska Weibull-ekvationen samt funktionen för lognormalfördelning. De är alla sigmoida kurvor som asymptotiskt närmar sig värdet 1 då $C \rightarrow 0$, och värdet 0 då $C \rightarrow$ oändligheten.

Ett nyligen framlagt alternativ till asymptotiska modeller är modeller som bygger på kontinuerliga tröskelfunktioner (t.ex. Kooijman-modellen för tillväxthämning avseende populationer, se Kooijman et al. 1996). Modellen bygger på antagandet att effekten under ett visst tröskelvärde EC0+ är noll. Detta tröskelvärde bestäms genom extrapolation av dos-respons-kurvan till den punkt där den korsar koncentrationsaxeln. Man använder sig då av en enkel kontinuerlig funktion som inte är differentierbar i startpunkten.

Observera att analysen kan bestå av en enkel minimering av residualkvadratsummor (om man antar att variansen är konstant) eller av viktade kvadrater, om man kompenserar för variansens heterogenitet.

Förfarande

Förfarandet är i korthet följande: Välj en lämplig funktion, Y = f (C), och anpassa den till data genom icke-linjär regression. För att man ska kunna få ut så mycket information som möjligt från mätdata bör man använda mätvärden från varje enskild kolv i stället för medelvärden för samtliga replikat. Om variansen å andra sidan är hög visar erfarenheten att medelvärden för replikaten troligen kan ge en matematisk uppskattning som är mer tillförlitlig och mindre påverkad av slumpmässiga fel i data, än en metod där man behåller varje enskild datapunkt.

Plotta den anpassade kurvan och erhållna mätdata, och kontrollera att kurvans anpassning är godtagbar. Analys av residualer kan vara ett mycket värdefullt hjälpmedel i sammanhanget. Om den valda funktionen för anpassning av dos-respons-kurvan ger en otillfredsställande beskrivning av hela kurvan eller en väsentlig del av denna, t.ex. responsen vid låga koncentrationer, bör man välja en annan typ av kurvanpassning som inte är symmetrisk, t.ex. Weibull-funktionen. Negativ hämning kan ge problem då man använder sig av t.ex. funktionen för lognormalfördelning. Också i detta fall bör man välja

en alternativ regressionsfunktion. Det är inte lämpligt att sådana negativa värden tilldelas värdet noll eller ett lågt positivt värde eftersom detta rubbar felfördelningen. Det kan vara befogat att göra separata anpassningar för olika delar av kurvan. Exempelvis kan värdet på $EC_{low\ x}$ uppskattas från den del av kurvan där tillväxthämningen är låg. Beräkna från den anpassade ekvationen (genom ”omvänd uppskattning”, $C = f^{-1}(Y)$), karaktäristiska punktskattningar för EC_x-värden. I rapporten ska åtminstone EC_{50} samt en eller två uppskattningar av $EC_{low\ x}$ tas med. Den praktiska erfarenheten har visat att algtestet vanligen medger en rimligt noggrann uppskattning vid 10 % tillväxthämning, förutsatt att det finns tillräckligt många datapunkter. Undantaget är de fall är då tillväxtstimulering skett vid låga koncentrationer av testsubstansen. Uppskattningar av EC_{20} brukar ha betydligt högre precision än uppskattningar av EC_{10}, eftersom EC_{20} vanligen befinner sig på den approximativt linjära delen av den centrala dos-respons-kurvan. Ibland kan EC_{10}-värden vara svåra att tolka på grund av tillväxtstimulering, så trots att man vanligen får fram EC_{10} med tillräckligt hög precision bör EC_{20} också alltid rapporteras.

Viktningsfaktorer

Eftersom den experimentella variansen vanligen inte är konstant och normalt sett innehåller en proportionell komponent bör man rutinmässigt göra en viktad regression. Viktningsfaktorerna vid en sådan analys antas vanligen vara omvänt proportionella mot variansen:

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

Många regressionsprogram har en funktion för viktad regressionsanalys där viktningsfaktorerna tas från en tabell. Det är lämpligt att man normaliserar viktningsfaktorerna genom att multiplicera dem med $n/\Sigma\ w_i$ (där n är antalet datapunkter) så att summan av dem blir ett.

Normalisering av responser

Normalisering med genomsnittsresponsen för kontrollerna innebär vissa principiella problem, och leder också till en ganska komplicerad variansstruktur. Om man delar responsvärdena med medelvärdet för kontrollernas responser för att få fram den procentuella tillväxthämningen, inför man samtidigt ett nytt fel på grund av det fel som är kopplat till medelvärdet för kontrollerna. Om detta fel inte är att betrakta som försumbart måste viktningsfaktorerna för regression och konfidensgränser korrigeras för kovariansen med kontrollen (17). För att den totala variansen för den relativa responsen ska kunna minimeras är det viktigt att det uppskattade medelvärdet för kontrollernas respons har en hög precision. Variansen uttrycks på följande sätt:

(Nedsänkt *i* hänför sig till koncentrationsnivån i, och nedsänkt 0 till kontrollerna.)

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

med variansen

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

och eftersom

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ och } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

med normalt fördelade data och replikaten m_i och m_0

$$\mathrm{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

blir den totala variansen hos den relativa responsen, Y_i

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

Det fel som medelvärdet för kontrollerna är behäftat med är omvänt proportionellt mot kvadratroten av genomsnittsvärdet för antalet kontrollreplikat. Det kan ibland vara befogat att ta med historiska data för att kraftigt minska felet. En alternativ metod går ut på att man inte normaliserar data eller anpassar de absoluta responserna – inbegripet responsvärden för kontroller – utan i stället tar med responsvärdena för kontroller som en extra parameter som anpassas genom icke-linjär regression. Om man använder sig av en regressionsekvation av standardtyp med 2 parametrar kräver metoden anpassning av 3 parametrar, vilket innebär att det krävs fler datapunkter än vid icke-linjär regression av data som normaliserats med hjälp av en förvald kontrollrespons.

Omvända konfidensintervall

Beräkningen av konfidensintervall vid icke-linjär regression genom omvänd uppskattning är ganska komplex och förekommer inte som standardfunktion i normala statistikprogram. Ungefärliga konfidensgränser kan erhållas med hjälp av standardprogram för icke-linjär regression med omparametrisering (Bruce och Versteeg, 1992), vilket innebär att den matematiska ekvationen skrivs om med önskade punktskattningar, t.ex. med EC_{10}- och EC_{50}-värden som de parametrar som ska uppskattas. Låt funktionen vara I = f (α, β, koncentration) och använd definitionsrelationerna f (α, β, EC_{10}) = 0,1 och f (α, β, EC_{50}) = 0,5 för att ersätta f (α, β, koncentration) med en likvärdig funktion g (EC_{10}, EC_{50}, koncentration).

En mer direkt beräkning (Andersen et al, 1998) kan göras genom att man behåller den ursprungliga ekvationen och använder sig av en Taylorexpansion runt medelvärdena för r_i och r_0.

Metoder med bootstrapping har blivit populära på senare tid. De går ut på att man uppskattar en empirisk variansfördelning med hjälp av erhållna mätdata i kombination med återkommande omsampling som styrs av en slumptalsgenerator.

Litteratur

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

Bruce, R.D. och Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

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

BILAGA V

C.25 **AEROB MINERALISERING I YTVATTEN – SIMULERINGSTEST AV BIOLOGISK NEDBRYTNING**

1. **METOD**

Denna metod motsvarar OECD TG 309 (2004) (1).

1.1 INLEDNING

Syftet med detta test är att mäta tiden för biologisk nedbrytning av en testsubstans vid låg koncentration i aerobt naturligt vatten, samt att kvantifiera observationerna i form av kinetiska hastighetsuttryck. Detta simuleringstest är ett batchvis skakflasktest för bestämning av hastigheten för aerob nedbrytning av organiska ämnen i prover av naturligt ytvatten (sött, bräckt eller salt). Det är grundat på ISO/DIS 14592–1 (2) och innehåller också delar av testmetoderna C.23 och C.24 (3) (4). För att undvika att mikromiljön i testet försämras vid långa testperioder kan ett semikontinuerligt testförfarande användas i stället för batchtest. Simuleringstestet syftar i första hand till att fastställa testsubstansens mineralisering i ytvatten, och mineralisering utgör grunden för att kunna formulera nedbrytningskinetiken. I andra hand syftar testet emellertid också till att få fram uppgifter om primär nedbrytning och bildandet av viktiga nedbrytningsprodukter. Identifiering av nedbrytningsprodukter, och om möjligt kvantifiering av deras koncentration, är särskilt viktigt för ämnen som mineraliseras mycket långsamt (t.ex. sådana med en halveringstid för den totala mängden kvarvarande ^{14}C på över 60 dygn). Högre koncentrationer av testsubstansen (t.ex. > 100 µg/l) bör med tanke på analytiska begränsningar normalt sett användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter.

I detta test innebär en låg koncentration (t.ex. mindre än 1 µg/l upp till 100 µg/l) att den är tillräckligt låg för att den biologiska nedbrytningskinetiken i testet ska spegla vad som kan förväntas i miljön. Jämfört med den sammanlagda massan av biologiskt nedbrytbara kolsubstrat i det naturliga vatten som används i testet ska den testsubstans som förekommer i låg koncentration fungera som sekundärt substrat. Det innebär att den förväntade biologiska nedbrytningskinetiken är av första ordningen (icke-tillväxt-kinetik) och att testsubstansen kan brytas ned genom s.k. co-metabolism. Första ordningens kinetik innebär att nedbrytningshastigheten (mg/l/dygn) är proportionell till substratkoncentrationen, som minskar med tiden. Vid verklig första ordningens kinetik är den specifika hastighetskonstanten (k) för nedbrytningen oberoende av tid och koncentration. Konstanten k varierar alltså inte märkbart under ett experiments gång, och ändras inte till följd av ökad koncentration mellan experimenten. Enligt definition är den specifika hastighetskonstanten för nedbrytningen lika med den relativa koncentrationsförändringen per tidsenhet: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Normalt sett förväntas första ordningens kinetik under de angivna villkoren, men det kan förekomma särskilda förhållanden där annan kinetik är mer passande. Exempelvis kan avvikelser från första ordningens kinetik iakttas om den biologiska omvandlingens hastighet begränsas av massöverföringsfenomen som diffusionshastighet, snarare än av den biologiska reaktionshastigheten. Data kan emellertid nästan alltid beskrivas med hjälp av pseudo-första ordningens kinetik där man accepterar en hastighetskonstant som är beroende av koncentrationen.

Uppgifter om testsubstansens biologiska nedbrytbarhet vid högre koncentrationer (t.ex. från standard-screeningtest) och om abiotisk nedbrytbarhet, nedbrytningsprodukter och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper bör finnas tillgängliga före testets genomförande för att underlätta planeringen av experimentet och tolkningen av resultaten. Genom att använda ^{14}C-märkta testsubstanser och fastställa fasfördelningen av ^{14}C i slutet av testet blir det möjligt att bestämma fullständig biologisk nedbrytbarhet. Om omärkta testsubstanser används kan fullständig biologisk nedbrytbarhet uppskattas endast om en högre koncentration testas och alla viktiga nedbrytningsprodukter är kända.

1.2 DEFINITIONER

Primär biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att den kemiska identiteten förloras.

Funktionell biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att en viss egenskap förloras.

Fullständig aerob biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen (mineralisering), och produktion av ny biomassa och organiska mikrobiella biosyntetiska produkter.

Mineralisering: Ett kemiskt ämnes eller organisk materias nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen.

Lagfas: Tiden mellan ett tests början och den tidpunkt då de nedbrytande mikroorganismerna har adapterats och graden av biologisk nedbrytning för ett kemiskt ämne eller en organisk materia har nått mätbara nivåer (t.ex. 10 % av den maximala teoretiska biologiska nedbrytningen eller lägre, beroende på mätteknikens noggrannhet).

Maximal biologisk nedbrytningsgrad: Ett kemiskt ämnes eller en organisk materias nedbrytningsgrad i ett test, uttryckt i procent, över vilken ingen ytterligare biologisk nedbrytning sker under testets gång.

Primärt substrat: En samling av naturliga kol- och energikällor som gör att den mikrobiella biomassan kan upprätthållas och tillväxa.

Sekundärt substrat: En substratkomponent som förekommer i så låg koncentration att dess nedbrytning endast förser de berörda mikroorganismerna med obetydliga kol- och energimängder, till skillnad mot det kol och den energi som tillhandahålls vid nedbrytningen av de huvudsakliga substratkomponenterna (primärt substrat).

Hastighetskonstant för nedbrytning: En konstant i första ordningens eller pseudo-första ordningens kinetik, k (d^{-1}), som anger nedbrytningsprocessernas hastighet. För ett batchexperiment uppskattas k från den första delen av den nedbrytningskurva som erhålls efter lagfasens slut.

Halveringstid, $t_{1/2}$ (d): Term som används för att beskriva hastigheten för en första ordningens reaktion. Den motsvarar den tid som krävs för en koncentrationsminskning med faktor 2. Förhållandet mellan halveringstiden och hastighetskonstanten för nedbrytningen kan uttryckas med ekvationen $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Halveringstid för nedbrytning, DT_{50} (d): Term som används för att kvantifiera resultaten av test av biologisk nedbrytning. Den motsvarar den tid, inbegripet lagfasen, som krävs för att uppnå en biologisk nedbrytning på 50 %.

Detektionsgräns (LOD) och kvantifieringsgräns (LOQ): Detektionsgränsen (LOD) är den koncentration av ett ämne under vilken ämnet inte kan särskiljas från analytiska artefakter. Kvantifieringsgränsen (LOQ) är den koncentration av ett ämne under vilken koncentrationen inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet.

Löst organiskt kol (DOC): Den del av det organiska kolet i ett vattenprov som inte kan avlägsnas genom specificerad fasseparation, exempelvis genom centrifugering med 40 000 ms^{-2} i 15 minuter eller filtrering genom membran med en porstorlek på 0,2–0,45 μm.

Total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol (DOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till löst organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol (POA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till partikulärt organiskt kol.

1.3 TESTMETODENS TILLÄMPLIGHET

Simuleringstestet kan användas för icke-flyktiga eller halvflyktiga organiska ämnen som testas vid låga koncentrationer. Vid användning av öppna flaskor (t.ex. med en propp av bomull) kan ämnen med Henrys konstant under ca 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ung. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) i praktiken anses vara icke-flyktiga. Vid användning av förslutna flaskor med en innesluten luftvolym kan halvflyktiga ämnen (med Henrys konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) testas utan förluster från testsystemet. Förlust av ^{14}C-märkta ämnen kan ske när koldioxiden strippas av, om nödvändiga försiktighetsåtgärder inte vidtas. I sådana fall kan det vara nödvändigt att fånga upp koldioxiden i ett internt absorptionsmedel med alkali eller att använda ett externt system för absorption av koldioxid (direkt $^{14}CO_2$-bestämning, se tillägg 3). Om man vill bestämma den biologiska nedbrytningskinetiken måste testsubstansens koncentration vara lägre än dess vattenlöslighet. Det bör emellertid noteras att de värden som anges för vattenlöslighet i litteraturen kan vara avsevärt högre än testsubstansens löslighet i naturliga vatten. Eventuellt kan lösligheten för testsubstanser med särskilt dålig vattenlöslighet fastställas genom användning av de naturliga vatten som ska testas.

Denna metod kan användas för att simulera biologisk nedbrytning i ytvatten utan grova partiklar (pelagiskt test) eller i grumligt ytvatten som exempelvis kan förekomma i gränsskiktet mellan vatten och sediment (suspenderat sediment-test).

1.4 TESTPRINCIP

Testet genomförs i batch genom att testsubstansen inkuberas antingen endast med ytvatten (pelagiskt test) eller med vatten med tillsats av suspenderade fasta ämnen/sediment med en torrvikt på 0,01–1 g/l (suspenderat sediment-test) för att simulera ett vattendrag med suspenderade fasta ämnen eller resuspenderat sediment. Koncentrationer av suspenderade fasta ämnen/sediment i den lägre delen av detta intervall är utmärkande för de flesta ytvatten. Testflaskorna inkuberas i mörker vid omgivande temperatur under aeroba förhållanden och omblandning. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen bör användas för bestämning av nedbrytningskinetiken. Koncentrationerna bör skilja sig från varandra med en faktor 5 till 10 och bör motsvara den förväntade koncentrationsspridningen i miljön. Testsubstansens högsta koncentration bör inte överstiga 100 µg/l, men maximikoncentrationer under 10 µg/l eller lägre är att föredra för att man ska kunna vara säker på att den biologiska nedbrytningen följer första ordningens kinetik. De lägsta koncentrationerna bör inte överstiga 10 µg/L, men lägsta testkoncentrationer på 1–2 µg/l eller under 1 µg/l är att föredra. Normalt sett kan en adekvat analys av så låga koncentrationer göras med hjälp av ^{14}C-märkta ämnen som finns i handeln. På grund av analytiska begränsningar är det inte alltid möjligt att mäta testsubstansens koncentration med tillräcklig noggrannhet om testsubstansen tillsätts i koncentrationer på ≤ 100 µg/l (se andra stycket i avsnitt 1.7.2). Högre koncentrationer av testsubstansen (> 100 µg/l och ibland > 1 mg/l) kan användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter eller om det inte finns en specifik analysmetod med låg detektionsgräns. Vid test av höga koncentrationer av en testsubstans kan det vara omöjligt att utnyttja resultaten för att uppskatta första ordningens nedbrytningskonstant och halveringstiden, eftersom nedbrytningen förmodligen inte följer första ordningens kinetik.

Nedbrytningen följs vid lämpliga tillfällen genom mätning av kvarvarande ^{14}C eller av testsubstansens restkoncentration vid användning av specifika kemiska analyser. ^{14}C-märkning av molekylens stabilaste del gör att man kan bestämma den totala mineraliseringen, medan ^{14}C-märkning av en mindre stabil del av molekylen eller användning av specifika analyser endast möjliggör bedömning av primär biologisk nedbrytning. Den stabilaste delen av en molekyl innehåller emellertid inte nödvändigtvis molekylens funktionella del (som kan kopplas till en specifik egenskap som toxicitet, bioackumulation o.d.). I sådana fall kan det vara lämpligt att använda en ^{14}C-märkt testsubstans i den funktionella delen, för att följa upp den specifika egenskapens eliminering.

1.5 INFORMATION OM TESTSUBSTANSEN

I detta test kan både radioaktivt märkta och omärkta testsubstanser användas. Det rekommenderas att ^{14}C-märkning används, och märkningen bör normalt sett göras i molekylens stabilaste del (se även avsnitt 1.4). För ämnen som innehåller mer än en aromatisk ring bör helst en eller flera kolatomer i varje ring ^{14}C-märkas. Dessutom bör helst en eller flera kolatomer på båda sidor om bindningar som bryts lätt ^{14}C-märkas. Testsubstansens kemiska och radiokemiska renhet ska vara > 95 %. För radioaktivt märkta ämnen rekommenderas en specifik aktivitet på ca 50 µCi/mg (1,85 MBq) eller mer i syfte att underlätta ^{14}C-mätning i test som genomförs med låg initial koncentration. Följande uppgifter om testsubstansen bör finnas tillgängliga:

— Löslighet i vatten [metod A.6].

— Löslighet i organiska lösningsmedel (ämnen som används med lösningsmedel eller har dålig löslighet i vatten).

— Dissociationskonstant (pKa) om ämnet tenderar till protonering eller deprotonering [OECD TG 112] (5).

— Ångtryck [metod A.4] och Henrys konstant.

— Kemisk stabilitet i vatten och i mörker (hydrolys) [metod C.7].

Om ämnen med dålig vattenlöslighet testas i havsvatten kan det också vara bra att känna till utsaltningskonstanten (Setjenovs konstant) K^s, som definieras genom formeln log (S/S') = K^s C_m, där S och S' är ämnets löslighet i sötrespektive saltvatten och C_m är saltets molaritet.

Om testet görs som ett ”suspenderat sediment-test” ska även följande uppgifter finnas tillgängliga:

— Fördelningskoefficient n-oktanol/vatten [metod A.8].

— Adsorptionskoefficient [metod C.18].

Andra viktiga uppgifter, bl.a. följande:

— Koncentration i miljön, såvida den är känd eller kan uppskattas.

— Testsubstansens toxicitet för mikroorganismer [metod C.11].

— Lätt och/eller potentiell biologisk nedbrytbarhet [metoderna C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)].

— Aerob eller anaerob biologisk nedbrytbarhet vid omvandlingsstudier i jord och sediment/vatten [metoderna C.23 och C.24].

1.6 REFERENSSUBSTANS

Ett ämne som normalt sett lätt bryts ned under aeroba förhållanden (t.ex. anilin eller natriumbensoat) bör användas som referenssubstans. Anilin och natriumbensoat kan vanligen förväntas brytas ned på mindre än två veckor. Referenssubstansen ska visa att den mikrobiella aktiviteten i testvattnet ligger inom vissa gränser, dvs. att vattnet innehåller en aktiv population av mikroorganismer.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Omedelbart efter det att testsubstansen tillförts ska alla initiala testkoncentrationer kontrolleras genom mätning av ^{14}C-aktivitet, eller genom kemisk analys om ämnena är omärkta, i minst två prover. Därigenom kan man få information om analysmetodens tillämplighet och repeterbarhet, och om testsubstansen är jämnt fördelad. Normalt sett används den uppmätta initiala ^{14}C-aktiviteten eller testsubstansens koncentration vid de följande analyserna av data, snarare än de nominala koncentrationerna, eftersom man därigenom kompenserar för förluster genom sorption och doseringsfel. För ^{14}C-märkta testsubstanser anges utbytet vid experimentets slut genom massbalans (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.4). Idealt sett ska den radioaktivt märkta massbalansen ligga inom intervallet 90 % till 110 %, medan analysnoggrannheten bör ge ett initialt utbyte på mellan 70 % och 110 % för omärkta testsubstanser. Dessa intervall ska ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras. Eventuellt kan analysnoggrannheten för testsubstansen bestämmas vid lägre koncentrationer än den initiala koncentrationen och för viktiga nedbrytningsprodukter.

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (inbegripet den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testsubstansen och, i förekommande fall, nedbrytningsprodukterna bör kontrolleras genom analys av fem prover av varje enskilt extrakt av ytvattnet.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testsubstansen och för nedbrytningsprodukterna bör möjliggöra detektion av 1 % eller mindre av den initiala mängd som tillförts testsystemet. Kvantifieringsgränsen (LOQ) bör vara högst 10 % av den tillförda koncentrationen. För kemisk analys av många organiska ämnen och deras nedbrytningsprodukter krävs ofta att testsubstansen tillförs i relativt hög koncentration, dvs. > 100 μg/l.

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning**

Testet kan utföras i koniska eller cylindriska flaskor av lämplig storlek (t.ex. 0,5 eller 1,0 liter), som försluts med silikon- eller gummiproppar, eller i serumflaskor med koldioxidtäta lock (t.ex. butylgummimembran). En annan möjlighet är att utföra testet med olika flaskor och att ta ut hela flaskor, med minst två replikat, för varje provintervall (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.1). För icke-flyktiga testsubstanser som inte är radioaktivt märkta krävs inga gastäta proppar eller lock. Lösa bomullsproppar som hindrar kontaminering från luften är lämpliga (se andra

stycket i avsnitt 1.8.9.1). Halvflyktiga ämnen bör testas i system av biometertyp under lätt omrörning av vattenytan. För att undvika bakteriekontamination kan behållarna eventuellt steriliseras genom upphettning eller autoklavering före användning. Dessutom används följande standardutrustning:

— Skakbord eller magnetomrörare för kontinuerlig omblandning av testflaskorna.

— Centrifug.

— pH-mätare.

— Turbidimeter för nefelometrisk mätning av grumlighet.

— Ugn eller mikrovågsugn för torrviktsbestämning.

— Utrustning för membranfiltrering.

— Autoklav eller ugn för värmesterilisering av glas.

— Utrustning för hantering av ^{14}C-märkta ämnen.

— Utrustning för att kvantifiera ^{14}C-aktivitet i prover av lösningar från CO_2-fälla och, vid behov, från sedimentprover.

— Analysutrustning för bestämning av testsubstans (och referenssubstans) vid specifik kemisk analys (t.ex. gaskromatograf, högtrycksvätskekromatograf).

1.8.2 **Stamlösningar av testsubstansen**

Avjonat vatten används för att bereda stamlösningar av test- och referenssubstanserna (se första stycket i avsnitt 1.8.7). Det avjonade vattnet ska vara fritt från ämnen som kan vara toxiska för mikroorganismer, och får innehålla högst 1 mg löst organiskt kol (DOC) per liter (6).

1.8.3 **Insamling och transport av ytvatten**

Valet av provtagningsplats för insamling av ytvatten beror på testets syfte i varje given situation. Vid val av provtagningsplatser ska eventuella tidigare utsläpp från jordbruk, industrier och hushåll beaktas. Om det är känt att en akvatisk miljö har blivit kontaminerad med testsubstansen eller en strukturell analog till denna under de senaste fyra åren, bör miljön inte användas för insamling av testvatten, såvida inte undersökningens uttalade syfte är att undersöka nedbrytningstakten på tidigare exponerade platser. Vattnets pH och temperatur bör mätas på provtagningsplatsen. Dessutom bör provtagningsdjupet och vattenprovets utseende (t.ex. färg och grumlighet) noteras (se avsnitt 3). Syrekoncentration och/eller redoxpotential i vatten och i sedimentytan bör mätas för att påvisa att aeroba förhållanden råder, såvida inte platsens utseende och tidigare erfarenheter därifrån gör detta uppenbart. Ytvattnet bör transporteras i en väl rengjord behållare. Provets temperatur under transporten bör inte avsevärt överstiga den temperatur som råder vid testet. Kylning till 4 °C rekommenderas om transporttiden är längre än 2–3 timmar. Vattenprovet får inte frysas.

1.8.4 **Lagring och beredning av ytvatten**

Testet bör helst påbörjas inom ett dygn efter provtagningen. Om det är nödvändigt att lagra vattnet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor. Vattenprovet bör hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Före användning bör grova partiklar avlägsnas, exempelvis med hjälp av ett nylonfilter med en maskstorlek på ca 100 μm eller ett grovt pappersfilter eller genom sedimentering.

1.8.5 **Beredning av vatten tillsatt med sediment (frivilligt)**

För testet med suspenderat sediment tillsätts ytsediment till flaskorna med naturligt vatten (filtrerat för att avlägsna grova partiklar enligt beskrivning i avsnitt 1.8.4) så att en suspension erhålls. Koncentrationen av suspenderade fasta ämnen bör ligga mellan 0,01 och 1 g/l. Ytsedimentet bör komma från samma plats som vattenprovet. Beroende på den specifika vattenmiljön kan ytsedimentet kännetecknas antingen av en hög halt av organiskt kol (2,5–7,5 %) och fin textur eller en låg halt av organiskt kol (0,5–2,5 %) och grov textur (3). Ytsedimentet kan beredas på följande

sätt: Flera sedimentkärnor tas med hjälp av en genomskinlig plastslang. De övre aeroba lagren (från ytan till högst 5 mm djup) skärs av genast efter provtagningen och blandas till ett samlingsprov. Detta sedimentprov bör transporteras i en behållare med en stor innesluten luftvolym för att hålla sedimentet under aeroba förhållanden (kyl till 4 °C om transporten varar mer än 2–3 timmar). Sedimentprovet bör suspenderas i testvattnet i förhållandet 1:10 och hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Om det är nödvändigt att lagra sedimentet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor.

1.8.6 **Semikontinuerligt förfarande (frivilligt)**

En förlängd inkubering (flera månader) kan vara nödvändig om det är en lång fördröjningstid innan en betydande nedbrytning av testsubstansen kan mätas. Om detta är känt från tidigare test av ett ämne, kan testet redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande som möjliggör en regelbunden förnyelse av en del av testvattnet eller testsuspensionen (se tillägg 2). Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande (se andra stycket i 1.8.8.3).

1.8.7 **Tillsats av testsubstans eller referenssubstans**

För ämnen med hög vattenlöslighet (> 1 mg/l) och låg flyktighet (Henrys konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) kan en stamlösning beredas i avjonat vatten (se avsnitt 1.8.2). Stamlösning tillsätts i testbehållarna i lämplig volym så att önskad koncentration uppnås. Den volym stamlösning som tillsätts bör vara så liten som det är praktiskt möjligt (helst < 10 % av den slutliga vätskevolymen). Ett annat förfarande är att lösa testsubstansen i en större volym testvatten, vilket kan vara ett alternativ till att använda organiska lösningsmedel.

Om det är oundvikligt bör stamlösningar av icke-flyktiga ämnen med låg vattenlöslighet beredas med hjälp av ett flyktigt organiskt lösningsmedel, men den mängd lösningsmedel som sätts till testsystemet bör inte överstiga 1 volymprocent och får inte påverka den mikrobiella aktiviteten negativt. Lösningsmedlet får inte påverka testsubstansens stabilitet i vatten. Lösningsmedlet bör strippas av till en extremt liten kvantitet så att det inte ger en betydande ökning av halten löst organiskt kol i testvattnet eller testsuspensionen. Detta bör kontrolleras genom en ämnesspecifik analys eller om möjligt genom analys av löst organiskt kol (6). Det är viktigt att den tillförda mängden lösningsmedel inte är större än absolut nödvändigt och att mängden testsubstans kan lösas i den slutliga volymen testvatten. Andra metoder att tillsätta testsubstansen i testbehållarna beskrivs i (7) och (8). Om ett organiskt lösningsmedel används för att tillsätta testsubstansen, bör kontroller med lösningsmedel blandat med testvatten (utan tillsatser) och testvatten blandat med referenssubstans behandlas på samma sätt som aktiva testbehållare med testsubstans i lösningsmedel. Syftet med kontrollerna med lösningsmedel är att undersöka lösningsmedlets eventuella negativa effekter på populationen av mikroorganismer, vilka kan påvisas genom testsubstansens nedbrytning.

1.8.8 **Testförhållanden**

1.8.8.1 *Testtemperatur*

Inkubationen bör ske i mörker (att föredra) eller i diffust ljus vid en kontrollerad (± 2 °C) temperatur som kan vara antingen temperaturen i fält eller en standardtemperatur på 20–25 °C. Temperaturen i fält kan vara antingen provets faktiska temperatur vid provtagningstillfället eller en genomsnittlig temperatur i fält på provtagningsplatsen.

1.8.8.2 *Omblandning*

Omblandning genom kontinuerlig skakning eller omrörning måste ske för att hålla partiklar och mikroorganismer i suspension. Omblandningen underlättar också syretransporten från den inneslutna luftvolymen till vätskan så att tillräckligt aeroba förhållanden kan upprätthållas. Flaskorna ställs på ett skakbord (ca 100 rpm) eller också används magnetomrörare. Omblandningen måste vara kontinuerlig. Skakning eller omrörning bör dock ske så försiktigt som möjligt samtidigt som en homogen suspension upprätthålls.

1.8.8.3 *Testets varaktighet*

Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte ett semikontinuerligt förfarande med regelbunden förnyelse av testsuspensionen används (se avsnitt 1.8.6 och tillägg 2). Testperioden för batchtest kan dock utsträckas till 90 dygn om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen. Nedbrytningen följs med lämpliga tidsintervall genom bestämning av kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller utvecklad $^{14}CO_2$ (se avsnitt 1.8.9.4) och/eller genom kemisk analys (avsnitt 1.8.9.5). Inkubationstiden måste vara tillräckligt lång för att det ska vara möjligt att utvärdera nedbrytningsprocessen. Nedbrytningsgraden bör helst vara högre än 50 %. För ämnen som bryts ned långsamt måste nedbrytningsgraden vara tillräckligt hög (normalt över 20 %) för att det ska vara möjligt att uppskatta en kinetisk hastighetskonstant för nedbrytningen.

pH och syrekoncentration i testsystemet ska mätas regelbundet om inte tidigare erfarenheter från liknande test med vatten- och sedimentprover tagna på samma plats gör sådana mätningar överflödiga. Under vissa förhållanden kan det hända att metabolism av primära substrat vid mycket högre koncentrationer i vattnet eller sedimentet ger tillräckligt stor koldioxidutveckling och syreförbrukning för att påtagligt ändra försöksbetingelserna under testet.

1.8.9 **Förfarande**

1.8.9.1 *Beredning av flaskor för pelagiskt test*

En lämplig volym testvatten förs över till testflaskorna, upp till en tredjedel av flaskvolymen och inte mindre än ca 100 ml. Även om flera flaskor används (för att kunna ta ut hela flaskor vid varje provtagningstidpunkt) är den lämpliga volymen testvatten ca 100 ml, eftersom en liten provvolym kan påverka lagfasens längd. Testsubstansen tillsätts från en stamlösning enligt beskrivning i avsnitten 1.8.2 och 1.8.7. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen åtskilda med en faktor 5–10 bör användas för att bestämma nedbrytningens kinetik och beräkna hastighetskonstanten för nedbrytningen. Båda de valda koncentrationerna bör vara lägre än 100 μg/l och bör helst ligga i intervallet < 1–10 μg/l.

Flaskorna försluts med proppar eller lock som inte släpper genom luft och koldioxid. För icke-flyktiga testsubstanser som inte är ^{14}C-märkta är det lämpligt att använda lösa bomullspluggar som motverkar kontaminering från luften (se avsnitt 1.8.1) under förutsättning att det är känt att alla viktiga nedbrytningsprodukter är icke-flyktiga, och om indirekt bestämning av koldioxid görs (se tillägg 3).

Flaskorna inkuberas vid den valda temperaturen (se avsnitt 1.8.8.1). Prover för kemisk analys eller ^{14}C-mätning tas ut vid testets början (dvs. innan den biologiska nedbrytningen inleds, se avsnitt 1.7.1) och därefter med lämpliga tidsintervall under testets gång. Provtagningen kan göras genom att delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) tas från varje replikat eller genom att hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt. Testsubstansens mineralisering kan bestämmas direkt eller indirekt (se tillägg 3). Vanligen krävs minst fem provtagningar under nedbrytningsfasen (dvs. efter lagfasens slut) för att göra en tillförlitlig bestämning av hastighetskonstanten. För vissa snabbt nedbrytbara ämnen kan det dock vara motiverat att nöja sig med tre provtagningar. För ämnen som inte bryts ned snabbt kan flera mätningar lätt göras under nedbrytningsfasen och därför bör flera datapunkter användas för uppskattning av k. Det kan inte anges något bestämt tidsschema för provtagningen, eftersom den biologiska nedbrytningshastigheten varierar. Provtagning en gång i veckan kan dock rekommenderas om nedbrytningen är långsam. Om testsubstansen är snabbt nedbrytbar, bör provtagning ske en gång per dag under de tre första dygnen och därefter varannan eller var tredje dag. Under vissa omständigheter, exempelvis med ämnen som hydrolyseras mycket snabbt, kan det vara nödvändigt att ta prover en gång i timmen. Det rekommenderas att en preliminär studie görs före testet för att bestämma lämpliga provtagningsintervall. Om prover måste finnas tillgängliga för vidare specifik analys, är det lämpligt att ta flera prover och sedan välja vilka som ska analyseras i slutet av experimentet genom att börja bakifrån, dvs. de sista proverna analyseras först (se andra stycket i avsnitt 1.8.9.5 för vägledning om provernas lagringsbeständighet).

1.8.9.2 *Antal flaskor och prover*

Gör i ordning så många flaskor att det räcker till följande:

— Testflaskor: minst två flaskor för varje koncentration av testsubstansen (helst minst tre) eller flera testflaskor för varje koncentration om hela flaskor ska tas ut vid varje provtagningstidpunkt (betecknas F_T).

— Testflaskor för beräkning av massbalans: minst två flaskor för varje testkoncentration (betecknas F_M).

— Blankprov utan testsubstans: minst en flaska med blankprov innehållande endast testvatten (betecknas F_B).

— Referensprov: två flaskor med referenssubstans (t.ex. anilin eller natriumbensoat, 10 µg/l) (betecknas F_C). Syftet med referensprovet är att fastställa lägsta nivån för mikrobiell aktivitet. Om det är lämpligt kan en radioaktivt märkt referenssubstans användas, även om nedbrytningen av testsubstansen följs genom kemiska analyser.

— Sterilt kontrollprov: en eller två flaskor med steriliserat testvatten för att påvisa eventuell abiotisk nedbrytning och annan icke-biologisk förlust av testsubstansen (betecknade F_S). Den biologiska aktiviteten kan avbrytas genom autoklavering (121 °C, 20 min) av testvattnet eller genom tillsats av ett gift (t.ex. natriumazid (NaN_3) 10–20 g/l, kvicksilverklorid ($HgCl_2$) 100 mg/l eller formalin 100 mg/l) eller med hjälp av gammastrålning. Om $HgCl_2$ används bör det behandlas som giftigt avfall. För vatten med stor tillsats av sediment är det inte lätt att åstadkomma sterila förhållanden. I detta fall rekommenderas upprepad autoklavering (t.ex. tre gånger). Tänk på att autoklavering kan leda till att sedimentets sorptionsegenskaper ändras.

— Kontroller med lösningsmedel, innehållande testvatten och testvatten med referenssubstans: två flaskor behandlade med samma mängd lösningsmedel och med samma förfarande som används för att tillsätta testsubstansen. Syftet är att påvisa eventuella negativa effekter av lösningsmedlet genom att bestämma nedbrytningen av referenssubstansen.

Vid testets utformning bör försöksledaren beakta den relativa betydelsen av flera replikat gentemot ett ökat antal provtagningstidpunkter. Det exakta antalet flaskor som behövs beror på vilken metod som används för att mäta nedbrytningen (se tredje stycket i avsnitt 1.8.9.1, avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3).

Två delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) bör tas ut från varje flaska vid varje provtagningstidpunkt. Om flera flaskor används för att möjliggöra uttag av hela flaskor, bör minst två flaskor offras vid varje provtagningstidpunkt (se första stycket i avsnitt 1.8.9.1).

1.8.9.3 *Beredning av flaskor för suspenderat sediment-test [frivilligt]*

Lämpliga volymer av testvatten och sediment tillsätts i testkärlen (se avsnitt 1.8.5). Beredningen av flaskor för suspenderat sediment sker på samma sätt som för det pelagiska testet (se avsnitten 1.8.9.1 och 1.8.9.2). Använd helst serumflaskor eller flaskor av liknande form. De förslutna flaskorna placeras horisontellt i en skakapparat. Öppna flaskor för icke-flyktiga ämnen som inte är ^{14}C-märkta bör givetvis placeras upprätt. I detta fall rekommenderas magnetomrörning med glasbelagda magnetstavar. Vid behov luftas flaskorna för att upprätthålla lämpliga aeroba förhållanden.

1.8.9.4 *Radiokemiska bestämningar*

Den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts indirekt och direkt (se tillägg 3). $^{14}CO_2$ bestäms indirekt genom skillnaden mellan den initiala ^{14}C-aktiviteten i testvattnet eller suspensionen och den totala kvarvarande aktiviteten vid provtagningstidpunkten mätt efter det att provet surgjorts till pH 2–3 och CO_2 har strippats av. Därigenom avlägsnas organiskt kol och den kvarvarande aktivitet som uppmäts kommer från organiskt material. Indirekt bestämning av $^{14}CO_2$ bör inte ske om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling (se tillägg 3). Om möjligt bör $^{14}CO_2$-utvecklingen mätas direkt (se tillägg 3) i minst en flaska vid varje provtagningstidpunkt. Detta förfarande gör det möjligt att kontrollera både massbalans och biologisk nedbrytning, men det kan bara användas vid test som görs med förslutna flaskor.

Om $^{14}CO_2$-utvecklingen mäts direkt under testet, bör flera flaskor göras i ordning för detta syfte vid testets början. Direkt bestämning av $^{14}CO_2$ rekommenderas om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling. Vid varje mättillfälle surgörs de extra testflaskorna till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ samlas in i ett internt eller externt absorptionsmedel (se tillägg 3).

Eventuellt kan koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och viktiga nedbrytningsprodukter bestämmas med hjälp av radiokromatografi (t.ex. tunnskiktskromatografi, RAD-TLC) eller HPLC med radiokemisk detektion.

Eventuellt kan också fasfördelningen av den kvarvarande radioaktiviteten (se tillägg 1) och rester av testsubstansen och nedbrytningsprodukter bestämmas.

Vid testets slut bör massbalansen bestämmas genom direkt $^{14}CO_2$-mätning i separata testflaskor från vilka inga prover har tagits under testets gång (se tillägg 3).

1.8.9.5 *Specifik kemisk analys*

Om det finns en känslig specifik analysmetod kan den primära biologiska nedbrytningen uppskattas genom mätning av den totala restkoncentrationen av testsubstansen i stället för genom radioaktiv märkning. Om en radioaktivt märkt testsubstans används (för att mäta total mineralisering), kan specifika kemiska analyser göras parallellt för att få värdefull kompletterande information och kontrollera förfarandet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att mäta nedbrytningsprodukter som bildas under testsubstansens nedbrytning, och detta rekommenderas för ämnen som mineraliseras med halveringstider över 60 dygn. Testsubstansens och nedbrytningsprodukternas koncentration vid varje provtagningstidpunkt bör mätas och rapporteras (som koncentration och som procentandel av den tillförda mängden). Detekterade nedbrytningsprodukter, som vid en viss provtagningstidpunkt har en koncentration ≥ 10 % av den tillförda koncentrationen, bör generellt sett identifieras om det inte finns rimlig anledning att avstå. Nedbrytningsprodukter vars koncentrationer kontinuerligt ökar under studien bör helst också identifieras, även om koncentrationerna inte överskrider den ovan nämnda gränsen, eftersom ökningen kan tyda på svårnedbrytbarhet. Analys av nedbrytningsprodukter i sterila kontrollprov bör övervägas om snabb abiotisk omvandling av testsubstansen (t.ex. genom hydrolys) bedöms vara möjlig. Behovet av att kvantifiera och identifiera nedbrytningsprodukter bör bedömas från fall till fall, med motiveringar angivna i rapporten. Metoder som innebär extraktion med organiska lösningsmedel bör användas i enlighet med de riktlinjer som anges för respektive analysförfarande.

Alla prover bör förvaras vid 2–4 °C och lufttätt om analysen utförs inom 24 timmar (att föredra). För längre lagring bör proverna frysas till lägre temperatur än – 18 °C eller behandlas med ett kemiskt konserveringsmedel. Surgörning rekommenderas inte som metod att konservera proverna, eftersom surgjorda prover kan vara instabila. Om proverna inte analyseras inom 24 timmar och lagras under längre tid, bör lagringsbeständigheten undersökas för att visa att de intressanta kemikalierna är stabila om de lagras vid lägre temperatur än – 18 °C eller i konserverad form. Om analysmetoden innebär extraktion med lösningsmedel eller extraktion med fast fas (SPE), bör extraktionen göras omedelbart efter provtagningen eller efter förvaring av provet i kyla i högst 24 timmar.

Beroende på analysmetodens känslighet, kan det vara nödvändigt med större provvolymer än de som anges i punkt 1.8.1. Testet kan lätt utföras med testvolymer på en liter i flaskor med en volym på 2–3 liter, vilket gör det möjligt att ta ut prover på ca 100 ml.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

2.1.1 **Diagram**

Provtagningstiderna avrundas till hela timmar (om inte ämnet bryts ned kraftigt inom minuter eller timmar) men inte till hela dygn. Testsubstansens kvarvarande aktivitet (för ^{14}C-märkta ämnen) eller restkoncentration (för omärkta ämnen) avsätts mot tiden både i ett linjärt och i ett halvlogaritmiskt diagram (se figur 1a och 1b). Om nedbrytning har skett, jämförs resultaten från flaskorna F_T med dem från flaskorna F_S. Om medelvärdena av resultaten från flaskorna med testsubstans (F_T) och de sterila flaskorna (F_S) avviker med mindre än 10 %, kan det antas att den iakttagna nedbrytningen huvudsakligen är abiotisk. Om nedbrytningen i flaskorna F_S är lägre kan siffrorna användas för att korrigera de siffror som erhålls med flaskorna F_T (genom subtraktion) för att uppskatta den biologiska nedbrytningen. Om frivilliga analyser görs av viktiga nedbrytningsprodukter, bör diagram över deras bildning och minskning redovisas utöver diagrammet över testsubstansens minskning.

Uppskatta lagfasens längd t_L utifrån nedbrytningskurvan (halvlogaritmiskt diagram) genom att extrapolera dess linjära del till noll procents nedbrytning eller genom att bestämma tiden för ca 10 % nedbrytning (se figur 1a och 1b). Utifrån det halvlogaritmiska diagrammet bestäms hastighetskonstanten k för första ordningens reaktion, och dess standardfel bestäms genom linjär regression av ln (kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller testsubstansens restkoncentration) mot tiden. Särskilt när det gäller ^{14}C-mätningar bör man tänka på att bara använda data som tillhör den första linjära delen av kurvan efter avslutad lagfas, och hellre välja några få representativa data än flera mer osäkra data. En del av osäkerheten beror här på fel förknippade med den rekommenderade direkta användningen av uppmätt kvarvarande ^{14}C-aktivitet (se nedan). Det kan ibland vara lämpligt att beräkna två olika hastighetskonstanter, om nedbrytningen sker i två faser. I så fall definieras två skilda faser på nedbrytningskurvan. Beräkning av hastighetskonstanten k och halveringstiden $t_{½} = \ln 2/k$ bör göras för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, om delprov tas ut från samma flaska, eller med hjälp av medelvärden, om hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.2). Om det förstnämnda förfarandet följs bör hastighetskonstanten och halveringstiden rapporteras dels för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, dels som medelvärde och medelfel. Om höga koncentrationer av testsubstansen har använts, kan nedbrytningskurvan avvika avsevärt från en rät linje (halvlogaritmiskt diagram) och det är möjligt att första ordningens reaktionskinetik inte är giltig. Bestämning av halveringstid har då ingen mening. För ett begränsat dataintervall kan dock pseudo-första ordningens kinetik tillämpas och nedbrytningens halveringstid DT_{50} (tiden för att nå 50 % nedbrytning) uppskattas. Man måste dock komma ihåg att nedbrytningens förlopp utanför det valda dataintervallet inte kan förutsägas med hjälp av DT_{50} som endast är en deskriptor för en given uppsättning data. Det finns gott om analytiska verktyg som underlättar statistiska beräkningar och anpassning av kurvor, och användning av sådana program rekommenderas.

Om specifika kemiska analyser görs, uppskattas hastighetskonstanter och halveringstider för primär nedbrytning på det sätt som ovan beskrivits för total mineralisering. Om den primära nedbrytningen är den begränsande processen, kan i vissa fall datapunkter från hela nedbrytningsförloppet användas. Detta för att mätningarna är direkta till skillnad från mätningar av ^{14}C-aktivitet.

Om ^{14}C-märkta ämnen används, bör massbalans uttryckas i procent av den tillförda initiala koncentrationen, åtminstone vid testets slut.

2.1.2 **Kvarvarande aktivitet**

När en ^{14}C-märkt del av ett organiskt ämne bryts ned biologiskt, omvandlas större delen av ^{14}C till $^{14}CO_2$, medan en annan del används för uppbyggnad av biomassa och/eller syntes av extracellulära metaboliter. En fullständig biologisk nedbrytning av ett ämne innebär därför inte en hundraprocentig omvandling av dess kol till $^{14}CO_2$. Det ^{14}C som byggs in i produkter som bildas genom biosyntes frigörs sedan långsamt som $^{14}CO_2$ genom s.k. sekundär mineralisering. Diagram över kvarvarande ^{14}C-aktivitet (mätt efter det att CO_2 har strippats av) eller över $^{14}CO_2$-utvecklingen avsatt mot tiden, kommer därför att uppvisa en ”svans” efter avslutad nedbrytning. Detta försvårar en kinetisk tolkning av data, och av denna anledning bör i normala fall endast den första delen av kurvan (efter avslutad lagfas och innan ca 50 % nedbrytning har uppnåtts) användas för att uppskatta hastighetskonstanten för nedbrytningen. Om testsubstansen bryts ned är den totala kvarvarande ^{14}C-aktiviteten alltid högre än den ^{14}C-aktivitet som beror på återstående onedbruten testsubstans. Om testsubstansen bryts ned genom en första ordningens reaktion och en konstant andel α mineraliseras till CO_2, kommer den initiala lutningen på den kurva som visar hur ^{14}C avtar (totalt organiskt ^{14}C avsatt mot tiden) att vara α gånger lutningen för testsubstansens koncentration (eller för att vara noggrann, den del av testsubstansen som är märkt med ^{14}C). Om okorrigerade mätvärden av den totala ^{14}C-aktiviteten används, kommer därför den beräknade hastighetskonstanten för nedbrytningen att vara för låg. Metoder för att uppskatta testsubstansens koncentration utifrån uppmätt radiokemisk aktivitet på grundval av olika förenklande antaganden har beskrivits i litteraturen (2) (9) (10) (11). Dessa metoder är lättast att använda för snabbt nedbrytbara ämnen.

2.2 TOLKNING AV RESULTAT

Om hastighetskonstanten k konstateras vara oberoende av den tillförda koncentrationen (dvs. om k har ungefär samma värde vid olika koncentrationer av testsubstansen) kan det antas att första ordningens hastighetskonstant är representativ för rådande testförhållanden, dvs. testsubstans, vattenprov och testtemperatur. I vilken utsträckning resultaten kan generaliseras eller extrapoleras till andra system måste utvärderas genom en expertbedömning. Om en hög koncentration av testsubstansen används och nedbrytningen därför inte följer första ordningens kinetik, kan data inte användas för direkt uppskattning av första ordningens hastighetskonstant eller motsvarande halveringstid. Data som erhålls från ett test med en hög koncentration av testsubstansen kan dock ändå vara användbara för att uppskatta den totala mineraliseringsgraden och för att påvisa och kvantifiera nedbrytningsprodukter.

Om hastigheterna för andra förlustprocesser än biologisk nedbrytning är kända (t.ex. hydrolys eller avdunstning) kan dessa dras av från den nettoförlusthastighet som observerats under testet för att ge en ungefärlig uppskattning av den biologiska nedbrytningshastigheten. Data över hydrolys kan exempelvis erhållas från det sterila kontrollprovet eller från parallelltest med en högre koncentration av testsubstansen.

Indirekt och direkt bestämning av $^{14}CO_2$ (avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3) kan bara användas för att mäta storleken av testsubstansens mineralisering till CO_2. Radiokromatografi (RAD-TLC) eller HPLC kan användas för att analysera koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och bildning av viktiga nedbrytningsprodukter (tredje stycket i avsnitt 1.8.9.4). För att kunna göra en direkt uppskattning av halveringstiden är det nödvändigt att inga viktiga nedbrytningsprodukter (definierat som ≥ 10 % av den tillförda mängden testsubstans) är närvarande. Om sådana viktiga nedbrytningsprodukter är närvarande, krävs en noggrann utvärdering av data. Detta kan innebära upprepade test och/eller identifiering av nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5) om inte nedbrytningsprodukternas öde kan bedömas på ett rimligt sätt erfarenhetsmässigt (t.ex. med hjälp av information om reaktionsvägen för nedbrytningen). Eftersom den proportion av testsubstansens kol som omvandlas till CO_2 varierar (till stor del beroende på koncentrationen av testsubstans och andra närvarande substrat, testförhållandena och mikroorganismsamhället), möjliggör detta test inte en direkt uppskattning av fullständig biologisk nedbrytning som i ett test av eliminering av löst organiskt kol, men resultatet liknar det som erhålls med ett respirometertest. Mineraliseringsgraden kommer alltså att vara lägre än eller lika med den lägsta nivån av slutlig biologisk nedbrytning. För att få en mer fullständig bild av den slutliga biologiska nedbrytningen (mineralisering och inkorporering i biomassa), bör analysen av fasfördelningen av ^{14}C utföras i slutet av testet (se tillägg 1). Det ^{14}C som ingår i partikelfasen utgörs av ^{14}C inkorporerat i bakteriebiomassa och ^{14}C sorberat till organiska partiklar.

2.3 TESTETS VALIDITET

Om referenssubstansen inte bryts ned inom det förväntade tidsintervallet (för anilin och natriumbensoat vanligen mindre än två veckor), kan testets validitet betvivlas och måste verifieras ytterligare, eller också görs testet om med ett nytt vattenprov. I en ISO-interkalibrering av metoden, där sju laboratorier från olika delar av Europa deltog, låg de anpassade hastighetskonstanterna för nedbrytning av anilin i intervallet 0,3–1,7 $dygn^{-1}$ med ett medelvärde på 0,8 $dygn^{-1}$ vid 20 °C och ett standardfel på 0,4 $dygn^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 dygn). Lagfasen varade normalt mellan 1 och 7 dygn. De undersökta vattnen rapporterades ha en bakteriebiomassa motsvarande 10^3–10^4 kolonibildande enheter (CFU) per ml. Nedbrytningshastigheterna i näringsrika mellaneuropeiska vatten var högre än i nordiska näringsfattiga vatten, vilket kan bero på olikheten i näringsstatus eller tidigare exponering för kemiska ämnen.

Det totala utbytet (massbalans) vid experimentets slut bör ligga mellan 90 % och 110 % för radioaktivt märkta ämnen, medan det initiala utbytet av experimentets början bör ligga mellan 70 % och 110 % för omärkta ämnen. Dessa intervall bör dock endast ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras.

3. TESTRAPPORT

Typen av undersökning, dvs. pelagiskt test eller suspenderat sediment-test, ska klart anges i testrapporten, som också ska innehålla åtminstone följande uppgifter:

Testsubstans och referenssubstans(er):

— Trivialnamn, kemiska namn (IUPAC-namn och/eller CAS-namn rekommenderas), CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos testsubstans och referenssubstans (se avsnitten 1.5 och 1.6).

— Kemiska namn, CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos ämnen som används som standard för identifiering och kvantifiering av nedbrytningsprodukter.

— Test- och referenssubstansers renhet och eventuella föroreningar.

— Radiokemisk renhet hos den märkta kemikalien och dess specifika aktivitet (i tillämpliga fall).

Ytvatten:

För de vattenprover som tas ska minst följande uppgifter anges:

— Läge och beskrivning av provtagningsstället, om möjligt även dess föroreningshistoria.

— Datum och tid för provtagning.

— Näringsämnen (total-N, ammonium, nitrit, nitrat, total-P, löst ortofosfat).

— Provtagningsdjup.

— Provets utseende (t.ex. färg och grumlighet).

— DOC och TOC.

— BOD.

— Temperatur och pH på provtagningsplatsen vid provtagningstillfället.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder).

— Salthalt eller konduktivitet (om det är fråga om saltvatten eller bräckt vatten).

— Suspenderade fasta ämnen (om provet är grumligt).

— Eventuellt annan relevant information om provtagningsplatsen vid provtagningstillfället (t.ex. aktuella eller historiska uppgifter om flödeshastighet i vattendrag eller havsströmmar, större utsläpp i närheten och utsläppstyp, väderförhållanden före provtagningstillfället).

Frivilligt anges följande:

— Mikrobiell biomassa (t.ex. direkt räkning med akridinorange eller kolonibildande enheter).

— Oorganiskt kol.

— Klorofyll-a-koncentration som ett specifikt mått på algbiomassa.

Dessutom bör följande uppgifter om sediment lämnas om test med suspenderat sediment görs:

— På vilket djup sedimentprovet tagits.

— Sedimentets utseende (t.ex. färgat, lerigt, dyigt eller sandigt).

— Textur (t.ex. % grovsand, finsand, mjäla och lera).

— Torrvikt av suspenderade fasta ämnen i g/l, TOC-koncentration eller glödförlust som ett mått på innehåll av organiskt material.

— pH.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder.

Testförhållanden:

— Tid mellan provtagning och användning i laboratorietest, lagring och förbehandling av provet, datum då undersökningen gjordes.

— Tillförd mängd testsubstans, testkoncentration och referenssubstans.

— Metod för tillförsel av testsubstans med uppgift om eventuella lösningsmedel.

— Använd volym ytvatten och sediment (i tillämpliga fall) samt provvolym som tagits ut för analys vid varje provtagningstidpunkt.

— Beskrivning av det använda testsystemet.

Om inkubationen inte sker i mörker, information om ”diffusa ljusförhållanden”:

— Information om metod(er) som används för att bereda sterila kontrollprover (t.ex. temperatur, tid och antal autoklaveringar).

— Inkubationstemperatur.

— Information om analysmetoder och metoder som används för radiokemiska mätningar, massbalanskontroll och mätningar av fasfördelning (om detta genomförs).

— Antal replikat.

Resultat:

— Procentuellt utbyte (se avsnitt 1.7.1).

— Repeterbarhet och känslighet hos de analysmetoder som används samt detektionsgräns och kvantifieringsgräns (se avsnitt 1.7.2).

— Alla mätdata (även provtagningstidpunkter) och beräknade värden i tabellform och nedbrytningskurvor. För varje testkoncentration och för varje flaska som är replikat rapporteras den linjära korrelationskoefficienten för den logaritmiska kurvans lutning, uppskattad lagfas och första eller pseudo-första ordningens hastighetskonstant (om möjligt) samt motsvarande halveringstid för nedbrytningen (eller halveringstiden t_{50}).

— Relevanta värden rapporteras som medelvärden av de resultat som observeras i enskilda replikat, t.ex. lagfasens längd, hastighetskonstanten och halveringstiden för nedbrytningen (eller t_{50}).

— Systemet kategoriseras som antingen ej adapterat eller adapterat med utgångspunkt från nedbrytningskurvans utseende och eventuell påverkan från testkoncentrationen.

— Resultaten av den slutliga kontrollen av massbalans och av mätningar av fasfördelning (i tillämpliga fall).

— Andelen mineraliserat ^{14}C och, om specifika analyser görs, slutlig grad av primär nedbrytning.

— Identifiering, molaritet och procentandel av tillförda och viktiga nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5), i tillämpliga fall.

— Föreslagen reaktionsväg för omvandlingen, i tillämpliga fall.

— Diskussion av resultaten.

4. LITTERATUR

1. OECD TG 309 (2004). Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592–1 (1999). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. 47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

Tillägg 1

Fasfördelning av ^{14}C

För att kontrollera förfarandet bör de rutinmässiga mätningarna av kvarvarande total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA) kompletteras med mätningar av massbalans, inklusive en direkt bestämning av utvecklad $^{14}CO_2$ efter uppfångning i ett absorptionsmedel (se tillägg 3). En positiv bildning av $^{14}CO_2$ är i sig själv ett direkt bevis på biologisk nedbrytning, i motsats till abiotisk nedbrytning och andra förlustmekanismer, exempelvis avdunstning och sorption. Ytterligare värdefull information om den biologiska nedbrytningsprocessen kan erhållas genom mätningar av den totala ^{14}C-aktivitetens fördelning mellan löst tillstånd (^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol, DOA) och partikeltillstånd (^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol, POA) efter separation av partiklar genom membranfiltrering eller centrifugering. POA utgörs av testsubstans sorberad på den mikrobiella biomassan och på andra partiklar utöver det kol i testsubstansen som har använts för syntes av nytt cellulärt material och därigenom inkorporerats i den partikulära biomassafraktionen. Bildningen av löst organiskt ^{14}C-material kan uppskattas som DOA vid slutet av den biologiska nedbrytningen (platå på kurvan med nedbrytning avsatt mot tiden).

Fasfördelningen av kvarvarande ^{14}C i utvalda prover uppskattas genom filtrering av prov på ett membranfilter med porstorleken 0,22 µm eller 0,45 µm av ett material som inte adsorberar betydande mängder av testsubstansen (polykarbonatfilter kan vara lämpliga). Om testsubstansens sorption på filtret inte är försumbar (kontrolleras före experimentet), kan höghastighetscentrifugering (2 000 g i 10 minuter) användas i stället för filtrering.

Filtratet eller centrifugatet behandlas på det sätt som beskrivs i tillägg 3 för ofiltrerade prover. Lös upp membranfiltret i en lämplig scintillationsvätska och räkna på vanligt sätt. Normalt används metoden med extern standardkvot för att korrigera för quenching, eller också behandlas provet med ett oxidationsmedel. Om centrifugering har använts, resuspenderas den pellet som bildats av partikelfraktionen i 1–2 ml destillerat vatten och överförs till en scintillationsflaska. Därefter sköljs två gånger med 1 ml destillerat vatten och sköljvattnet överförs till flaskan. Vid behov kan suspensionen läggas i en gel för vätske-scintillationsräkning.

Tillägg 2

Semikontinuerligt förfarande

En förlängd inkubering upp till flera månader kan krävas för att få en tillräcklig nedbrytning av svårnedbrytbara ämnen. Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte det ursprungliga vattenprovets egenskaper bibehålls genom förnyelse av testsuspensionen. Testperioden kan dock utsträckas till högst 90 dygn utan förnyelse av testsuspensionen om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen.

Om inkubationen varar lång tid kan mikroorganismsamhällets diversitet minska på grund av olika förlustmekanismer och på grund av att viktiga näringsämnen och primära kolsubstrat i vattenprovet förbrukas. Därför rekommenderas att ett semikontinuerligt test används för att på ett tillfredsställande sätt bestämma nedbrytningshastigheten för ämnen som bryts ned långsamt. Testet bör redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande om, på grundval av tidigare erfarenhet, en inkubationstid på tre månader bedöms vara nödvändig för att uppnå 20 % nedbrytning av ämnet. Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande. Det semikontinuerliga förfarandet kan avbrytas och testet fortsättas som ett batchexperiment när en betydande nedbrytning har registrerats (t.ex. > 20 %).

I det semikontinuerliga testet ersätts varannan vecka ca en tredjedel av testsuspensionen med nytaget vatten med tillsats av testsubstans till initial koncentration. Även sediment tillsätts det nya vattnet till initial koncentration (mellan 0,01 och 1 g/l) om det frivilliga suspenderat sediment-testet görs. Vid utförande av test med suspenderat fast sediment är det viktigt att ett helt suspenderat system upprätthålls även vid förnyelse av vatten, och att uppehållstiden är identisk för fasta ämnen och vatten. I annat fall kan den avsedda likheten med ett homogent vattensystem utan bestämda faser utebli. Av dessa skäl rekommenderas att den initiala koncentrationen av suspenderat sediment ligger i den lägre delen av det angivna intervallet när det semikontinuerliga förfarandet används.

Den föreskrivna tillsatsen av testsubstans innebär att den initiala koncentrationen inte överskrids genom den partiella förnyelsen av testsuspensionen och därigenom undviks den adaptation som ofta ses vid höga koncentrationer av testsubstansen. Eftersom förfarandet innebär både en förnyad ympning och en kompensation av förbrukade näringsämnen och primärt substrat, återställs den ursprungliga mikrobiella diversiteten, och testet kan i princip pågå i oändlighet. När det semikontinuerliga förfarandet används är det viktigt att notera att den kvarvarande koncentrationen av testsubstansen måste korrigeras för de mängder testsubstans som tillförs och avlägsnas vid varje förnyelse. För lågsorberande ämnen kan testsubstansens totala koncentration antas vara lika med den lösta koncentrationen. Sorptionen är obetydlig (< 5 %) under angivna förhållanden (0,1–1 g fasta ämnen/l) för ämnen för vilka log K_{ow} < 3 (gäller för neutrala, lipofila föreningar). Detta illustreras av följande beräkningsexempel: 0,1 g/l av fasta ämnen motsvarar ungefär 10 mg kol per liter (andelen kol f_C = 0,01). Antag att

Log K_{ow} (för testsubstansen) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Fördelningskoefficienten $K_d = f_C \times K_{oc}$

Då är den lösta delen av den totala koncentrationen (C-vatten (C_w)/C-total (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

Tillägg 3

Bestämning av $^{14}CO_2$

Indirekt $^{14}CO_2$-bestämning

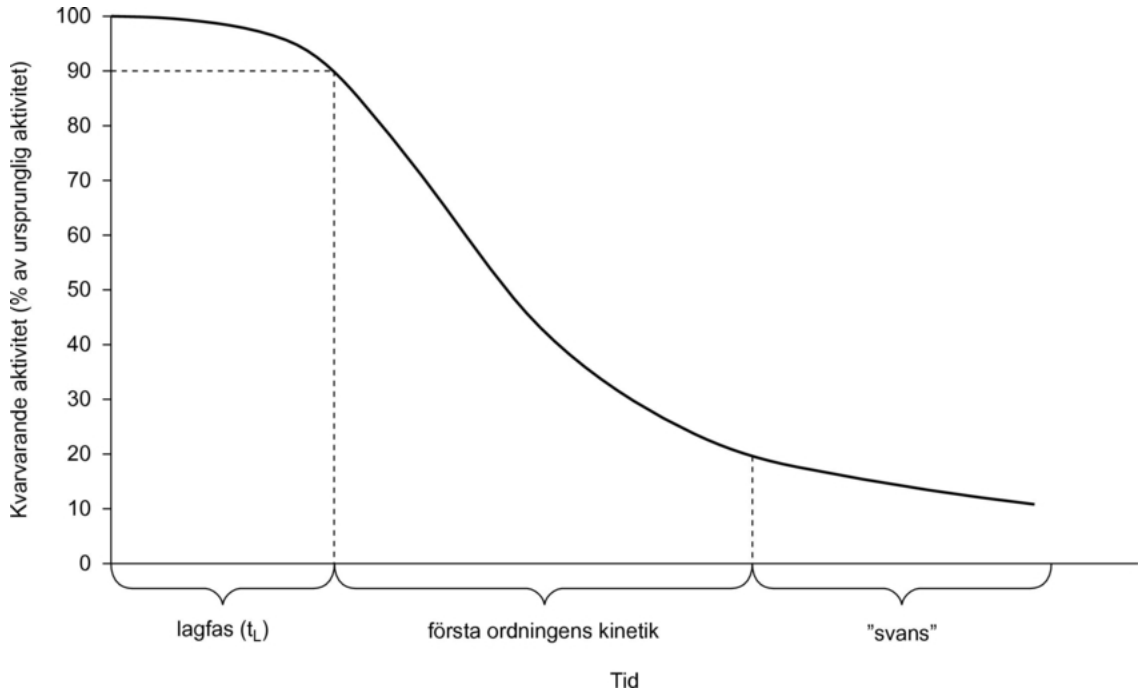
För rutinmässiga mätningar är i normala fall den indirekta metoden den minst tidskrävande och noggrannaste metoden om testsubstansen är icke-flyktig och inte omvandlas till flyktiga nedbrytningsprodukter. Ofiltrerade prover på t.ex. 5 ml förs över till scintillationsflaskor. Lämplig aktivitet i proverna är 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) initialt, med en lägsta initial aktivitet på ca 1 000 dpm. CO_2 strippas av efter surgörning till pH 2–3 med 1–2 droppar koncentrerad H_3PO_4 eller HCl. CO_2 kan strippas av genom bubbling med luft i ca ½–1 timme. Alternativt kan flaskorna skakas kraftigt i 1–2 timmar (t.ex. på ett skakbord för mikrotiterplattor) eller mer försiktigt över natten. Effektiviteten vid strippning av CO_2 måste kontrolleras (genom att tiden för luftning eller skakning förlängs). Därefter tillsätts en scintillationsvätska som är lämplig för att räkna vattenprov, provet homogeniseras med en virvelblandare och radioaktiviteten bestäms genom vätskescintillationsräkning, med avdrag för den bakgrundsaktivitet som uppmäts i blankproverna (F_B). Om testvattnet inte är kraftigt färgat och inte har en hög partikelkoncentration, uppvisar proverna normalt sett en enhetlig quenching, och det räcker då att korrigera för quenching med hjälp av en extern standard. Om testvattnet är kraftigt färgat kan det vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard. Om partikelkoncentrationen är hög kan det vara omöjligt att åstadkomma en homogen lösning eller gel, eller också kan det vara stor variation i quenching mellan olika prover. I så fall kan den nedan beskrivna räknemetoden för testslam användas. Om testet utförs som ett suspenderat sediment-test, kan $^{14}CO_2$ mätning göras indirekt genom att ett homogent 10 ml prov av testvatten/suspension tas ut och faserna separeras genom centrifugering vid lämplig hastighet (t.ex. 40 000 m/s^2 i 15 minuter). Vattenfasen behandlas sedan enligt beskrivningen nedan. ^{14}C-aktiviteten i partikelfasen (POA) bestäms genom att sedimentet resuspenderas i en liten volym destillerat vatten, överförs till scintillationsflaskor och tillsätts scintillationsvätska så att en gel bildas (det finns särskilda scintillationsvätskor för det ändamålet). Beroende på partiklarnas karaktär (t.ex. deras innehåll av organiskt material) kan det vara lämpligt att låta provet sönderdelas över natten med ett vävnadsupplösande ämne och sedan homogeniseras med en virvelblandare före tillsats av scintillationsvätska. Alternativt kan POA bestämmas genom förbränning i syreöverskott med hjälp av en provoxiderare. Vid räkning bör interna standarder alltid ingå, och det kan vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard i varje enskilt prov.

Direkt $^{14}CO_2$-bestämning

Om den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts direkt bör detta göras genom att flera flaskor görs i ordning vid testets början, och testflaskorna provtas vid varje mättidpunkt genom att surgöras till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ tas upp i ett internt (placerat i varje flaska vid testets början) eller externt absorptionsmedel. Som absorptionsmedel kan användas antingen alkali (t.ex. 1 N NaOH-lösning eller en NaOH-pellet), etanolamin eller ett etanolaminbaserat absorptionsmedel eller kommersiellt tillgängliga absorptionsmedel. För direkt mätning av $^{14}CO_2$, bör flaskorna vara förslutna med exempelvis butylgummimembran.

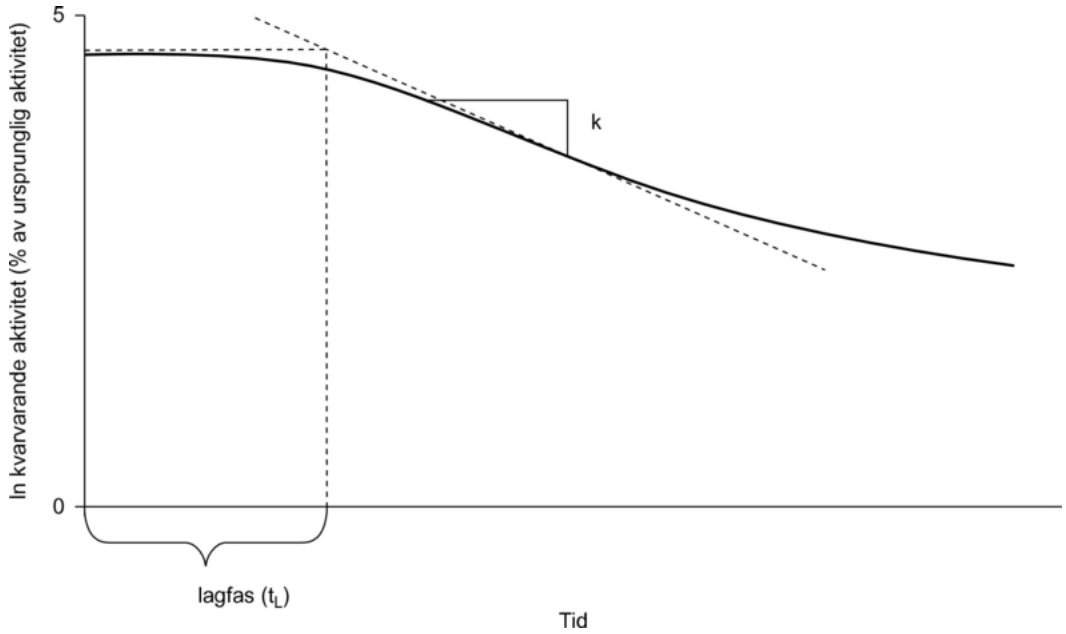
Figur 1a

Exempel på ett aritmetiskt diagram över data (kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



Figur 1b

Exempel på ett halvlogaritmiskt diagram över data (ln kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



BILAGA VI

C.26 BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS FLYTBLADSVÄXTEN *LEMNA* SP. (ANDMAT)

1. METOD

Metoden motsvarar OECD TG 221 (2006) (1). Det finns ett brett samförstånd hos EU:s myndigheter om att *Lemna*-testet är ett lämpligt alternativ till ett algtest för kraftigt färgade substanser (2)(3).

1.1 INLEDNING

Metoden är avsedd för bestämning av substansers toxicitet mätt som tillväxthämning hos sötvattensväxter av släktet *Lemna* (andmat). Metoden bygger på existerande standardmetoder (4, 5, 6, 7, 8 och 9) som har modifierats enligt nya forskningsrön och genom samråd, i regel mellan experter. Den föreslagna metoden har validerats genom ett internationellt ringtest, dvs. en provningsjämförelse mellan olika laboratorier i världen (10).

Metoden används för toxicitetstest med hjälp av *Lemna gibba* och *Lemna minor*. Båda dessa arter har studerats ingående och har använts i test med de standardmetoder som det hänvisas till ovan. Taxonomin för *Lemna* spp. är komplicerad på grund av mångfalden fenotyper. Hos *Lemna* kan responsen på toxiska substanser variera på grund av genetiska skillnader, men för närvarande saknas det tillräckligt med underlag om dessa orsaker för att man ska kunna rekommendera en bestämd klon för användning med den aktuella metoden. Observera att testet inte utförs axeniskt (dvs. med en-arts-kultur fri från infektion av mikroorganismer), men åtgärder vidtas i skeden under testets gång för att hålla kontamination från andra organismer så låg som möjligt.

Dokumentet innehåller ingående beskrivningar av semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösningar), statiskt testförfarande (utan förnyelse av testlösningar) och genomflödestest (med kontinuerligt byte av testlösning). Beroende på lagstadgade krav och syftet med testet kan semistatiskt testförfarande eller genomflödestest komma i fråga i vissa fall, t.ex. för substanser som snabbt försvinner ur lösningen genom avdunstning, ljusnedbrytning, utfällning eller biologisk nedbrytning. Närmare riktlinjer finns i (11).

1.2 DEFINITIONER

I denna metodbeskrivning används följande definitioner och förkortningar med de betydelser som här anges:

biomassa: torrvikt av levande materia i en population. I detta test mäts vanligtvis ersättningsmått för vikten, som t.ex. antalet fronder (bladliknande del av planta) eller deras totala area. Termen ”biomassa” hänför sig således även till dessa ersättningsmått.

EC_x: beteckning på den koncentration av testsubstansen som är löst i testmediet och som reducerar tillväxten av *Lemna* med x % (t.ex. 50 %) inom en bestämd exponeringstid, som måste specificeras om den avviker från den fullständiga eller normala tiden för testets genomförande. För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (n), där n = ”antal fronder”.

effektmått (eng. *”endpoint”*): den allmänna faktor som genom inverkan av en testsubstans i ett prov förändras jämfört med ett kontrollprov utan testsubstans. I det aktuella testet är effektmåttet tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

fenotyp: observerbara egenskaper hos en organism vilka bestäms av interaktionen mellan organismens gener och dess omgivning.

frond: enskild bladliknande del av andmatsplantans struktur. Det är den minsta enhet, dvs. individ, som har förökningsförmåga.

genomflödestest: testlösningen ersätts hela tiden kontinuerligt med färsk lösning.

klon: organism eller cell som uppstått från en enskild individ genom asexuell (vegetativ) förökning. Individer från samma klon är därför genetiskt identiska.

kloros: gulning av bladvävnad.

koloni: samling av moder- och dotterfronder (vanligtvis 2–4 stycken) som sitter fast vid varandra. Ibland används termen ”planta”.

koncentration utan observerad effekt (”NOEC – No Observed Effect Concentration”): koncentration av testsubstansen som ligger omedelbart under LOEC.

lägsta koncentration med observerad effekt (”LOEC – Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta koncentration av testsubstansen vid vilken man kan iaktta att den har en statistiskt signifikant reducerande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med ett kontrollprov (i fortsättningen kortfattat benämnt ”kontroll”). Ytterligare ett villkor är att alla koncentrationer av testsubstansen vilka ligger över LOEC måste ha en skadlig effekt lika med eller större än den effekt som observeras vid LOEC. Om dessa båda dessa villkor inte är uppfyllda, måste en fullständig redogörelse lämnas för hur LOEC (och därmed NOEC) har valts.

monokultur: kultur bestående av en enda art.

mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets effektmått med hjälp av en eller flera responsvariabler. I den aktuella metoden är frondantal, total frondarea, färskvikt och torrvikt mätvariabler.

nekros: död bladvävnad. Syns på att den är vit eller vattenindränkt.

producerad mängd biomassa: storleken på en mätvariabel för biomassa vid exponeringstidens slut minskad med storleken på samma mätvariabel vid exponeringstidens början.

responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att man använder olika beräkningsmetoder på mätvariabler som beskriver biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom frondantal, total frondarea, färskvikt eller torrvikt.

semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): testlösningen byts med bestämda intervall under testet, dvs. förbrukad lösning tas regelbundet bort och ersätts med färsk.

statiskt testförfarande: testlösningen byts inte under testet.

svullen frond: frond med ”buckligt” eller svullet utseende.

testmedium: syntetiskt odlingsmedium där testplantorna befinner sig när de exponeras för testsubstansen. Testsubstansen är normalt löst i testmediet.

tillväxt: ökning av en mätvariabel – t.ex. frondantal, torrvikt, våtvikt eller total frondarea – mätt över tiden för testets genomförande.

tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mängden biomassa under exponeringstiden.

1.3 PRINCIPER

Exponentiellt växande växtkulturer av släktet *Lemna* får växa som monokulturer i olika koncentrationer av testsubstansen under loppet av sju dagar. Syftet är att genom bestämning av mätvariabler kvantifiera testsubstansens effekter på tillväxten under tiden för testets genomförande. Antalet fronder är den primära mätvariabeln. Minst ytterligare en mätvariabel – total frondarea, torrvikt eller färskvikt – mäts, eftersom en del substanser kan påverka andra mätvariabler mer än de påverkar frondantalet. För att kvantifiera testsubstansens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med tillväxten i kontrollerna. Därefter bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som EC_x, t.ex. EC_{50} i fallet med 50 % tillväxthämning.

Effektmåttet i testet är tillväxthämningen uttryckt som den logaritmiska ökningen av mätvariabeln – dvs. den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten – under exponeringstiden. Med hjälp av de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som registrerats i en serie testlösningar bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som E_rC_x, t.ex. E_rC_{50} i fallet 50 %.

Ytterligare en responsvariabel som används i metoden är den producerade mängden biomassa, en variabel som i vissa länder är föreskriven i lagen. Den definieras som storleken på en mätvariabel för biomassa vid exponeringstidens slut minskad med storleken på samma mätvariabel vid exponeringstidens början. Med hjälp av den producerade mängd biomassa som registrerats i en serie testlösningar bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som E_yC_x, t.ex. E_yC_{50} i fallet 50 %.

Utöver detta kan man statistiskt bestämma den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och koncentrationen utan observerad effekt (NOEC).

1.4 TESTSUBSTANS

Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testsubstansen i testmediet.

Bland annat följande uppgifter om testsubstansen kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna: strukturformel, renhetsgrad, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, K_{ow}, ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant. Storleken på denna konstant visar om det är sannolikt att förlusterna av testsubstansen under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande, och om man behöver vidta åtgärder för att behärska dessa förluster. Om uppgifterna om testsubstansens löslighet och stabilitet är osäkra, bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet.

När det är särskilt viktigt att reglera testmediets pH, t.ex. vid test av hydrolytiskt instabila metaller eller substanser (dvs. sådana som bryts ned i vatten), bör man tillsätta en buffert i odlingsmediet (se första stycket i avsnitt 1.7.4). Ytterligare vägledning för test av substanser med fysikalisk-kemiska egenskaper som gör dem besvärliga att testa finns i (11).

1.5 REFERENSSUBSTANS

En eller flera referenssubstanser – t.ex. 3,5-diklorfenol som används i det internationella ringtestet (10) – bör testas för att kontrollera testresultatens giltighet. En referenssubstans bör testas minst två gånger per år. Om testen utförs mer sällan bör referenssubstansen testas direkt i samband med respektive test.

1.6 KRITERIER FÖR TESTRESULTATENS GILTIGHET

För att testresultaten ska vara giltiga måste fördubblingstiden för frondantalet i kontrollen vara mindre än 2,5 dagar (60 timmar). Det motsvarar en ökning på ca 700 % på 7 dagar och en genomsnittlig specifik tillväxthastighet på 0,275 d^{-1}. Med de testmedier och testbetingelser som beskrivs för den aktuella metoden kan detta kriterium uppfyllas med statiskt testförfarande (8). Kriteriet bör också kunna uppfyllas vid semistatiskt testförfarande och genomflödestest. Beräkningen av fördubblingstiden beskrivs i avsnitt 2.1.

1.7 METODBESKRIVNING

1.7.1 **Utrustning**

All utrustning som befinner sig i kontakt med testmedier ska vara av glas eller annat kemiskt inert material. Glasutrustning, som används för odling och test, ska vara rengjord från kemiska föroreningar som kan läcka in i testmediet, och glaset ska vara sterilt. Provkärlen ska vara så vida att fronderna från de olika kolonierna i kontrollerna kan växa utan att de täcker varandra i slutet av testet. Det gör inget om rötterna vidrör botten av provkärlen, men alla provkärl bör vara minst 20 mm djupa och ha en volym på minst 100 ml. Så länge dessa krav är uppfyllda har valet av provkärl ingen avgörande betydelse. Glasbägare och kristalliseringsskålar samt Petriskålar av glas – alla med passande storlekar – har alla visat sig vara lämpliga. Provkärlen måste vara tillslutna för att avdunstning och oavsiktlig kontamination ska hållas så låg som möjlig, samtidigt som erforderlig luftväxling ska vara möjlig. Provkärlen – framför allt lock, proppar eller andra typer av förslutningar – måste vara sådana att det inte förekommer någon skuggverkan eller förändringar av ljusets spektrala egenskaper.

Odlingar och provkärl får inte förvaras tillsammans. Bäst är att använda separata klimatkammare, inkubatorer eller klimatrum. Belysning och temperatur måste kunna regleras och hållas på konstant nivå (se avsnitt 1.7.8).

1.7.2 **Testorganism**

Som organism för testet används *Lemna gibba* eller *Lemna minor*. Tillägg 1 innehåller kortfattade beskrivningar av andmatsarter som har använts för toxicitetstest. Växtmaterial kan tas från en kultursamling, införskaffas från ett annat laboratorium eller samlas in i naturen. Plantor som samlas in i naturen ska under minst 8 veckor hållas i samma medium som används för testet. Det får inte finnas några uppenbara kontaminationskällor på platser som används för insamling i naturen. Växtmaterial som införskaffas från andra laboratorier eller från kultursamlingar ska förvaras under minst 3 veckor på samma sätt som för plantor från naturen. Man ska alltid redovisa ursprunget – om det är känt – för växtmaterialet, de arter och den klon som används för testet.

Man ska använda monokulturer utan synliga föroreningar i form av andra organismer såsom alger och protozoer. Friska plantor av *L. minor* består av kolonier med 2–5 fronder, medan friska kolonier av *L. gibba* kan omfatta upp till 7 fronder.

Kvaliteten och enhetligheten hos plantorna som används för testet har ett stort inflytande på testresultatet, och de bör därför väljas ut med omsorg. Unga, snabbväxande plantor utan synliga skador eller missfärgningar (på grund av kloros) ska användas. Att en kultur är högvärdig syns på att den har en stor andel kolonier med minst 2 fronder. Ett stort antal enstaka fronder är ett tecken på miljöstress, t.ex. på grund av näringsbrist. Använd inte växtmaterial från sådana kulturer för test.

1.7.3 **Odling**

För att göra odlingen mindre arbetskrävande – t.ex. när inga test av *Lemna* är inplanerade under en längre tid – kan kulturerna förvaras under reducerad belysning och temperatur (4–10 °C). Närmare uppgifter om detta och andra uppgifter om behandling av stamkulturer finns i tillägg 2. Om det märks tydliga tecken på föroreningar i form av alger eller andra organismer krävs ytsterilisering av ett delprov av fronder från *Lemna*. Det förs sedan över till färskt medium (se tillägg 2). I detta fall måste den återstående delen av den kontaminerade kulturen kasseras.

Minst 7 dagar före testet förs en tillräcklig mängd kolonier aseptiskt över till färskt medium och odlas under 7–10 dagar under testbetingelser.

1.7.4 **Testmedier**

För *Lemna minor* och *Lemna gibba*, rekommenderas olika medier (se nedan). Man bör noggrant överväga om man ska tillsätta en pH-buffert i testmediet: MOPS [(4-morfolino)propansulfonsyra, CAS-nr 1132–61–2; Einecs-nr 214–478–5] i mediet för *L. minor* och $NaHCO_3$ i mediet för *L. gibba* när man misstänker att mediet kan reagera med testsubstansen och påverka dess toxicitetseffekt. Steinbergs medium (12) kan också användas förutsatt att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

En modifierad form av det odlingsmedium för *Lemna* som är standardiserat av det svenska standardiseringsorganet SIS rekommenderas för odling och test med *L. minor*. Sammansättningen av detta medium återfinns i tillägg 3.

Odlingsmediet 20X-AAP, som beskrivs i tillägg 3, rekommenderas för odling och test med *L. gibba*.

Steinbergs medium, som beskrivs i tillägg 3, passar också för *L. minor* men kan också användas för *L. gibba* så länge kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

1.7.5 **Testlösningar**

Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningar av testsubstansen bereds normalt genom att substansen löses i ett odlingsmedium.

Den högsta koncentrationen av testsubstansen bör normalt inte överskrida dess vattenlöslighet under testbetingelserna. Observera dock att *Lemna* spp. flyter på vätskeytan och kan exponeras för substanser som samlas i gränsytan mellan vatten och luft, t.ex. hydrofoba substanser och substanser med låg vattenlöslighet. Under sådana omständigheter kommer plantan att exponeras för andra koncentrationer av substansen än de som förekommer i lösningen. Koncentrationerna kan därför – beroende på testsubstansens egenskaper – överskrida vattenlösligheten. För testsubstanser med låg vattenlöslighet kan det bli nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller

en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testsubstans i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av substansen. Man ska därför så långt som möjligt undvika att använda sådana substanser. Det får inte uppstå fytotoxicitet genom att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel, som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l, är aceton och dimetylformamid. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används, bör dess slutkoncentration redovisas och hållas så låg som möjligt (≤ 100 µl/l). Alla test- och kontrollösningar bör ha samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedel. Mer information om användningen av dispergeringsmedel finns i (11).

1.7.6 **Test- och kontrollgrupper**

Förkunskap om testsubstansens toxicitet för *Lemna*, t.ex. erhållen genom ett förberedande test av koncentrationsintervallet för toxiciteten, underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer. I det slutliga toxicitetstestet ska det normalt finnas minst 5 koncentrationer ordnade i geometrisk serie. Separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överskrida 3,2, men om dos-respons-kurvan är flack, kan en större separationsfaktor användas. Om färre än 5 koncentrationer används ska en motivering lämnas. Minst 3 replikat ska användas för respektive testkoncentration.

När man fastställer intervallet av testkoncentrationer (för det förberedande testet eller för det slutliga toxicitetstestet), ska man beakta följande:

— För att bestämma en EC_x-koncentration ska värdet på EC_x ligga innanför intervallet av testkoncentrationer för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50}, ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50}. Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet av testkoncentrationerna, blir motsvarande konfidensintervall stora, och då är det svårt att bedöma om modellen är statistiskt lämplig.

— Om syftet är att bestämma LOEC eller NOEC, ska den lägsta testkoncentrationen vara så låg att tillväxten inte är märkbart mindre än tillväxten i kontrollen. Den högsta testkoncentrationen ska vara så hög att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Om dessa villkor inte är uppfyllda måste testet göras om med ett annat koncentrationsintervall (såvida inte den högsta koncentrationen ligger på löslighetsgränsen eller är lika med den högsta erforderliga gränskoncentrationen, t.ex. 100 mg/l).

I varje test ska ingå kontroller med samma näringsmedium, frondantal, antal kolonier, miljöbetingelser och förfaranden som för provkärlen, men utan testsubstans. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används som hjälpmedel i testet, krävs ytterligare ett kontrollprov, nu med samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedlet som i provkärlen med testsubstansen. Antalet replikatkärl med kontroller – och i tillämpliga fall kärl med lösnings- eller dispergeringsmedel – ska vara minst lika med – eller helst dubbelt så många som – antalet kärl som används för respektive testkoncentration.

Om NOEC inte behöver bestämmas, får testförfarandet modifieras genom att öka antalet koncentrationer och minska antalet replikat per koncentration. Antalet kontrollreplikat måste dock vara minst tre.

1.7.7 **Exponering**

Kolonier med 2–4 synliga fronder förs över från ympkulturen och fördelas slumpmässigt i provkärlen under aseptiska förhållanden. Alla provkärl ska vardera innehålla sammanlagt 9–12 fronder. Antalet fronder och kolonier ska vara detsamma i alla provkärl. Erfarenheter från användning av denna metod och resultat från ringtest har visat att 3 replikat per testlösning (testkoncentration), där alla replikat från början innehåller 9–12 fronder, är tillräckligt för att man ska upptäcka skillnader i tillväxt mellan testlösningarna på cirka 4–7 procents tillväxthämning (beräknad enligt tillväxthastighet) och 10–15 procents tillväxthämning (beräknad enligt producerad mängd biomassa) (10).

Provkärlen måste placeras slumpmässigt i inkubatorn för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur. Det krävs också blockvis fördelning eller slumpmässig omplacering av kärlen vid varje mättillfälle, eller oftare.

Om ett förberedande stabilitetstest visar att koncentrationen av testsubstansen inte kan upprätthållas under tiden för testets genomförande (7 dagar) – dvs. den uppmätta koncentrationen sjunker under 80 % av det uppmätta startvärdet – bör semistatiskt testförfarande användas. I det fallet exponeras kolonierna för nyberedda test- och kontrollösningar vid minst 2 tillfällen under testet, t.ex. på dag 3 och 5. Intervallen för byte till färskt medium beror på stabiliteten hos testsubstansen – det kan krävas kortare intervall för att upprätthålla nära nog konstanta koncentrationer av mycket instabila eller flyktiga substanser. I visa fall måste man använda genomflödestest (se 11 och 13).

Exponering genom besprutning av fronderna ingår inte i denna testmetod. Besprutningsmetoden beskrivs i 14.

1.7.8 **Inkubationsbetingelser**

Kontinuerlig belysning med varmt eller kallt vitt ljus från lysrör används för att åstadkomma en ljusintensitet i intervallet 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, varvid intensiteten ska mätas inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna (denna intensitet motsvarar en belysningsstyrka på 6 500–10 000 lux). Ljusintensiteten får inte variera mer än ± 15 % över testytan. Metoden för detektering och mätning av ljuset – framför allt typen av ljussensor – påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

Temperaturen i provkärlen ska vara 24 ±2 °C. pH i kontrollmediet får inte öka mer än 1,5 under testets gång. En avvikelse på mer än 1,5 gör dock inte testresultaten ogiltiga om det kan visas att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. I speciella fall – t.ex. vid test av instabila substanser eller metaller – måste förskjutningen av pH kontrolleras extra noggrant. Se vidare (11).

1.7.9 **Tid för testets genomförande**

Testet ska avslutas 7 dagar efter det att plantorna har placerats i provkärlen.

1.7.10 **Mätningar och analytiska bestämningar**

Räkna och registrera frondantalet i provkärlen vid testets början. Se noga till att ta med alla uppstickande, väl synliga fronder. Bestäm antalet fronder – både sådana som framstår som normala och sådana som framstår som onormala – vid början av testet och därefter minst var tredje dag under exponeringstiden (dvs. vid minst 2 tillfällen under 7-dagarsperioden), samt vid slutet av testet. Registrera förändringar i plantutvecklingen. Det kan t.ex. gälla frondstorlek; utseende; tecken på nekros, kloros eller svullna fronder; kollaps av kolonier eller försämrad flytförmåga; rötternas längd och utseende. Registrera också betydelsefulla inslag i testmediet, t.ex. förekomst av oupplöst material och algtillväxt i provkärlet.

Utöver bestämningar av frondantalet under testet ska de effekter testsubstansen har på en eller flera av följande mätvariabler bestämmas:

i) Total frondarea.

ii) Torrvikt.

iii) Färskvikt.

Fördelen med variabeln ”total frondarea” är att den kan bestämmas för alla prov- och kontrollkärl vid början, under och vid slutet av testet. Torr- eller färskvikt måste bestämmas vid början av testet med hjälp av ett prov från ympkulturen som är representativt för vad som används för att starta testet, och vid slutet av testet med hjälp av växtmaterial från alla prov- och kontrollkärl. Om frondarean inte bestäms, är mätning av torrvikten att föredra framför mätning av färskvikten.

Total frondarea, torrvikt och färskvikt kan bestämmas på följande sätt:

i) *Total frondarea*: Den sammanlagda frondarean hos alla kolonier bestäms genom bildanalys. Med en videokamera registrerar man en silhuett av provkärlet och plantorna (kärlet kan t.ex. vara placerat på en ljuslåda). Därefter digitaliseras bilderna. Genom kalibrering med plana former med känd area kan man sedan bestämma den totala frondarean i kärlet. Fel orsakade av inverkan av provkärlets överkant måste undvikas. En annan, mer arbetskrävande metod är att ta en fotokopia av provkärlet och plantorna, klippa ut den silhuett som kolonierna bildar och sedan bestämma deras area med hjälp av en bladytemätare eller millimeterpapper. Andra metoder – t.ex. bestämning av viktsförhållandet mellan koloniernas silhuettyta och en ytenhet – kan också vara ändamålsenliga.

ii) *Torrvikt*: Alla kolonier samlas in från respektive provkärl och sköljs med destillerat eller avjoniserat vatten. Överskottsvattnet avlägsnas från kolonierna, t.ex. genom uppsugning med filterpapper, och de torkas sedan vid 60 °C tills vikten inte längre minskar. Även rotfragment måste tas med. Torrvikten bestäms med en noggrannhet på minst 0,1 mg.

iii) *Färskvikt*: Alla kolonier förs över till förvägda provrör av polystyren (eller annat inert material) med små (1 mm) hål i de rundade bottnarna. Provrören centrifugeras vid 3 000 varv/minut under 10 minuter vid rumstemperatur. Provrören, som nu innehåller torra kolonier, vägs på nytt. Färskvikten fås fram genom att subtrahera det tomma provrörets vikt.

1.7.10.1 *Mätfrekvens och analytiska bestämningar*

Vid statiskt testförfarande mäts pH i alla testlösningar (testkoncentrationer) vid början och slutet av testet. Vid semistatiskt testförfarande mäts pH i varje färsk testlösning och motsvarande förbrukade lösning.

Ljusintensiteten ska mätas i klimatkammaren, inkubatorn eller klimatrummet i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna har. Mätningar ska göras minst 1 gång under testets genomförande. Temperaturen hos mediet i ett särskilt kärl med enbart testmedium, som hålls under samma betingelser i klimatkammaren, inkubatorn eller klimatrummet, ska registreras minst 1 gång per dag.

Under testets gång bestäms koncentrationerna av testsubstansen med lämpliga intervall. Vid statiskt testförfarande är minimikravet att koncentrationerna ska bestämmas vid början och slutet av testet.

Om man vid semistatiskt testförfarande bedömer att koncentrationen av testsubstansen inte kommer att ligga kvar inom ± 20 % av den nominella koncentrationen, måste man analysera alla nyberedda testlösningar liksom alla förbrukade lösningar efter byte till ny färsk lösning (se tredje stycket i avsnitt 1.7.7). För test, där den uppmätta startkoncentrationen av testsubstansen inte ligger inom ± 20 % av det nominella värdet – dvs. det värde som bestäms vid beredningen – men där det på ett tillfredsställande sätt kan påvisas att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila – dvs. att de ligger inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen – räcker det med att kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna. I samtliga fall behöver bestämning av testsubstansens koncentrationer före byte till färsk testlösning bara utföras på ett enda replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat för respektive testkoncentration).

Vid genomflödestest kan man använda ett liknande förfarande som vid semistatiskt testförfarande – inklusive analys vid början, halvvägs igenom testet och vid slutet av testet – men i detta fall har mätning av förbrukade lösningar inte relevans. Vid genomflödestest ska daglig kontroll göras av flödeshastigheten hos spädningsmedlet och testsubstansen, eller stamlösningen av testsubstansen.

Om man kan påvisa att koncentrationen av testsubstansen under hela testets gång på ett tillfredsställande sätt har hållit sig inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen, kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen är större än ± 20 %, ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver den avtagande koncentrationen av testsubstansen (11).

1.7.11 **Gränstest**

Under vissa omständigheter – t.ex. när ett förberedande test tyder på att testsubstansen inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l – eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet om den gränsen är lägre – kan man utföra ett gränstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Jämförelsen måste underbyggas med en analys av exponeringskoncentrationen, dvs. den verkliga koncentrationen som kan variera över tiden för testets genomförande. Det gör man för att se till att den nominella koncentrationen är lika med den faktiska testkoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet som beskrivits tidigare gäller även för gränstest, med undantaget att antalet testreplikat ska vara dubbelt så stort. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (”Students t-test”).

2. BERÄKNINGAR OCH STATISTISKA METODER

2.1 FÖRDUBBLINGSTID

Fördubblingstiden (T_d) för frondantalet är ett kriterium på testresultatens giltighet (se avsnitt 1.6). Den bestäms med hjälp av värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten i kontrollkärlen (μ):

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

Bestämningen av μ beskrivs i första och andra styckena i avsnitt 2.2.1 nedan.

2.2 RESPONSVARIABLER

Syftet med testet är att bestämma testsubstansens effekter på tillväxten av *Lemna*. Två responsvariabler används eftersom lagbestämmelser och etablerade variabler skiljer sig åt mellan medlemsstaterna. För att testresultaten ska kunna godtas i samtliga medlemsstater ska effekterna bedömas med hjälp av båda de responsvariabler (a och b) som beskrivs nedan.

a) *Genomsnittlig specifik tillväxthastighet*. Beräknas med hjälp av två tillväxtvariabler: 1) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av frondantalet, och 2) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Variablerna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp, dvs. grupp av provkärl med samma testkoncentration. Tiden uttrycks i dagar. Denna responsvariabel kallas ibland relativ tillväxthastighet (15).

b) *Producerad mängd biomassa*. Beräknas med hjälp av förändringarna av frondantalet och förändringarna av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Förändringarna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp ända till slutet av testet.

Observera att de värden på toxiciteten som beräknas med hjälp av dessa två responsvariabler inte är jämförbara, och man måste ha denna skillnad i åtanke när man använder resultaten från testet. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är i allmänhet högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (E_yC_x) om de föreskrivna testbetingelserna är uppfyllda. Detta ska inte tolkas som en skillnad i mätkänslighet mellan de två responsvariablerna – skillnaden beror bara på att värdena erhållits på två olika sätt. Responsvariabeln ”genomsnittlig specifik tillväxthastighet” grundar sig på den allmänna exponentiella tillväxtutvecklingen hos andmat i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms på basis av testsubstansens inverkan på tillväxthastigheten, oberoende av den absoluta nivån på den specifika tillväxthastigheten i kontrollen, responskurvans lutning och tiden för testets genomförande. Responsvariabeln ”producerad mängd biomassa” är däremot beroende av alla de tre sistnämnda variablerna. E_yC_x är beroende både av den specifika tillväxthastigheten hos de andmatsarter som används i de enskilda testen och av den maximala specifika tillväxthastigheten, som kan variera mellan olika arter, och till och med mellan olika kloner. Responsvariabeln ”producerad mängd biomassa” får inte användas för jämförelser av känsligheten för toxiska substanser mellan olika andmatsarter, inte ens mellan olika kloner. Ur vetenskaplig synpunkt är värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten att föredra för bestämning av toxiciteten. Toxicitetsbestämning med hjälp av värdet på producerad mängd biomassa har tagits med i testmetoden för att tillgodose vissa länders nuvarande lagstiftningskrav.

Toxiciteten bestäms med hjälp av två tillväxtvariabler: 1) frondantal, och 2) total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Att två variabler används beror på att vissa substanser kan ha mycket större effekt på andra mätvariabler än på frondantalet. Om man bara höll sig till frondantalet skulle man inte märka detta förhållande.

Frondantal samt övriga registrerade mätvariabler för respektive mättillfälle – t.ex. total frondarea, torrvikt eller färskvikt – förs in i en tabell tillsammans med koncentrationerna av testsubstansen. De efterföljande beräkningarna, för att bestämma t.ex. LOEC, NOEC eller EC_x, ska grundas på värdena för de enskilda replikaten, inte på beräknade medelvärden för respektive testgrupp.

2.2.1 **Genomsnittlig specifik tillväxthastighet**

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för en given tidsperiod beräknas som den logaritmiska ökningen av två tillväxtvariabler: frondantal och ytterligare en variabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Använd nedanstående formel för alla replikat av kontroll- och testlösningar:

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

där:

- μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,
- N_i är värdet på tillväxtvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,
- N_j är värdet på tillväxtvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j,
- t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande – ”i” i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och ”j” slutet. Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Bestäm dessutom tillväxthastigheten för flera intervall av exponeringstiden för att kunna bedöma testsubstansens tidsberoende effekt, t.ex. genom analys av logaritmiska tillväxtkurvor. Stora skillnader mellan tillväxthastigheten i respektive intervall och genomsnittsvärdet tyder på en avvikelse från exponentiell tillväxt, och att tillväxtkurvorna måste studeras närmare. Vid en konservativ bedömning kan man i detta fall jämföra testlösningarnas specifika tillväxthastigheter under det tidsintervall som har den största tillväxthämningen med tillväxthastigheterna för kontrollerna under samma tidsintervall.

Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

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

där:

- $\% I_r$ är den procentuella reduktionen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,
- μ_C är medelvärdet av μ i kontrollgruppen,
- μ_T är medelvärdet av μ i testgruppen.

2.2.2 **Producerad mängd biomassa**

Effekterna på den producerade mängden biomassa bestäms med hjälp av två mätvariabler, varav den ena är frondantalet, och den andra någon av variablerna total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Mätningarna görs vid början och slutet av testet. För torrvikt och färskvikt bestäms den initiala biomassan med hjälp av ett prov bestående av fronder från samma kultur som används för att ympa provkärlen (se andra stycket i avsnitt 1.7.3). Beräkna ett

medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontroll tillsammans med variansskattningar. Den genomsnittliga procentuella reduktionen av den producerade mängden biomassa (% I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

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

där:

– % I_y är den procentuella reduktionen av den producerade mängden biomassa,

– b_C är slutlig biomassa minus initial biomassa för kontrollgruppen,

– b_T är slutlig biomassa minus initial biomassa för testgruppen.

2.2.3 **Plottning av dos-respons-kurvor**

Dos-respons-kurvor ska plottas med den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) längs y-axeln och logaritmen av testsubstansens koncentration längs x-axeln. (I_r och I_y beräknas enligt avsnitt 2.2.1 respektive 2.2.2 ovan.)

2.2.4 **Bestämning av EC_x**

Bestämningar av EC_x – t.ex. EC_{50} – ska baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) och på producerad mängd biomassa (E_yC_x). De sistnämnda två responsvariablerna ska i sin tur bestämmas med hjälp av frondantal och en ytterligare mätvariabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Orsaken till att man ska använda två mätvariabler är att det finns testsubstanser vars inverkan på frondantalet skiljer sig åt från inverkan på andra mätvariabler. Toxicitetsparametrarna bör därför vara 4 EC_x-värden för varje beräknad tillväxthämningsnivå x: E_rC_x (frondantal), E_rC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt), E_yC_x (frondantal) samt E_yC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt).

2.3 STATISTISK BEHANDLING

Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (16). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera sådana oregelbundenheter i data som inte går att undvika, liksom de hanterar avvikelser från jämna fördelningskurvor bättre. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli felaktigt uppförstorade genom lineariseringen och därigenom störa analysen (16). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, t.ex. dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data om tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (17), (18) och (19).

För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och responsvärde för att beräkna punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska det 95-procentiga konfidensintervallet bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas, antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalys ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.

När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensintervall också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrap (20).

För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för respektive koncentration jämförs sedan med medelvärdet av kontrollvärdena med hjälp av en passande metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (21, 22, 23 och 24). Man måste avgöra om ANOVA-antagandet om varianshomogenitet är uppfyllt. Det kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (25), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga användning av analys med metoder som t.ex. Jonckheeres trendtest av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (19).

Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värdet. Det ska ersättas med punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta *Lemna*-test har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör redovisas.

3. REDOVISNING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testsubstans:

— Fysiskt tillstånd (gas, vätska eller fast form) och fysikalisk-kemiska egenskaper, inklusive löslighetsgränsen i vatten.

— Kemiska beteckningsuppgifter (t.ex. CAS-nummer), inklusive renhetsgrad.

Testarter:

— Vetenskapligt namn (om det är känt) och ursprung.

Testbetingelser:

— Typ av test (statiskt, semistatiskt eller genomflöde).

— Startdatum och tid för testets genomförande.

— Testmedium.

— Beskrivning av uppställning av testet: provkärl och lock eller proppar (eller annan typ av förslutning); lösningsvolymer; antal kolonier och fronder per provkärl vid testets början.

— Testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration.

— Metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel.

— Temperatur under testets gång.

— Ljuskälla, ljusintensitet och ljushomogenitet.

— pH i test- och kontrollmedier.

— Testsubstansens koncentrationer och analysmetod med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensintervall för analyserna).

— Metoder för bestämning av frondantal och andra mätvariabler, t.ex. torrvikt, färskvikt eller frondarea.

— Alla avvikelser från den här beskrivna testmetoden.

Resultat:

— Rådata: frondantal och andra mätvariabler i alla test- och kontrollprov vid respektive observation och analystillfälle.

— Medelvärde och standardavvikelse för respektive mätvariabel.

— Tillväxtkurvor för respektive koncentration. (Bör plottas med logaritmen av mätvariabeln. Se andra stycket i avsnitt 2.2.1.)

— Fördubblingstid och tillväxthastighet i kontrollen beräknade med hjälp av frondantal.

— Beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten.

— Diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt.

— Bestämningar av effektmått för toxicitet – t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} – och motsvarande konfidensintervall. Värden på LOEC och NOEC – såvida de har bestämts – och de statistiska metoder som använts för att bestämma dem.

— Om ANOVA har använts: storleken på märkbar effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad).

— Tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningar.

— Synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna.

— Diskussion av resultaten. Ta även upp sådan inverkan på testresultatet som kan bero på avvikelser från den här beskrivna testmetoden.

4. LITTERATUR

1. OECD TG 221 (2006). *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

2. I avsnitt 13.5.3 i EU:s Manual of Decisions från juli 2006 redogörs närmare för användningen av *Lemna*-undersökningar för färgade substanser. Se http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues. Se

   http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Förnyat godkännande 1998). s. 733–742. Återfinns i Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

5. USEPA – United States Environmental Protection Agency (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., "Public draft". EPA 712-C-96–156. 8 s.

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

7. SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

8. Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37–120 s.

9. Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P. och Lacey R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3–77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. och Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, s. 353–359.

15. Huebert, D.B. och Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, s. 481–483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, s. 713–718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. och Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 157–167.

18. Bruce R.D. och Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, s. 1485–1494.

19. OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN, USA.

21. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, s. 1096–1121.

22. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

23. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27, s. 103–117.

24. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, s. 510–531.

25. Brain P. och Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, s. 93–96.

Tillägg 1

Beskrivning av *Lemna* spp.

Den vattenväxt som i allmänt språkbruk kallas andmat – *Lemna* spp. – tillhör familjen *Lemnaceae* som förekommer över hela världen i ett antal arter av fyra släkten. Deras olika utseenden och taxonomi har beskrivits ingående (1, 2). *Lemna gibba* och *L. minor* är arter som är vanliga i tempererade zoner och som ofta används i toxicitetstest. Bägge arterna lever i vatten med flytande eller nedsänkt skivlik stam (frond) utan blad. Från mitten av den undre ytan på varje frond utgår en hårfin rot. *Lemna* spp. blommar sällan – plantorna förökar sig i stället vegetativt genom avsnörning av fronder (3). I jämförelse med äldre plantor tenderar de yngre att vara blekare, ha kortare rötter och bestå av 2–3 fronder av olika storlek. Egenskaperna hos *Lemna* – enkel uppbyggnad, vegetativ förökning och kort generationstid – gör plantor av detta släkte mycket lämpliga för laboratorietest (4, 5).

Eftersom känsligheten för toxisk påverkan sannolikt varierar mellan arterna, godtas enbart jämförelser av känsligheten inom en och samma art.

Litteratur – exempel på *Lemna*-arter som har använts vid test

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiatavhandling 1996:2. Institutionen för systemekologi, Stockholms universitet.

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

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

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

SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten Lemna minor, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

Lemna gibba: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Förnyat godkännande 1998). S. 733–742.

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

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

Lemna perpusilla: Clark, J. R. m.fl. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5, s. 87–96.

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

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

***Lemna*-arter för test kan erhållas från följande institutioner:**

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, KANADA, M5S 3 B2
Tfn +1 4169783641
Fax +1 4169785878
E-post: jacreman@botany.utoronto.ca
Internet: http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
FÖRENTA STATERNA
Tfn +1 9195157572
E-post: astomp@unity.ncsu.edu

Institutionen före tillämpad miljövetenskap (ITM) Stockholms universitet
SE-106 91 Stockholm
SVERIGE
Tfn +46 86747240
Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
TYSKLAND
E-post: lemna@uba.de
Internet: http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Litteratur

1. Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27, s. 221–287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Schweiz.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. Norges lantbruksvetenskapliga forskningsråd, Universitetet i Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11, s. 1–14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52, s. 7–22.

Tillägg 2

Behandling av stamkulturer

Stamkulturer kan förvaras vid låga temperaturer (4–10 °C) under lång tid utan de behöver startas på nytt. Odlingsmediet för *Lemna* kan vara samma som det som används för testen, men för stamkulturer kan andra näringsrika medier användas.

Med jämna mellanrum flyttas ett bestämt antal unga, ljusgröna plantor över aseptiskt till nya odlingskärl med färskt medium. Under de kalla betingelser som här rekommenderas kan subodling utföras i upp till tre månader långa intervall, eftersom det tar längre tid än normalt innan det uppstår överpopulation i kulturen. Man kan alltså vänta längre med att flytta över plantorna till nya odlingskärl för att starta en ny subkultur.

Använd kemiskt rena (syratvättade) och sterila odlingskärl av glas. Hanteringen ska ske med aseptiska metoder. Om stamkulturen kontamineras av t.ex. alger eller svamp, måste man vidta åtgärder för att avlägsna de kontaminerande organismerna. För alger och de flesta andra kontaminerande organismer kan detta åstadkommas genom ytsterilisering. Ett prov tas ur det kontaminerade växtmaterialet och rötterna skärs av. Materialet skakas om kraftigt i rent vatten och hålls sedan nedsänkt i en lösning med 0,5 volymprocent natriumhypoklorit i mellan 30 sekunder och 5 minuter. Växtmaterialet sköljs sedan med sterilt vatten och flyttas över satsvis till odlingskärl med färskt odlingsmedium. Många fronder dör av denna behandling, särskilt om exponeringstiderna är långa, men en del av de överlevande fronderna bör vara fria från kontamination. Dessa kan sedan användas för att ympa nya kulturer.

Tillägg 3

Odlingsmedier

Olika odlingsmedier bör användas för *L. minor* och *L. gibba*. För *L. minor*, bör ett medium enligt modifierad svensk standard (SS) användas, och för *L. gibba* bör 20X-AAP användas. Sammansättningarna av respektive medium visas i nedanstående tabell. Vid beredning av medierna ska kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet användas, och vattnet ska vara avjoniserat.

Odlingsmedium enligt modifierad svensk standard (SIS)

— Sterilisera stamlösningarna I–V i autoklav (120 °C, 15 minuter) eller genom membranfiltrering (porstorlek ca 0,2 µm).

— Sterilisera stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) genom membranfiltrering (använd inte autoklav).

— Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Kassera stamlösningarna I–V efter 6 månader. Kassera stamlösningarna 1–V efter 6 månader. Stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) kan lagras i 1 månad.

Stamlösning	Kemikalie	Koncentration i stamlösning (g/l)	Koncentration i testmedium (mg/l)	Testmedium	
				Grundämne	Koncentration (mg/l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4$. $7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2$. $2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2$. $4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na_2MoO_4. $2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4$. $7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4$. $5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2$. $6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3$. $6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA. $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffert)	490	490	—	—

— Tillsätt följande mängder stamlösningar i 900 ml avjoniserat vatten för beredning av 1 liter medium:

  — 10 ml I

  — 5 ml II

  — 5 ml III

  — 5 ml IV

  — 1 ml V

  — 5 ml VI

  — 1 ml VII (i tillämpliga fall)

  Obs! Stamlösning VII (MOPS-buffert) kan behövas för vissa testsubstanser (se sista stycket i avsnitt 1.4).

— Justera pH till 6,5 ± 0,2 med 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt sedan avjoniserat vatten så att volymen blir 1 liter.

Odlingsmedium 20Z-AAP

Bered stamlösningar i sterilt destillerat eller avjoniserat vatten.

Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Då kan de lagras i minst 6–8 veckor.

Bered 5 näringsstamlösningar (A1, A2, A3, B och C) med kemikalier av reagenskvalitet. Tillsätt 20 ml av varje lösning i ca 850 ml avjoniserat vatten. Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt avjoniserat vatten så att volymen blir 1 liter. Filtrera sedan mediet genom ett membranfilter med porstorlek ca 0,2 µm ner i en steril behållare.

Bered odlingsmediet 1–2 dagar före testets genomförande så att pH hinner stabiliseras. Mät pH före testet och justera vid behov genom tillsats av 0,1 M eller 1 M NaOH eller HCl (beroende på utgångsvärdet).

Stamlösning	Kemikalie	Koncentration i stamlösning (g/l) (*)	Koncentration i testmedium (mg/l) (*)	Testmedium	
				Grundämne	Koncentration (mg/l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2$. $6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2$. $2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4$. $7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	K_2HPO_4. $3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2$. $4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3$. $6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na_2EDTA. $2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2$. $6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na_2MoO_4. $2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2$. $2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Om inget annat anges särskilt.

Fotnot: Den teoretiskt ideala slutkoncentrationen av bikarbonat ($NaHCO_3$) – som gör att endast en smärre justering av pH krävs – är 15 mg/l, inte 300 mg/l som anges i tabellen ovan. I 20X-AAP, liksom i ringtestet för denna metod, är koncentrationen 300 mg/l etablerad. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey [1999]: The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergs medium (enligt ISO 20079)

Koncentrationer och stamlösningar

— Det modifierade Steinbergs medium används i ISO 20079 uteslutande för *Lemna minor* (eftersom enbart denna art är tillåten i denna standard). Test har dock visat att goda resultat kan uppnås även med *Lemna gibba*.

— Använd kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet och avjoniserat vatten.

— Bered näringsmediet från stamlösningar eller från ett medium med 10 gånger högre koncentration än testmediet så att mediet får högsta möjliga koncentration utan utfällning.

Tabell 1

pH-stabiliserat Steinbergmedium (modifierat enligt Altenburger)

Kemikalie		Näringsmedium	
Makroelement	Molvikt	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2$. $4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4$. $7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelement	Molvikt	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4$·. $7H_2O$	287,43	180,00	0,63
Na_2MoO_4. $2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2$. $4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3$. $6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatriumdihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabell 2

Stamlösningar (makroelement)

1. **Makroelement (koncentrerat 50 ggr)**	g/l
Stamlösning 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Stamlösning 2:	
$MgSO_4$. $7H_2O$	5,00
Stamlösning 3:	
$Ca(NO_3)_2$. $4H_2O$	14,75

Tabell 3

Stamlösningar (mikroelement)

2. **Mikroelement (koncentrerat 1 000 ggr)**	mg/l
Stamlösning 4:	
H_3BO_3	120,0
Stamlösning 5:	
$ZnSO_4$. $7H_2O$	180,0
Stamlösning 6:	
Na_2MoO_4. $2H_2O$	44,0
Stamlösning 7:	
$MnCl_2$. $4H_2O$	180,0
Stamlösning 8:	
$FeCl_3$. $6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydrat	1 500,00

— Stamlösningarna 2 och 3 kan slås samman, liksom 4–7 (se då till att de fastställda koncentrationerna hålls).

— Sterilisera stamlösningarna i autoklav (121 °C, 20 minuter) eller gör en sterilfiltrering med porstorlek 0,2 µm, så kan de lagras längre. Stamlösning 8 bör behandlas genom sterilfiltrering med porstorlek 0,2 µm.

Beredning av slutkoncentrationen av Steinbergs modifierade medium

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 900 ml avjoniserat vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3).

— pH ska vara 5,5 ± 0,2 (justera genom tillsats av minsta möjliga volym NaOH-lösning eller HCl).

— Justera volymen med vatten till 1 000 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och föreskrivet vatten använts, behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras, ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

Beredning av 10 ggr koncentrerat modifierat Steinbergmedium för temporär lagring

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 30 ml vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3). Justera med vatten till 100 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och föreskrivet vatten använts behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras, ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

— pH (vid slutkoncentration) ska vara 5,5 ± 0,2.