

# 入札説明書

【電子入札システム対応】

令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務

令和6年4月

国立研究開発法人国立環境研究所

当研究所の一般競争に係る入札公告（令和6年4月22日付）に基づく入札については、関係法令に定めるもののほか、この入札説明書による。

#### 1. 競争入札に付する事項

- (1) 件名 【電子入札システム対応】令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務
- (2) 契約期間 契約締結日から令和7年2月28日まで
- (3) 仕様 仕様書による。
- (4) 履行場所 仕様書による。
- (5) 入札保証金 免除
- (6) 契約保証金 免除

#### 2. 競争参加に必要な資格

- (1) 令和4・5・6年度環境省競争参加資格（全省庁統一資格）の「役務の提供等」の「調査・研究」において、「B」、「C」又は「D」の等級に格付けされている者であること。
- (2) 国立研究開発法人国立環境研究所契約事務取扱細則第5条の規定に該当しない者であること。なお、未成年者、被保佐人又は被補助人であって、契約締結のために必要な同意を得ている者については、同条中、特別の理由がある場合に該当する。
- (3) 国立研究開発法人国立環境研究所契約事務取扱細則第6条の規定に該当しない者であること。
- (4) 契約者等から取引停止の措置を受けている期間中の者でないこと。
- (5) 入札説明書において示す暴力団排除等に関する誓約事項に誓約できる者であること。

#### 3. 入札心得

- (1) 入札参加者は、仕様書及び添付書類を熟読のうえ、入札しなければならない。
- (2) 入札参加者は、前項の書類について疑義があるときは、関係職員の説明を求めることができる。
- (3) 入札参加者は、入札後、仕様書及び添付書類についての不明等を理由として異議を申し立てることはできない。

#### 4. 電子入札システムの利用

本件調達には電子入札システムで行うため、同システムの電子認証（代表者又はその委任を受けた者のICカードに限る。）を取得していること。

・<https://www.ebs-cloud.fwd.ne.jp/CALS/Acceptor/index.jsp?name1=06A0064006A00600>

なお、同システムによりがたい者は、紙入札方式によることができる。ただし、紙入札方式参加届（別紙1）を7.（1）①に示す期限までに提出すること。提出は、書面の持参若しくは郵送又は電子メールによること。

#### 5. 入札及び開札の日時及び場所

令和6年5月22日（水）11時00分

国立研究開発法人国立環境研究所 研究本館Ⅱ 1階 第1会議室

（茨城県つくば市小野川16-2）

#### 6. 入札説明書等に対する質問

- (1) 入札説明書（契約書案（別紙5）含む）に対する質問がある場合においては、次に従い、質問書（指定様式（※））を提出すること。

※当研究所WEBサイトに掲載（本公告掲載先と同一ページ）

①提出期間：令和6年4月22日（月）から令和6年4月30日（火）17時00分まで。

②提出方法：電子メールによる送付とする（送付先:chotatsu@nies.go.jp）。なお、メール送信後、後記18.の担当あて電話し、受信を確認すること。また、電子メールの件名は【質問の提出（令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務）（担当：濱田）】とすること。

- (2) (1) の質問に対する回答書は、次のとおり閲覧に供する。
- ①期 間：令和6年5月8日（水）10時00分から  
令和6年5月22日（水）11時00分まで。
  - ②閲覧場所：当研究所WEBサイト（本公告掲載先と同一ページ）
- (3) (1) の質問がない場合、(2) については行わないものとする。

## 7. 入札参加資格証明書類の提出

- (1) 入札に参加しようとする者は、本入札説明書2. (1) の証明書類を次に従い提出すること。

※提出された書類については返却しない。

①提出期限：令和6年5月15日（水）16時00分

②提出方法：書面の持参又は郵送（書留郵便等の配達記録が残る方法に限り、受領期間必着とする）によるものとする。

なお、電子入札システム（同システムにより入札する者に限る。）若しくは電子メール（送付先：chotatsu@nies.go.jp）による電子データの提出も可とする。

ただし、電子入札システムまたは電子メールによるデータ送信後、後記18.の担当あて電話し、受信を確認すること。

また、電子メールの場合、件名は【入札参加資格証明書類の提出（令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務）（担当：濱田）】とすること。

- (2) (1) のとおり提出された書類による本競争参加の可否については、次の期間までに連絡をする。

・入札日及び開札の2営業日前16時00分

## 8. 入札及び開札

### (1) 電子入札の場合

①7. (1) ①の日時までに、電子入札システムの証明書等提出画面において、2. (1) の競争参加資格を有することを証明する書類を提出すること。

②5. の日時までに、同システムに定める手続に従って入札を行うこと。通信状況によっては当該期限内に入札情報が到着しない場合があるので、時間的余裕を持って行うこと。

③入札金額については、1. (1) の業務に関する一切の費用を含めた額とする。

④落札決定に当たっては、入札書に記載された金額に課税対象金額の10%に相当する額を加算した金額（当該金額に1円未満の端数があるときは、その金額を切り捨てるものとする。）をもって落札価格とするので、入札参加者は、消費税及び地方消費税に係る課税事業者であるか免税事業者であるかを問わず見積もった契約金額から課税額を除いた金額を入札書に入力すること。

⑤同システムにより入札した場合には、本入札説明書において示す暴力団排除等に関する誓約事項に誓約したものとして取り扱うこととする。

⑥入札者又は代理人等は、開札時刻に同システムの端末の前で待機しなければならない。

⑦事由のいかんにかかわらず入札の引換え、変更又は取消しを行うことができない。

⑧入札参加者が連合し、又は不穩の行動をなす等の場合において、入札を公正に執行することができないと認められるときは、当該入札参加者を入札に参加させず、又は入札の執行を延期し、若しくは取りやめることがある。

### (2) 紙入札の場合

①入札書（別紙2）には、入札参加者の住所、氏名を記入し、金額の記入はアラビア数字を用いて鮮明に記載すること。また、郵送による提出の際は入札書に入札回数（第〇回）を記載すること。

②入札書及び入札に係る文書に使用する言語は、日本語に限るものとし、また入札金額は、日本国通貨による表示に限るものとする。

③入札金額については、1. (1) の業務に関する一切の費用を含めた額とする。

④落札決定に当たっては、入札書に記載された金額に課税対象金額の10%に相当する額を加算した金額（当該金額に1円未満の端数があるときは、その金額を切り捨てるものとする。）をもって落札価格とするので、入札参加者は、消費税及び地方消費税に係る

課税事業者であるか免税事業者であるかを問わず見積もった契約金額から課税額を除いた金額を入札書に記載すること。

- ⑤入札書は、別紙の書式により作成し、封かんの上で持参又は郵送により提出するものとする。
- ⑥入札書を持参する場合は、入札書を封かんし、入札参加者の商号又は名称、入札件名及び開札日時を記載し、入札及び開札日に入札箱に投入すること。
- ⑦新型コロナウイルスによる感染症（COVID-19）の感染拡大防止のため、当面の間郵送による入札書の提出は3通まで認めることとする。入札書を郵送により提出する場合は、二重封筒とし、表封筒に入札書在中の旨を朱書し、中封筒に入札参加者の入札参加者の商号又は名称、入札件名及び開札日時並びに入札回数（〇回目）を記載して書留郵便（配達証明付）により、次に従い郵送すること。  
提出期限：入札及び開札の前日（※）16時00分  
※土・日曜日、祝祭日及び年末年始（12月29日から1月3日）を除く。
- ⑧入札参加者は、入札書を提出する際には、本入札説明書2.（1）の競争参加資格を有することを証明する書類を提出すること。
- ⑨入札参加者は、代理人又は復代理人（以下「代理人等」という。）をして入札させるときは、その委任状（別紙3、4）を持参させなければならない。
- ⑩入札参加者又はその代理人等は、当該入札に対する他の入札参加者の代理をすることができない。
- ⑪開札は、入札参加者の面前で行う。ただし、入札参加者又はその代理人等が開札場所に出席しないときは、入札執行事務に関係のない職員を立会させて開札する。この場合、異議の申し立てはできない。
- ⑫入札参加者又はその代理人等は、開札時刻後においては、開札場に入場することはできない。
- ⑬提出済の入札書は、その事由のいかんにかかわらず引換え、変更又は取消しを行うことができない。
- ⑭入札参加者が連合し、又は不穩の行動をなす等の場合において、入札を公正に執行することができないと認められるときは、当該入札参加者を入札に参加させず、又は入札の執行を延期し、若しくは取りやめることがある。

## 9. 入札の無効

次の各号に該当する入札書は無効とする。

- (1) 競争に参加する資格を有しない者の提出した入札書
- (2) 紙入札において、委任状を持参しない代理人等の提出した入札書
- (3) 紙入札において、記名を欠いた入札書
- (4) 入札金額の記載が不明確な入札書
- (5) 入札金額の記載を訂正した入札書
- (6) 誤字、脱字等により意志表示が不明瞭である入札書
- (7) 明らかに連合によると認められる入札書
- (8) 同一事項の入札について、他の入札参加者の代理人等を兼ねた者の入札書
- (9) 同一入札執行回について、入札参加者又はその代理人等が二通以上の入札書を提出した場合
- (10) その他の入札に関する条件に違反した入札書

## 10. 落札の決定

本入札説明書2. の競争参加資格及び仕様書等の要求要件を全て満たし、当該入札書の入札価格が国立研究開発法人国立環境研究所契約事務取扱細則第13条の規定に基づいて作成された予定価格の範囲内で、最低の価格をもって有効な入札を行った者を落札者とする。

## 11. 再度入札

開札した場合において、入札参加者の入札のうち予定価格の制限に達した価格の入札が無いときは、直ちに再度の入札を行う。なお、再度入札の回数は原則として2回を限度とする。

ただし、郵便による入札を行い、開札当日に入札参加者又はその代理人等が開札場所に出席

しない場合においては、入札書の提出数以降の再度入札による入札に参加できないため注意すること。

#### 1 2. 同価格の入札が2人以上ある場合の落札者の決定

- (1) 落札者となるべき同価格の入札をした者が2人以上あるときは、電子入札システムによる電子くじにより落札者を決定する。電子入札システムにより入札を行う場合は、入札時に任意の3桁の数字を入力すること。紙入札による場合は、入札書（別紙2）の記載欄に任意の3桁の数字を記載すること。なお、入力された数字は乱数処理により変換された数字により落札者を決定するため、指定した数字が直接判定に用いられるものではない。
- (2) 前項の場合において、数字の指定を行わない者があるときは、職員が任意の数字を入力する。

#### 1 3. 落札内訳書の提出

- (1) 落札者は、落札者の決定後すみやかに落札額に応じた内訳書を提出すること。なお、内訳書は可能な限り詳細に記載すること。
- (2) 内訳書の様式は自由とする。
- (3) 内訳書は返却しない。

#### 1 4. 契約書等の提出

- (1) 落札者は、契約書案（別紙5）により、契約書を作成及び記名押印の上、速やかにこれを契約担当者等に提出しなければならない。なお、当該契約書案の記載内容に質問等がある場合は、前記6.により質問書を提出すること。
- (2) 契約書及び契約に係る文書に使用する言語及び通貨は、日本語及び日本国通貨による。
- (3) 契約担当者等が契約の相手方とともに契約書に記名押印しなければ、本契約は確定しないものとする。

#### 1 5. 契約者の氏名

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 木本 昌秀

#### 1 6. 入札結果及び契約情報の公表について

##### ① 入札結果の公表

落札者が決定したときは、その入札結果（落札者を含めた入札者全員の商号又は名称及び入札価格）について、開札場において発表するとともに電子入札システムにおいて公表する予定である。

##### ② 契約情報の公表

契約を締結したときは、後日当該契約情報を当法人のHPにおいて公表する。

独立行政法人が行う契約については、「独立行政法人の事務・事業の見直しの基本方針(平成22年12月7日閣議決定)」において、独立行政法人と一定の関係を有する法人と契約をする場合には、当該法人への再就職の状況、当該法人との間の取引等の状況について、情報を公開する等の取組を進めることとされている。これに基づき、以下のとおり、当法人との関係に係る情報を当法人のHPで公表することとするので、所要の情報の当法人への提供及び情報の公表に同意の上で、応札若しくは応募又は契約の締結を行っていただくようお願いする。なお、応札若しくは応募又は契約の締結をもって、同意されたものとみなすこととする。

##### 1) 公表の対象となる契約先

次のいずれにも該当する契約先

ア. 当法人において役員を経験した者が再就職をしていること又は課長相当職以上の職を経験した者が役員、顧問等として再就職していること

イ. 当法人との間の取引高が、総売上高又は事業収入の3分の1以上を占めていること

##### 2) 公表する情報

上記に該当する契約先との契約（予定価格が一定の金額を超えない契約や光熱水の支出に係る契約等は対象外）について、契約ごとに、物品・役務等の名称及び

- 数量、契約締結日、契約先の名称、契約金額等と併せ、次に掲げる情報を公表する。
- ア. 前記②1)アに該当する再就職者の人数、職名及び当法人における最終職名
  - イ. 当法人との間の取引高
  - ウ. 総売上高又は事業収入に占める当法人との間の取引高の割合が、次の区分のいずれかに該当する旨
    - ・ 3分の1以上2分の1未満
    - ・ 2分の1以上3分の2未満
    - ・ 3分の2以上
  - エ. 一者応札又は一者応募である場合はその旨
- 3) 提供を求める情報
- ア. 契約締結時点における前記②1)アに該当する再就職者に係る情報（人数、職名及び当法人における最終職名）
  - イ. 直近の事業年度における総売上高又は事業収入及び当法人との間の取引高
- 4) 公表の時期
- 契約締結日の翌日から起算して原則72日以内（4月中に締結した契約については原則93日以内）

17. 電子入札システムの操作及び障害発生時の問合せ先

電子入札システム ポータルサイトアドレス

<https://www.nies.go.jp/osirase/chotatsu/kokoku/e-bidding/index.html>

ヘルプデスク 0570-021-777（受付時間：平日 9:00～12:00 及び 13:00～17:30）

Email:sys-e-cydeenasphelp.rx@ml.hitachi-systems.com

18. 提出書類送付先（担当部署）

〒305-8506

茨城県つくば市小野川16-2

国立研究開発法人国立環境研究所 総務部会計課契約第一係 濱田

TEL 029-850-2775

E-mail chotatsu@nies.go.jp

(別紙1)

年 月 日

## 紙入札方式参加届

国立研究開発法人国立環境研究所理事長 殿

住 所  
商号又は名称  
代 表 者 名

下記入札案件について、紙入札方式での参加をいたします。

件名： 令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務

担当者等連絡先

部署名 :

担当者名 :

責任者名 :

TEL :

E-mail :

(別紙2)

# 入札書

金 \_\_\_\_\_ 円

電子くじに入力する数字（任意の3桁）：

件名 令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務

上記金額をもって貴所入札説明書承諾のうえ入札します。  
御採用のうえは確実に履行いたします。  
なお、入札説明書別紙6の暴力団排除等に関する誓約事項に誓約します。

年 月 日

住 所

商号又は名称

代表者名

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 殿

担当者等連絡先

部署名 :

担当者名 :

責任者名 :

TEL :

E-mail :



<記入例>

# 入札書

金 \_\_\_\_\_ 円

電子くじに入力する数字（任意の3桁）：

件名 令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務

上記金額をもって貴所入札説明書承諾のうえ入札します。  
御採用のうえは確実に履行いたします。  
なお、入札説明書別紙6の暴力団排除等に関する誓約事項に誓約します。

××年××月××日

住 所 ○○県○○市○○1-2-3

商号又は名称 株式会社△△△△

代表者名 代表取締役□□□□

< (復) 代理人 ◎◎◎◎ >

※代理人又は復代理人が入札する際は、代表者に代わり  
代理人又は復代理人が記名すること

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 殿

担当者等連絡先

部署名 :

担当者名 :

責任者名 :

TEL :

E-mail :

(別紙3)

年 月 日

# 委任状

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 殿

住 所  
商号又は名称  
代表者名

今般、私は、 を代理人と定め、令和6年4月22日付け公示された国立研究開発法人国立環境研究所の「令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務」に関し、下記の権限を委任いたします。

受任者：住 所

商号又は名称

役職・氏名

## 記

- 本入札に係る一切の権限
1. の事項に係る復代理人を選任すること

担当者等連絡先

部署名 :

担当者名 :

責任者名 :

TEL :

E-mail :

(別紙4)

年 月 日

# 委任状

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 殿

住 所  
商号又は名称  
氏 名

今般、私は、 を復代理人と定め、令和6年4月22日付け公示された国立研究開発法人国立環境研究所の「令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務」に関し、下記の権限を委任いたします。

受任者：住 所

商号又は名称

役職・氏名

## 記

### 1. 本入札に係る一切の権限

担当者等連絡先

部署名 :

担当者名 :

責任者名 :

TEL :

E-mail :

(別紙5)

## 契 約 書 (案)

国立研究開発法人国立環境研究所 理事長 木本 昌秀 (以下「甲」という。) と、 (以下「乙」という。) とは、次の条項により契約を締結する。

1. 件 名 令和6年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務
2. 契約金額 金 円 (うち消費税及び地方消費税額 円)
3. 契約期間 自 契約締結日 至 令和7年2月28日
4. 契約保証金 免除
5. 契約履行の場所及び業務内容 別添仕様書のとおり

(信義誠実の原則)

第1条 甲乙両者は、信義を重んじ誠実に本契約を履行しなければならない。

(権利義務の譲渡等)

第2条 乙は、本契約によって生じる権利又は義務の全部若しくは一部を、甲の承諾を得た場合を除き第三者に譲渡し、又は承継させてはならない。ただし、信用保証協会及び中小企業信用保険法施行令 (昭和25年政令第350号) 第1条の3に規定する金融機関に対して売掛債権を譲渡する場合にあっては、この限りでない。

(義務の履行)

第3条 乙は、別添仕様書に基づき、頭書の金額をもって頭書の期間中に義務を完全に履行しなければならない。

(再委託等の禁止)

第4条 乙は、業務の処理を第三者 (再委託等先が乙の子会社 (会社法 (平成17年法律第86号) 第2条第3号に規定する子会社をいう。) である場合も含む。以下同じ。) に委託し又は請け負わせてはならない。但し、再委託等承認申請書 (別紙) を甲に提出し、甲の承認を得たときは、この限りではない。

※再委託等の取り扱いについては、仕様書及び「契約における再委託等の取り扱いについて」 (当研究所HPに掲載) を参照すること。

掲載先 : <https://www.nies.go.jp/osirase/chotatsu/saiitaku.pdf>

(監督職員)

第5条 甲は、乙の業務実施について、自己に代って監督又は指示する監督職員を選定することができる。

- 2 監督職員は、本契約書及び仕様書に定められた事項の範囲内において業務の施行に立会い、又は必要な指示を与えることができる。

(業務の報告等)

第6条 甲は、必要と認めるときは、乙に対して業務の実施状況について報告を受け、又は説明を求める等の措置をとることができる。

2 乙は、甲が前項の報告を依頼し、又は書類の提出を求めたときはすみやかにこれに応じるものとする。

(業務内容の変更)

第7条 甲は、必要がある場合には、業務の内容を変更することができる。この場合において、契約金額又は契約期間を変更するときは、甲乙協議して書面によりこれを定めるものとする。

(契約の解除)

第8条 甲は、次の各号の一に該当するときは、催告することなくこの契約の全部又は一部を解除することができる。

一 乙の責に帰する事由により、乙がこの契約の全部又は一部を履行する見込みがないと認められるとき。

二 乙が第4条、第17条又は第18条の規定に違反したとき。

三 乙又はその使用人が甲の行う監督及び検査に際し不正行為を行い、又は監督者等の職務の執行を妨げたとき。

四 履行期限内に成果品の提出がなかったとき。

2 甲は、乙が次の各号の一に該当すると認められるときは、催告することなくこの契約を解除することができる。

一 法人等（個人、法人又は団体をいう。）の役員等（個人である場合はその者、法人である場合は役員又は支店若しくは営業所（常時契約を締結する事務所をいう。）の代表者、団体である場合は代表者、理事等、その他経営に実質的に関与している者をいう。）が、暴力団（暴力団員による不当な行為の防止等に関する法律（平成3年法律第77号）第2条第2号に規定する暴力団をいう。以下同じ）又は暴力団員（同法第2条第6号に規定する暴力団員をいう。以下同じ。）であるとき

二 役員等が、自己、自社若しくは第三者の不正の利益を図る目的、又は第三者に損害を加える目的をもって、暴力団又は暴力団員を利用するなどしているとき

三 役員等が、暴力団又は暴力団員に対して、資金等を供給し、又は便宜を供与するなど直接的あるいは積極的に暴力団の維持、運営に協力し、若しくは関与しているとき

四 役員等が、暴力団又は暴力団員であることを知りながらこれを不当に利用するなどしているとき

五 役員等が、暴力団又は暴力団員と社会的に非難されるべき関係を有しているとき

3 甲は、乙が自ら又は第三者を利用して次の各号の一に該当する行為をした場合は、催告することなくこの契約を解除することができる。

一 暴力的な要求行為

二 法的な責任を超えた不当な要求行為

三 取引に関して脅迫的な言動をし、又は暴力を用いる行為

四 偽計又は威力を用いて甲等の業務を妨害する行為

五 その他前各号に準ずる行為

4 甲は、前三項の規定により、この契約の全部又は一部を解除した場合は、既に乙に支払った契約金額の全部又は一部を乙に返還させることができる。

(再受任者等に関する契約解除)

第9条 乙は、契約後に再受任者等（再受任者、及び乙又は再受任者が当該契約に関して個別に契約する場合の当該契約の相手方をいう。以下同じ。）が第8条第2項及び第3項の一に該当する者（以下「解除対象者」という。）であることが判明したときは、直ちに当該再受任者等との契約を解除し、又は再受任者等に対し契約を解除させるようにしなければならない。

2 甲は、乙が再受任者等が解除対象者であることを知りながら契約し、若しくは再受任者等の契約を承認したとき、又は正当な理由がないのに前項の規定に反して当該再受任者等との契約を解除せず、若しくは再受任者等に対し契約を解除させるための措置を講じないときは、催告することなくこの契約を解除することができる。

(違約金)

第10条 次に掲げる場合のいずれかに該当したときは、乙は、甲の請求に基づき、契約金額の100分の10に相当する金額を違約金として甲の指定する期間内に支払わなければならない。

- 一 甲が第8条又は第9条第2項の規定により契約の全部又は一部を解除したとき。
  - 二 乙について破産手続開始の決定があった場合において、破産法（平成16年法律第75号）の規定により選任された破産管財人が契約を解除したとき。
  - 三 乙について更生手続開始の決定があった場合において、会社更生法（平成14年法律第154号）の規定により選任された管財人が契約を解除したとき。
  - 四 乙について再生手続開始の決定があった場合において、民事再生法（平成11年法律第225号）の規定により選任された再生債務者等が契約を解除したとき。
  - 五 この契約に関し、乙が私的独占の禁止及び公正取引の確保に関する法律（昭和22年法律第54号。以下「独占禁止法」という。）第3条の規定に違反し、又は乙が構成事業者である事業者団体が独占禁止法第8条第1号の規定に違反したことにより、公正取引委員会が乙に対し、独占禁止法第7条の2第1項（独占禁止法第8条の3において準用する場合を含む。）の規定に基づく課徴金の納付命令（以下「納付命令」という。）を行い、当該納付命令が確定したとき（確定した当該納付命令が独占禁止法第63条第2項の規定により取り消された場合を含む。）。
  - 六 この契約に関し、乙が独占禁止法第3条の規定に違反し、又は乙が構成事業者である事業者団体が独占禁止法第8条第1号の規定に違反したことにより、公正取引委員会が乙又は当該事業者団体（以下「乙等」という。）に対し、独占禁止法第7条若しくは第8条の2の規定に基づく排除措置命令（以下「排除措置命令」という。）を行い、当該排除措置命令が確定したとき。
  - 七 この契約以外の乙の取引行為に関して、乙が独占禁止法第3条の規定に違反し、又は乙が構成事業者である事業者団体が独占禁止法第8条第1号の規定に違反したことにより、公正取引委員会が、乙等に対し、納付命令又は排除措置命令を行い、これらの命令が確定した場合において、これらの命令に乙等に独占禁止法第3条又は第8条第1号の規定に違反する行為があったとされた期間及び当該違反する行為の対象となった取引分野が示され、この契約が、当該期間（これらの命令に係る事件について、公正取引委員会が乙等に対し納付命令を行い、これが確定したときは、当該納付命令における課徴金の計算の基礎である当該違反する行為の実行期間を除く。）に入札（見積書の提出を含む。）が行われたものであり、かつ、当該取引分野に該当するものであるとき。
  - 八 この契約に関し、乙（法人にあっては、その役員又は使用人を含む。）の刑法（明治40年法律第45号）第96条の6又は独占禁止法第89条第1項若しくは第95条第1項第1号に規定する刑が確定したとき。
- 2 前項の規定は、甲に生じた実際の損害の額が違約金の額を超える場合において、甲がその

超える分の損害を損害金として請求することを妨げない。

(報告)

第 11 条 乙は、作業終了後すみやかに甲に作業終了の報告をしなければならない。

(検査)

第 12 条 甲は、前条の報告があったときは、当該届出を受理した日から 10 日以内に検査を行わなければならない。

(契約金の支払)

第 13 条 乙は、前条の検査に合格したときは、甲に契約金の支払を請求するものとする。  
2 甲は、前項の規定により、乙から適法な契約金の請求を受けたときは、請求書を受理した日から 60 日以内に支払うものとする。

(損害賠償)

第 14 条 甲は、第 8 条又は第 9 条第 2 項の規定によりこの契約を解除した場合は、これにより乙に生じた損害について、何ら賠償ないし補償することは要しない。

(担保責任)

第 15 条 甲は、乙が本契約履行後に提出した成果品について 1 年以内に契約の内容に適合しないものであることを発見したときは、契約不適合である旨を乙に通知し、修補又は既に支払った契約金額の一部を返還させることができるものとする。

(延滞金)

第 16 条 乙は、第 8 条第 4 項の規定による契約金額の返還又は第 10 条の規定による違約金等の支払いを甲の指定する期間内に行わないときは、当該期間を経過した日から支払いをする日までの日数に応じ、民法（明治 29 年法律第 89 号）第 404 条で定める法定利率で計算した額の延滞金を甲に支払わなければならない。

(守秘義務)

第 17 条 甲及び乙は、この契約の履行に際し、知り得た相手方の秘密を第三者に漏らし、又は利用してはならない。

(個人情報の取扱い)

第 18 条 乙は、甲から預託を受けた個人情報（生存する個人に関する情報であつて、当該情報に含まれる氏名、生年月日その他の記述又は個人別に付された番号、記号その他の符号により当該個人を識別できるもの（当該情報のみでは識別できないが、他の情報と容易に照会することができ、それにより当該個人を識別できるものを含む。）をいう。以下同じ。）について、善良な管理者の注意をもって取扱う義務を負わなければならない。  
2 乙は次の各号に掲げる行為をしてはならない。ただし、事前に甲の承認を受けた場合は、この限りではない。  
(1) 甲から預託を受けた個人情報を第三者（再委託等する場合における再委託等先を含む。）に預託若しくは提供又はその内容を知らせること。  
(2) 甲から預託を受けた個人情報を本契約の目的の範囲を超えて使用、複製、又は改変すること。  
3 乙は、甲から預託を受けた個人情報の漏洩、滅失、毀損の防止その他の個人情報の適切

な管理のために必要な措置を講じなければならない。

- 4 乙は、甲から預託を受けた個人情報について、作業終了、又は解除をした後に速やかに甲にその媒体を返還するとともに、乙が保存している当該個人情報について、復元不可能な状態に消去し、その旨を甲に通知しなければならない。ただし、甲が別に指示したときは、その指示によるものとする。
- 5 乙は、預託を受けた個人情報の取扱いに係る業務を第三者に再委託等してはならない。ただし、事前に甲に対して、再委託等業務の内容、再委託等先の詳細等甲が要求する事項を書面により通知し、甲の承認を得た場合は、この限りではない。
- 6 乙は、前項のただし書に基づく再委託等を行う場合において、再委託等先に対して本条に規定する措置及び義務を遵守させるため、必要な措置をとらなければならない。また、第7項に規定する検査について、預託する個人情報等の秘匿性等その内容やその量等に応じて甲が必要と認めるときは、甲所属の職員又は甲の指定する職員若しくは乙が実施する。
- 7 甲は、預託する個人情報等の秘匿性等その内容やその量等に応じて必要があると認めるときは、甲所属の職員又は甲の指定する者に乙の事務所又はその他の業務実施場所等において、甲が預託した個人情報の管理体制、実施体制及び管理状況について検査をさせ、乙に対して必要な指示をすることができる。
- 8 乙は、甲から預託を受けた個人情報について漏洩、滅失、毀損、その他本条にかかる違反等が発生した場合、又はそのおそれが生じた場合には、適切な措置を講じるとともに、甲にその旨を通知して、必要な対応策を甲と協議する。
- 9 乙は、自らの故意又は過失により生じた前項の事故により、甲に損害が生じた場合には、その賠償の責めに任ずるものとする。
- 10 第1項及び第2項の規定については、作業終了、又は解除をした後であっても効力を有するものとする。

(本契約に関する疑義の決定)

第19条 この契約書に規定がない事項及び疑義のあるときは、甲乙協議のうえ定めるものとする。

この契約の締結を証するため、本契約書2通を作成し、甲乙記名押印のうえ、各1通を保有するものとする。

令和 年 月 日

甲 茨城県つくば市小野川16-2  
国立研究開発法人国立環境研究所  
理事長 木本 昌秀

乙



(別紙)

再委託等承認申請書

年 月 日

国立研究開発法人国立環境研究所  
理事長 木本 昌秀 殿

住 所  
会 社 名  
代表者氏名

本件業務の実施に当たり、下記により業務の一部を再委託等したく、本件契約書第4条の規定に基づき承認を求めます。

記

- 1 業務名：
- 2 契約金額： 円（税込み）
- 3 再委託等を行う業務の範囲：
- 4 再委託等を行う業務に係る経費： 円（税込み）
- 5 再委託等を必要とする理由：
- 6 再委託等を行う相手方の商号又は名称及び住所：
- 7 再委託等を行う相手方を選定した理由：

担当者等連絡先

部署名：  
担当者名：  
責任者名：  
TEL：  
E-mail：

(別紙6)

### 暴力団排除等に関する誓約事項

当社（個人である場合は私、団体である場合は当団体）は、下記事項について、入札書（見積書）の提出をもって誓約いたします。

この誓約が虚偽であり、又はこの誓約に反したことにより、当方が不利益を被ることとなっても、異議は一切申し立てません。

また、国立研究開発法人国立環境研究所（以下「貴所」という。）の求めに応じ、当方の役員名簿（有価証券報告書に記載のもの（生年月日を含む。）。ただし、有価証券報告書を作成していない場合は、役職名、氏名及び生年月日の一覧表）及び登記簿謄本の写しを提出すること並びにこれらの提出書類から確認できる範囲での個人情報警察に提供することについて同意します。

### 記

1. 次のいずれにも該当しません。また、将来においても該当することはありません。
  - (1) 契約の相手方として不適当な者
    - ア 法人等（個人、法人又は団体をいう。）の役員等（個人である場合はその者、法人である場合は役員又は支店若しくは営業所（常時契約を締結する事務所をいう。）の代表者、団体である場合は代表者、理事等、その他経営に実質的に関与している者をいう。）が、暴力団（暴力団員による不当な行為の防止等に関する法律（平成3年法律第77号）第2条第2号に規定する暴力団をいう。以下同じ）又は暴力団員（同法第2条第6号に規定する暴力団員をいう。以下同じ。）であるとき
    - イ 役員等が、自己、自社若しくは第三者の不正の利益を図る目的又は第三者に損害を加える目的をもって、暴力団又は暴力団員を利用するなどしているとき
    - ウ 役員等が、暴力団又は暴力団員に対して、資金等を供給し、又は便宜を供与するなど直接的あるいは積極的に暴力団の維持、運営に協力し、若しくは関与しているとき
    - エ 役員等が、暴力団又は暴力団員と社会的に非難されるべき関係を有しているとき
  - (2) 契約の相手方として不適当な行為をする者
    - ア 暴力的な要求行為を行う者
    - イ 法的な責任を超えた不当な要求行為を行う者
    - ウ 取引に関して脅迫的な言動をし、又は暴力を用いる行為を行う者
    - エ 偽計又は威力を用いて国立研究開発法人国立環境研究所の業務を妨害する行為を行う者
    - オ その他前各号に準ずる行為を行う者
2. 暴力団関係業者を再委託又は当該業務に関して締結する全ての契約の相手方としません。
3. 再受任者等（再受任者、共同事業実施協力者及び自己、再受任者又は共同事業実施協力者が当該契約に関して締結する全ての契約の相手方をいう。）が暴力団関係業者であることが判明したときは、当該契約を解除するため必要な措置を講じます。
4. 暴力団員等による不当介入を受けた場合、又は再受任者等が暴力団員等による不当介入を受けたことを知った場合は、警察への通報及び捜査上必要な協力を行うとともに、発注元の貴所へ報告を行います。

5. 貴所の規程類及び法令を遵守して不正、不適切な行為に関与せず、また、貴所の職員等から不正行為の依頼等があった場合には拒絶するとともに、その内容を貴所に通報し、さらに内部監査、その他調査等において、取引帳簿の閲覧・提出等の要請に協力します。

(参考) 国立研究開発法人国立環境研究所 規程・規則等

<https://www.nies.go.jp/kihon/kitei/>

(参 考)

#### 紙入札に当たっての留意事項

1. 本調達に関する質問回答について  
本調達に関する質問回答書は当研究所HP上で閲覧可能である。
2. 入札書について  
入札書については、応札者において適当部数コピーの上、記名し用意すること。  
なお、代理人をもって入札する場合の記名は、必ず委任状で委任される者のものと同一とする。
3. 委任状について
  - 1) 代理人が応札する場合には必ず委任状を提出すること。
  - 2) 本社（代表者等）から直接委任を受ける場合には、代理人の委任状（別紙3）を、支社等を經由して委任を受ける場合には、支社長等への代理人の委任状（別紙3）と支社長等から復代理人への委任状（別紙4）の両方を用意すること。
4. 資格審査結果通知書の写しを用意すること。
5. 郵送による入札を行う場合においても、資格審査結果通知書の写し等必要書類を提出すること。

# 仕 様 書

1 件 名 令和 6 年度ヨコエビを用いた慢性底質試験法の検証に係る業務

2 業務契約期間 契約締結日～令和 7 年 2 月 28 日

3 業務実施場所 請負者において行うものとする。

## 4 目 的

国立研究開発法人国立環境研究所（以下「NIES」という。）では、「令和 6 年度 OECD における生態影響の新規試験法に関する開発・検討及び GLP 監視当局活動への支援業務」（以下「環境省請負業務」という。）及び過年度の類似の環境省請負業務において、ヨコエビを用いた底質試験法（以下「ヨコエビ底質試験法」という。）を作成し、経済協力開発機構（OECD）のテストガイドライン登録に向けた検討を行っている。国際標準化・統一化に向けて、NIES で作成した試験法案が異なる試験機関においても同等の結果を提供できるかどうか検討する必要がある。

そこで本業務では、難水溶性物質又は難分解性物質を用いてスパイク底泥を調製し、淡水産のヨコエビ種（*Hyalella azteca*）を用いたヨコエビ底質試験を NIES 以外の試験機関において実施することで、試験法の妥当性の検証を行うとともに、修正が必要な事項を明らかにすることを目的とする。

## 5 業 務 内 容

NIES が配布する難水溶性物質又は難分解性物質（多環芳香族炭化水素のピレンを想定）を用いて、NIES が現在 OECD に提出中であるヨコエビ底質試験法のガイドライン案（別添）に基づき、（1）～（2）に示す業務を実施する。請負者は、本業務の遂行に当たり、NIES 担当者と十分な打合せを行うこととする。

### （1）試験計画書の作成

ヨコエビ底質試験法のガイドライン案及び事前の打合せを踏まえ、人工底泥、試験用水、試験生物種の馴致、試験容器・装置・器具及び試験手順等の内容を含む試験計画書（案）を作成し、NIES 担当者の承認を得ること。

### （2）ヨコエビ底質試験法の検証

ヨコエビ底質試験法のガイドライン案に従い、人工底泥を調製し、300 mL トールビーカーを用いた底質-水曝露システムによるヨコエビ底質試験を実施する。ヨコエビ試験は、5 濃度区以上で各濃度区の連数は 8 以上とする。曝露開始から 28 日後に清浄な水を入れたビーカーに生存個体を移し、産仔数を計測し、曝露開始から 42 日後の生存率、成長率及び産仔数を測定する。NIES で実施する同様の試験との比較を行うため、試験条件はなるべく NIES と同一のものとする。

底質濃度の測定は NIES で行うため、曝露開始時及び終了時の分析用の底質試料を NIES に送付する。ただし、上層水及び間隙水濃度は請負者にて適切な前処理の後に測定する。試験期間中における分析対象の試料数は 60 個とする。また、ヨコエビ底質試験の実施に当たって手順の改訂が必要であると考えられる事項を抽出する。

## 6 成果物の提出

請負者は、試験が終了次第、可能な限り 1 か月以内に業務結果の速報を NIES 担当者へ提出するものとする。その後、業務結果報告書の草案を作成し、NIES 担当者との協議の上、業務契約期間終了時までには報告書の電子ファイルを電子メール等によって送付するものとする。

## 7 著作権等の扱い

(1) 請負者は、本業務の目的として作成される成果物に関し著作権法第 27 条及び第 28 条を含む著作権の全てを NIES に無償で譲渡するものとする。

(2) 請負者は、成果物に関する著作者人格権（著作権法第 18 条から第 20 条までに規定された権利をいう。）を行使しないものとする。ただし、NIES が承認した場合は、この限りではない。

(3) 上記(1)及び(2)にかかわらず、成果物に請負者が既に著作権を保有しているもの（以下「既存著作物」という。）が組み込まれている場合は、当該既存著作物の著作権についてのみ、請負者に帰属する。

提出される成果物に第三者が権利を有する著作物が含まれる場合には、請負者が当該著作物の使用に必要な費用の負担及び使用許諾契約等に係る一切の手続を行うものとする。

## 8 情報セキュリティの確保

請負者は、国立研究開発法人国立環境研究所情報セキュリティポリシーを遵守し、情報セキュリティを確保するものとする。特に下記の点に留意すること。なお、国立研究開発法人国立環境研究所情報セキュリティポリシーは以下URLにおいて公開している。

([https://www.nies.go.jp/security/sec\\_policy.pdf](https://www.nies.go.jp/security/sec_policy.pdf))

- ①請負者は、請負業務の開始時に、請負業務に係る情報セキュリティ対策の遵守方法及び管理体制、事故時における緊急時の連絡体制について、NIES 担当者に書面で提出すること。
- ②請負者は、NIES から要機密情報を提供された場合には、当該情報の機密性の格付けに応じて適切に取り扱われるための措置を講ずること。
- ③請負者は、国立研究開発法人国立環境研究所セキュリティポリシーの履行が不十分と見なされるとき又は請負者において請負業務に係る情報セキュリティ事故が発生したときは、必要に応じて NIES の行う情報セキュリティ監査を受け入れること。
- ④請負者は、NIES から提供された要機密情報が業務終了等により不要になった場合には、確実に返却し又は廃棄し、文書にて報告すること。
- ⑤業務に用いる電算機(パソコン等)は、使用者の履歴が残るものを用いてこれを保存するとともに、施錠など適切な盗難防止の措置を講ずること。また、Winny 等の P2P ソフトをインストールしていないことが確認できたもののみを使用すること。
- ⑥再委託することとなる場合は、事前の承諾を得て再委託先にも以上と同様の制限を課して契約すること。

## 9 検 査

本業務終了後、NIES 担当者による本仕様書に基づく検査に合格しなければならない。

## 10 協 議 事 項

本業務に関し疑義等を生じたときは、速やかに NIES 担当者と協議の上、その指示に従うものとする。

## 11 そ の 他

請負者は、本業務実施に係る活動において、国等による環境物品等の調達推進等に関する法律（グリーン購入法）を推進するよう努めるとともに、物品の納入等に際しては、基本方針で定められた自動車を利用するよう努めるものとする。

## OECD/OCDE

# **OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**

## **Sediment-water Amphipod Toxicity Test Using Spiked Sediment**

Part I: 10-day sub-chronic toxicity test

Part II: 42-day chronic toxicity test

### **PART I: 10-DAY SUB-CHRONIC TOXICITY TEST**

#### **INTRODUCTION**

1. Benthic animals are subject to potentially high exposure to chemicals present in sediment environments and should therefore be given preferential attention. Among these benthic organisms, amphipods play an important role in sediment ecosystems. This Test Guideline is designed to assess the effects of exposure of chemicals to the freshwater benthic amphipod *Hyalella azteca* and other well documented freshwater amphipods (e.g., *Gammarus pulex*, *Gammarus pseudolimnaeus*, and *Gammarus fossarum*). The description about other freshwater amphipods may be deleted, if no laboratory uses these species in the inter-laboratory ring test. It is based on existing toxicity test protocols for *H. azteca* which have been developed by United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2000; USEPA 2016a; ASTM, 2020) and Environment and Climate Change Canada (2017).
2. The exposure scenario used in this guideline is spiking of sediment with the test chemical. The scenario of spiking sediment is intended to simulate accumulated levels of chemicals persisting in the sediment.
3. Chemicals that need to be tested towards benthic organisms usually persist in this compartment over long time periods. Benthic organisms may be exposed via several routes. The relative importance of each exposure route, and the time taken for each to contribute to the overall toxic effects, is dependent on the physical-chemical properties of the chemical concerned among others. For strongly adsorbing chemicals (e.g., with  $\log K_{OW} > 5$ ) or for chemicals covalently binding to sediment, ingestion of contaminated food may be a significant exposure route. In order not to underestimate the toxicity of highly lipophilic chemicals, the use of food added to the sediment before application of the test chemical may be considered (see paragraph 36).

4. The measured endpoints for 10-day sub-chronic toxicity test (Part I) are survival and growth. The measured endpoints for the 42-day chronic test (Part II) are survival, growth, and reproduction.
5. The use of formulated sediment (also called reconstituted, artificial, or synthetic sediment) is recommended. Formulated sediment has several advantages over natural sediment (also called field-collected or environmental sediment):
  - ✓ the experimental variability is reduced because it forms a reproducible "standardized matrix." and the need to find uncontaminated and clean sediment sources is eliminated;
  - ✓ the tests can be initiated at any time without encountering seasonal variability in the test sediment and there is no need to pre-treat the sediment to remove indigenous fauna;
  - ✓ the use of formulated sediment also reduces the cost associated with the field collection of sufficient amounts of sediment for routine testing.
6. However, natural sediments will be considered acceptable if it can be demonstrated that the sediment does not have concentrations of contaminants which reduced survival or growth of test organisms and the amphipods in the control meet the validity criteria.
7. Definitions are given in ANNEX 1.

### **PRINCIPLE OF THE TEST**

8. Seven to eight days old juvenile amphipods are exposed to a concentration range of the test chemical in sediment - water systems. The test chemical is spiked into the sediment and the spiked sediment is transferred to test beakers after sediment conditioning is completed. Juveniles are subsequently introduced into test beakers. Survival and dry weight (and body length as an option) are measured at the end of the 10-day test. These data are analyzed either by using a regression model in order to estimate the concentration that would cause x% reduction in survival or dry weight (e.g., EC50 etc.), or by using statistical hypothesis testing to determine a NOEC/LOEC. The latter requires comparison of effect values with control values using statistical tests.

### **INITIAL CONSIDERATIONS**

9. It is recommended to know information about chemical-specific properties such as the structural formula, molecular weight, purity, stability in water and light, acid dissociation constant (pKa), organic carbon partition coefficient ( $K_{OC}$ ) and *n*-octanol water partition coefficient ( $K_{OW}$ ), water solubility, and vapor pressure, as well as results of a test for ready biodegradability OECD TG 301 (OECD, 1992) or OECD TG 310 (OECD, 2006a). Conduct of this test guideline without the information listed above should be carefully considered as the



study design will be dependent on the physical-chemical properties of the test chemical and could lead to meaningless or difficult to interpret results.

10. A validated analytical method, of known accuracy, precision, and sensitivity, for the quantification of the test chemical and potential degradation and transformation products in the test solution and sediment should be available (OECD, 2014), where technically feasible. Performance parameters should be reported (e.g., accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification, specificity, working range).

11. If the Test Guideline is used for the testing of a mixture, a substance of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials (UVCB) or a multi-constituent substance, its composition should, as far as possible, be characterized, e.g., by the chemical identity of its constituents, their quantitative occurrence and their chemical-specific properties. Recommendations about the testing of difficult test chemicals like mixtures, UVCBs or multi-constituent substances are given in Guidance Document No. 23 (OECD, 2019).

### **VALIDITY OF THE TEST**

12. For the test to be valid the following conditions apply:

- ✓ The mean mortality in the controls should not exceed 20% at the end of the test;
- ✓ If the mean dry weight at the start of the test is 0.02 mg per individual or more, the mean dry weight in the control at the end of the test should be at least 2.5 times larger than the mean initial dry weight. If the mean initial dry weight is less than 0.02 mg, the mean dry weight in the control at the end should be 0.05 mg per individual or more; This criterion should be revised if other freshwater amphipods are included in this guideline.
- ✓ Throughout the test period, the oxygen concentration in overlying water should be greater than 2.5 mg/L, and the pH of overlying water should be between 6 and 9;
- ✓ Throughout the test period, the water temperature should be within the range of  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , and the mean water temperature should be within the range of  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . This criterion should be revised if other freshwater amphipods are included in this guideline.

### **DESCRIPTION OF THE METHOD**

#### **Test vessels**

13. Normal laboratory equipment for the conduct of this assay, with appropriate documentation to validate that the equipment is working correctly, include:

- ✓ oxygen meter

- ✓ pH meter
- ✓ light meter
- ✓ adequate apparatus for temperature control
- ✓ equipment for determination of hardness and ammonia concentration of water
- ✓ equipment of determination of total organic carbon content
- ✓ equipment for the determination of concentration of test chemical in test solution and sediment

### **Test vessels**

14. The test is conducted preferably in glass 300 ml beakers that are 6 to 8 cm in diameter. Other vessels are suitable, but they should guarantee a suitable depth of overlying water and sediment (at a minimum of 1.5 cm in depth of sediment). The ratio of the depth of the sediment layer to the depth of the overlying water should be within the range of from 1:1.75 (e.g., 100 mL sediment and 175 mL water) to 1:4 (e.g., 55 mL sediment and 220 mL water). Test vessels and other apparatus that will come into contact with the test system should be made entirely of glass or other chemically inert material (e.g., polytetrafluoroethylene [PTFE]). Test vessels must be cleaned thoroughly before and after use.

### **Selection of species**

15. The preferred species for this test is *Hyalella azteca*. Details of culture methods are given in ANNEX 2. *H. azteca* is known as a complex of many cryptic species; therefore the strain and genetic information should be confirmed before testing (Major et al. 2013) but are not required prior to every test if organisms come from an in-house culture. Other well documented freshwater species may also be used, for example *Gammarus pulex*, *Gammarus pseudolimnaeus*, and *Gammarus fossarum* (USEPA, 2016b). The sentence about other freshwater amphipods may be deleted if no laboratory uses these species in the inter-laboratory ring test.

### **Sediment**

16. Formulated sediment should preferably be used. However, if natural sediment is used, it should be characterized (at least pH, organic carbon content; in addition, it is recommended to determine other parameters determination of other parameters such as C/N ratio and granulometry are also recommended), and it should not have concentrations of contaminants which reduced survival or growth of test organisms. Also, natural sediment should not contain other organisms that might compete with or consume the amphipods. The following formulated sediment, according to the OECD Guideline 218 (OECD, 2004), is recommended for use in

this test: It is also recommended that, before it is used in an amphipod toxicity test, the sediment be conditioned for seven days under the same conditions which prevail in the subsequent test (see paragraph 27).

- a. 4-5% (dry weight) peat (e.g., Sphagnum): a close to pH 5.5 to 6.0 as possible; it is important to use peat in powder form, finely ground (particle size  $\leq 1$  mm) and only air dried.
- b. 20% (dry weight) kaolin clay (kaolinite content preferably above 30%).
- c. 75-76% (dry weight) quartz sand (fine sand should be predominate with more than 50% of the particles between 50 and 200  $\mu$ m).
- d. Deionized water is added to obtain a moisture content of the final mixture in a range of 30-50%.
- e. Calcium carbonate of chemically pure quality ( $\text{CaCO}_3$ ) is added to adjust the pH of the final mixture of the sediment to  $7.0 \pm 0.5$ . Organic carbon content of the final mixture should be 2% ( $\pm 0.5\%$ ) and is to be adjusted by the use of appropriate amounts of peat and sand, according to (a) and (c).

17. The source of peat, kaolin clay, and sand should be known. The sediment components will be analyzed to identify background contaminants such as heavy metals, organochlorine compounds, and organophosphorus compounds. An example for the preparation of the formulated sediment is described in **ANNEX 3**. Mixing of dry constituents is also acceptable if it is demonstrated that after addition of overlying water a separation of sediment constituents (e.g., floating of peat particles) does not occur, and that the peat or the sediment is sufficiently conditioned.

18. Other types of formulated sediment have been proposed for *H. azteca* and can be used. For example, Environment and Climate Change Canada (2017) and ISO (2013) recommend the mixture of sand, aluminium (III) oxide, iron (III) oxide, peat, and clay as formulated sediment. Kemble et al. (1999) proposed another type of formulated sediment consisting of sand, silt, clay, dolomite,  $\alpha$ -cellulose, and humic acid. Note that cellulose may show lower  $K_{OC}$  values for a test chemical than peat moss and natural sediment (Cui and Gan, 2013), thereby increasing in the bioavailability and toxicity of the chemical.

19. Sediment type and sediment properties can substantially affect the fate and bioavailability of the test chemical, and therefore uptake by the test organism and subsequent toxicity. If natural sediment is used, it is necessary to report sediment characteristics that may have an influence on bioavailability and therefore toxicity. Total organic carbon usually provides the main binding phase for many types of chemicals and therefore its concentration in natural sediment should be measured so that normalisation of toxicity data to organic carbon can be done (ECHA 2017a,

b).

### **Water**

20. Reconstituted water (ANNEX 2) should preferably be used. However, any suitable water, natural water (surface or ground water), or dechlorinated tap water are acceptable as culturing water and test water if amphipods will survive in it for the duration of the culturing and testing without showing signs of stress. At the start of the test, the pH of the test water should be between 6 and 9. For *H. azteca*, test water should exceed both 0.02 mg Br/L and 15 mg Cl/L (Ivey and Ingersoll, 2016) and 90 mg/L water hardness as CaCO<sub>3</sub>, although a concentration higher than 0.04 mg Br/L is recommended (ASTM, 2020). If bromide and chloride concentrations are below these levels, NaBr and NaCl should be added to test water. The same type of water should be used throughout the whole study. The water quality characteristics listed in ANNEX 2 should be measured at least twice a year, if natural or tap water is used or when it is suspected that these characteristics may have changed significantly. If using natural water, special care should be taken considering the characteristics mentioned.

### **Stock solutions - spiked sediments**

21. Spiked sediments of the chosen concentration are usually prepared by addition of a solution of the test chemical directly to the sediment. A stock solution of the test chemical dissolved in deionized water is mixed with the formulated sediment by rolling mill, feed mixer or hand mixing. If poorly soluble in water, the test chemical can be dissolved in as small a volume as possible of a suitable organic solvent (e.g., hexane, acetone, methanol, ethanol, or other volatile solvents). This solution is then mixed with small aliquots of fine quartz sand (e.g., 10 to 100 g). The solvent is allowed to evaporate, and it has to be totally removed from sand; the sand is then mixed with the suitable amount of sediment per test concentration or per test beaker. Only agents which volatilize readily can be used to solubilize, disperse or emulsify the test chemical. It should be borne in mind that the sand provided by the test chemical and sand mixture, has to be taken into account when preparing the sediment (i.e., the sediment should thus be prepared with less sand). Care should be taken to ensure that the test chemical added to sediment is thoroughly and evenly distributed within the sediment. It is recommended that subsamples should be analyzed to determine degree of homogeneity.

## **TEST DESIGN**

22. The test design relates to the selection of the number and spacing of the test concentrations, the number of vessels at each concentration. Designs for EC point estimation, for estimation of NOEC, and for conducting a limit test are described.

### **Design for analysis by regression**

23. The effect concentration (e.g., EC50) and the concentration range, over which the effect of the test chemical is of interest, should be spanned by the concentrations included in the test. Generally, the accuracy and especially the validity, with which estimates of effect concentrations (EC<sub>x</sub>) can be made, is improved when the effect concentration is within the range of concentrations tested. Extrapolation outside the concentration range tested should be avoided. A preliminary range-finding test is helpful for selecting the range of concentrations to be used.

24. If the EC<sub>x</sub> is to be estimated in 10-day sub-chronic test, at least five concentrations and at least four replicates for each concentration should be tested. In any case, it is advisable that sufficient test concentrations are used to allow good model estimation. The spacing factor between concentrations should not be greater than two (an exception could be made in cases when the dose response curve has a shallow slope). The number of replicates at each treatment can be reduced if the number of test concentrations with different responses is increased. Increasing the number of replicates or reducing the size of the test concentration intervals tends to lead to narrower confidence intervals for the test. In the 42-day chronic test, more replicates for each concentration are required (see Part II).

#### **Design for estimation of a NOEC/LOEC**

25. If the NOEC or LOEC are to be estimated, five test concentrations with at least four replicates (but preferably 8 or more) should be used and the spacing factor between concentrations should not be greater than two. The number of replicates should be sufficient to ensure adequate statistical power to detect a 20% difference from the control at the 5% level of significance ( $p = 0.05$ ) and depends on the variability of the data. For example, if five replicates are used per treatment, the coefficient of variation (CV) needs to be 10% or lower to detect a 20% difference from the control with a power of 90% (ASTM, 2020).

#### **Limit test**

26. A limit test may be performed (one test concentration and control) if no effects were seen in the preliminary range-finding test. The purpose of the limit test is to perform a test at a concentration sufficiently high to enable decision makers to exclude possible toxic effects of test chemical, and the limit is set at a concentration which is not expected to appear in any situation. A sediment concentration of 1000 mg/kg (dry weight) is recommended. Usually, at least five replicates for both the treatment and control are necessary. Adequate statistical power to detect a 20% difference from the control at the 5 % level of significance ( $p = 0.05$ ) should be demonstrated. With metric response (body weight), the t-test is a suitable statistical method if data meet the requirements of this test (normality, homogeneous variances). The unequal-variance t-test or a non-parametric test, such as the Wilcoxon-Mann-Whitney test may be used, if these requirements are not fulfilled.

## **PROCEDURE**

### **Conditions of exposure**

#### **Preparation of spiked sediment -water system**

27. Sufficient time should be allowed after spiking for the spiked chemical to equilibrate with sediment components (USEPA 2000). Appropriate conditioning time is sediment and chemical specific. Organic chemicals with  $\log K_{OW} < 4$  may reach equilibrium in 1 to 2 weeks, while those with  $\log K_{OW} > 6$  can take 2 months or more (ASTM 2020). Metals may reach equilibrium within weeks to months, but the times differ depending on metals and sediments (ASTM 2020). Periodic monitoring of chemical concentrations in pore water during sediment conditioning can be useful as a means to assess the equilibration of the spiked sediments. The spiked sediment should be placed in a suitable and sealed container, and stored in the dark at 4°C to avoid degradation of a test chemical before use.

28. The spiked sediment is transferred to the test beakers after conditioning periods and overlying water is added to produce a sediment-water volume ratio of 1:1.75 to 1:4. The depth of the sediment layer should be more than 1.5 cm. To avoid separation of sediment ingredients and re-suspension of fine material during addition of test water in the water column, the sediment can be covered with a disc (e.g., stainless steel or PTFE) while water is poured onto it, and the disc removed immediately afterwards. Other devices may also be appropriate. The addition of sediment and overlying water is recommended to be performed at least 48 h before adding test organisms to allow for stabilization in test beakers (see paragraph 34).

#### **Addition of test organisms**

29. Age of amphipods at the start of the test must be between 6- to 10-days old. To obtain less variable growth results among tests, wider age range is not allowed. Test organisms are collected by isolating adult organisms for 24–48 h, then retrieving the young produced during that period. The collected young amphipods are 0–2 days old at the time of collection and will be 6–10 days old after being held for 6–8 days. The age range within the population of organisms used to start the test must be no more than 48 h (i.e., the range of 6- to 8-days old, 7- to 9-days old, and 8- to 10-days old can be used).

30. Test organisms should be handled as little as possible. Ten amphipods should be introduced into the overlying water below water-air surface in each beaker. The weight or size of the test organisms at the start of exposure should be measured using 20 or more amphipods from the same population used in the test to assess the growth at the end of the test. A relatively large number of amphipods (i.e., 20 or more) are needed for accurate weight measurement, because dry weight of amphipod at 7–8 days old is as small as 0.020–0.035 mg per individual (ASTM,

2020). It is recommended that the weight (and length) of amphipods at 6–10 days old should be compared with the historical data of the laboratory.

### **Test concentrations**

31. A range-finding test may be helpful to determine the range of concentrations for the definitive test. For this purpose, a series of widely spaced concentrations of the test chemical are used (e.g., a factor of 10). The amphipods are exposed to each concentration of the test chemical for a period which allows estimation of appropriate test concentrations, and no replicates are required. The amphipods density per vessel should be the same as for the definitive test.

32. The test concentrations for the definitive test are decided based on the result of the range-finding test. At least five concentrations should be used and selected as described in paragraphs 23 to 25.

### **Controls**

33. Control treatment without any test chemical but including sediment should be included in the test with the appropriate number of replicates (see paragraphs 23-25). If a solvent is used for application of test chemical (see paragraph 21), the solvent control should be prepared by adding the solvent to sediment and additional control without solvent is not necessary.

### **Water renewal**

34. Either static, semi-static, or flow-through exposure system can be used. If static exposure is performed, overlying water should be aerated to provide oxygen. The aeration speed should be slow (e.g., about 1 to 2 bubbles per second) not to re-suspend sediment particles. If overlying water is renewed during the test, renewal can be accomplished manually or automatically at the rate of 2 volumes additions of overlying water per day. Automated water-delivery systems have been proposed for amphipod sediment toxicity tests (Zumwalt et al., 1994). The water-delivery system should be calibrated before a test is started to verify that the system is functioning properly. If overlying water is manually renewed, water renewal should be done as early and late in the day to minimize the length of time the system goes without renewal. Whether static, semi-static or flow-through exposure is performed, it is recommended to add the sediment to beakers and start water renewal (if performed) at least 48 h before the addition of test organisms to allow for the transfer of the test chemical from the sediment to aqueous phase. This stabilization period is sediment and chemical specific, and can be in the order of hours and in rare cases extended up to several weeks (i.e., 4 to 5 weeks).

35. Although chemical concentrations are reduced or fluctuated in the overlying water due to periodical or continuous water-renewal, organisms in direct contact with sediment generally receive a substantial proportion of a chemical dose directly from either the whole sediment or

from the pore water. This results in consistent toxicity levels among different exposure systems (i.e., static, semi-static, or flow-through) (Ankley et al., 1993; Hiki et al., 2023). However, since amphipods may avoid sediment and swim in overlying water (see paragraph 37), it is recommended that chemical concentrations in overlying water should be measured as well as in pore water and sediment (paragraph 40).

## Food

36. Without addition of food, the test organisms may starve during exposures. It is necessary to feed the amphipods, preferably daily or at least three times per week. As long as the validity criteria are met, any type of food can be provided. However, the addition of excess or different types of food should be avoided because it might alter the bioavailability of contaminants in the sediment and/or promote the growth of fungi or bacteria on the sediment surface. Here, two examples of feeding regime are shown. First, YCT (yeast, cerophyl, and trout chow) and flake food (e.g., TetraMin or TetraFin) are provided as follows: 1.0 mL of YCT per beaker-day throughout the 10-day in combination with 0.25 mg and 0.50 mg of flake food per beaker-day from Day 0 to 6 and from Day 7 to 9, respectively. The other example of diet combination is commercially available diatoms (*Thalassiosira weissflogii*) and flake food as follows (USEPA 2016a; ASTM, 2020): 0.50 mg and 0.75 mg of diatom suspension from Day 0 to 6 and from Day 7 to 9, respectively, and 0.25 mg and 0.50 mg of flake food per beaker-day from Day 0 to 6 and Day 7 to 9, respectively. Any other diatoms or alga instead of *Thalassiosira weissflogii* may also be successful, though their adequacy for use in testing should be verified. Note that effects may be underestimated as food provided to the test organisms is not spiked with the test chemical. When testing strongly adsorbing chemicals (e.g.,  $\log K_{OW} > 5$ ) or substances covalently binding to sediment, food may be added to sediment before spiking of the test chemical and subsequent stabilization. For this, plant material should be used instead of fish food, for example the addition of 0.5% (dry weight) finely ground leaves of stinging nettle (*Urtica dioeca*), mulberry (*Morus alba*), white clover (*Trifolium repens*), spinach (*Spinacia oleracea*) or of other plant material (dried and milled wheat grass or alpha-cellulose) may be used (OECD, 2004). The applicability of plant materials to the amphipod sediment test remains unclear, and their use should be verified during the development of this TG. Alternatively, field-collected sediment with sufficiently high nutritional content for the total test period could be used instead of standard OECD sediment which has lower nutritional value, as far as the validity criteria are met.

## Incubation conditions

37. The test is conducted at a constant temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . The water temperature should be measured daily, and the average value over the test should be within the range of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . The instantaneous temperature should be  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ . These sentences for temperature should be



revised if other freshwater amphipods are included in this guideline. Aeration can be provided through a glass Pasteur pipette fixed 2-3 cm above the sediment layer to maintain dissolved oxygen in the overlying water above 2.5 mg/L (i.e., about 1 bubble/second in the overlying water). A 16 hours photoperiod is used and the light intensity should be 540 to 1080 lux.

## **Observations**

### **Behavior**

38. The test organism behavior (e.g., sediment avoidance) should be observed throughout the test. Avoidance of amphipods from the sediment would result in a decreased exposure to the test chemical, thereby reducing observed toxicity.

### **Mortality**

39. When the 10 day test is terminated, just before sieving the contents of a test vessel, all live and apparently dead amphipods in water column or on the surface of the sediment should be pipetted. Then, the sediment from exposure beakers is sieved using a sieve (e.g., mesh size: 425  $\mu\text{m}$ ) to retain the amphipods. A consistent amount of time should be taken to sieve contents of each test vessel and examine this closely for recovery of live or dead amphipods. Individuals which are completely inactive but not obviously dead (e.g., not decomposing) should be held in test water within a petri dish or other suitable container to assess the lethality closely using a low- power microscope or hand-held magnifying glass. Death is defined as the cessation of all visible signs of movement or activity indicating life. Missing or unaccounted for amphipods should also be counted as dead, because dead amphipods are easily decomposed and missing.

### **Growth**

40. The dry weight of the surviving amphipod per test beaker is determined and the mean individual dry weight per beaker calculated. Amphipods can be preserved in 8% sugar formalin solution or other substitutes for formalin until the measurement. The sugar formalin solution is prepared adding 120 g of sucrose to 80 mL of formalin and mixed with a volume of 1 L using deionized water, then diluted with an equal volume of deionized water when used for preservation. All fixed amphipods from a given test beaker are pooled together into a weigh pan and dried for at least 24 hours at about 60 °C to a constant weight, and weighed to the nearest 0.01 mg after being transferred in a desiccator at room temperature. Care should be taken to thoroughly rinse the sugar formalin from the preserved amphipods before weighing these organisms. Amphipod body length also can be measured as a growth endpoint from the base of the first antenna to the tip of the third uropod along the curve of the dorsal surface using an image processing software (e.g., Image J).

## **Analytical measurement**

### **Concentration of the test chemical in test beaker**

41. For the analytical determination of the test chemical concentration, samples of the overlying water, the pore water and the sediment should be taken for analysis at least at the start and end of exposure, at least at the highest concentration and a lower one, but preferably at all tested concentrations. These determinations of test chemical concentration inform about the behavior/partitioning of the tested chemical in the water-sediment system, and about the mass balance within the system (see ANNEX 5).

42. Centrifugation at, for example, 10,000 g and 4 °C for 30 min. is the recommended procedure to isolate pore water. However, if the test chemical is demonstrated not to adsorb to filters, filtration may also be acceptable. In some cases, it might not be possible to analyze concentrations in the pore water as the sample size is too small.

### **Physical-chemical parameters**

43. The pH and dissolved oxygen in overlying water should be measured at least in one vessel of each concentration at the start and end of the test. The temperature in overlying water should be measured daily at least in one vessel of each concentration (see paragraph 37). Devices (e.g., probes) used to measure pH, temperature, and dissolved oxygen should be inspected between samples to make sure that amphipods are not attached. Ammonia should be measured in the controls and one test vessel at the highest concentration at the start and the end of the test.

## **DATA AND REPORTING**

### **Treatment and expression of results**

44. Effect concentrations should always be reported in terms of mg test chemical/kg dry sediment. It is recommended to report mass balance calculations (see ANNEX 5) for gaining information on partitioning of the chemical in the various compartments. This is optional depending on the requirements in the respective regulations; it is also particularly important for chemicals that are difficult to test (concentrations poorly maintained in the test system). The endpoints can be also expressed in mg chemical/L overlying water when deemed relevant.

45. To express the endpoints as nominal concentrations based on dry sediment, there should be evidence that the concentration of the chemical being tested has been satisfactorily maintained in the sediment (i.e. between 80 % and 120 % of the nominal concentration throughout the test). If the concentrations are expected to deviate by more than 20 %, all test concentrations should be measured and more frequent analyses may be carried out.

For the sediment compartment, the endpoints should then be expressed in terms of geometric mean measured concentrations or in time-weighted arithmetic mean measured concentrations when the samples were taken in two or more unequal time intervals (with calculations considering also the additional intermediate analytical measurements) in accordance with recommendations in ANNEX 2 of OECD Guidance Document 23 (OECD, 2019) and examples in ANNEX 6 of OECD TG211 (OECD, 2012).

For the overlying water, the endpoints should be expressed similarly in terms of geometric mean measured concentrations or time-weighted arithmetic mean measured concentrations.

46. To convert concentration data expressed e.g. as mg/kg dry sediment into mg/kg organic carbon (OC), the dry sediment concentration should be divided by the percent TOC (expressed as decimal), as follows:

$$mg/kg\ OC = \frac{mg/kg\ dry\ sediment}{kg\ OC/kg\ dry\ sediment}$$

47. To compute a point estimate for the EC<sub>x</sub> or LC<sub>x</sub> values, the per-vessel statistics may be used as true replicates. In calculating a confidence interval for any EC<sub>x</sub>, the variability among vessels should be taken into account, or it should be shown that this variability is so small that it can be ignored. When the model is fitted by Least Squares, a transformation should be applied to the per-vessel statistics in order to improve the homogeneity of variance. However, EC<sub>x</sub> values should be calculated after the response is transformed back to the original value. Further information on statistics are given in OECD Document 54 on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (OECD, 2006b).

## TEST REPORT

48. The test report should include the following information:

### Test chemical:

- ✓ physical nature and, where relevant, physical-chemical properties (water solubility, vapour pressure, partition coefficient in soil or in sediment, stability in water, etc);
- ✓ chemical identification data (common name, chemical name, structural formula, CAS number, etc.) including purity and analytical method for quantification of test chemical.

### Test species:

- ✓ test animals used: species, scientific name, source of organisms and breeding conditions;
- ✓ information on handling of juvenile amphipods until the start of test;
- ✓ age of test animals when added to test vessels.

### Test conditions:

- ✓ sediment used (i.e., formulated or natural sediment);
- ✓ for natural sediment, location and description of sediment sampling site, including, if possible, contamination history; characteristics: pH, organic carbon content, C/N ratio and granulometry (if appropriate).
- ✓ preparation of formulated sediment: ingredients and characteristics (organic carbon content, pH, moisture, etc. at the start of the test);
- ✓ preparation of the test water (if reconstituted water is used) and characteristics (oxygen

- concentration, pH, conductivity, hardness, etc.);
- ✓ depth of sediment and overlying water;
  - ✓ volume of overlying and pore water; weight of wet sediment with and without pore water;
  - ✓ test vessels (material and size);
  - ✓ method of spiking sediment: test concentrations used, number of replicates and use of solvent if any;
  - ✓ stabilization phase of the spiked sediment-water system: duration and conditions, justification of extended stabilization (if appropriate);
  - ✓ water-renewal procedure used (i.e., static, semi-static, or flow-through) and frequency of renewal;
  - ✓ incubation conditions: temperature, light cycle and intensity, aeration (if provided);
  - ✓ detailed information on feeding including type of food, preparation, amount and feeding regime.

**Results:**

- ✓ the nominal test concentrations, the measured test concentrations and the results of all analyses to determine the concentration of the test chemical in the test vessel, including assessment of mass balance if appropriate;
- ✓ water quality within the test vessels, i.e. pH, temperature, dissolved oxygen, hardness and ammonia;
- ✓ number of surviving amphipods per vessel and concentration at the end of test;
- ✓ mean individual dry weight of amphipods per vessel and concentration, if appropriate;
- ✓ observed abnormal behavior (e.g., sediment avoidance), if any;
- ✓ estimates of toxic endpoints, for example EC<sub>x</sub> (and associated confidence intervals), NOEC and/or LOEC, and the statistical methods used for their determination;
- ✓ discussion of the results, including any influence on the outcome of the test resulting from deviations from this Guideline.

## **PART II: 42-DAY REPRODUCTION TEST (USING *H. AZTECA*)**

\*\* Currently, only the differences from Part I are shown. \*\*

### **INTRODUCTION**

49. The 10-day test which only quantifies effects on survival and growth can evaluate high levels of toxicity, but may not be able to evaluate hazard at medium levels or to identify adverse effects specific to reproductive endpoints. The method described in Part II measures survival, growth, and reproduction of *H. azteca* in a 42-day test. The procedure of this part is based on existing toxicity test protocols for *H. azteca* which have been developed by United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2000), International Organization for Standardization (ISO, 2013), and Environment and Climate Change Canada (2017).

### **PRINCIPLE OF THE TEST**

50. Seven to eight days old juvenile amphipods are exposed to a concentration range of the test substance in sediment-water systems. The test chemical is spiked into the sediment and juveniles are subsequently introduced into test beakers in which the sediment and water concentrations have been stabilized. Survival, growth, and reproduction are measured at the end of the 42-day test. On Day 28, amphipods are transferred to test beakers without sediment, thereby making the collection of newborns feasible. This test design might allow amphipods to recover from effects of sediment exposure during the holding period in clean water from Day 28 to 42; however, amphipods are exposed to sediment during critical developmental stages before release of the first brood (USEPA, 2000).

### **VALIDITY OF THE TEST**

51. For the test to be valid the following conditions apply:

- ✓ The mean mortality in the controls should not exceed 20% at the end of the test (i.e., Day 42);
- ✓ The mean dry weight in the controls should be 0.50 mg or larger per individual surviving adult amphipod at the end of test (i.e., Day 42); This criterion should be revised if other freshwater amphipods are included in this guideline.
- ✓ The mean reproduction in the controls should be 6.0 young or more per surviving adult female at the end of test (i.e., Day 42);
- ✓ Throughout the test period, the oxygen concentration in overlying water should be greater than 2.5 mg/L, and the pH in overlying water should be between 6.0 and 9.0;

- ✓ Throughout the test period, the water temperature should be within the range of  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , and the mean water temperature should be within the range of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . This criterion should be revised if other freshwater amphipods are included in this guideline.

## **DESCRIPTION OF THE METHOD**

### **Design for analysis by regression and estimation of a NOEC/LOEC**

52. If the EC<sub>x</sub> and NOEC/LOEC are to be estimated, at least five concentrations and eight replicates for each concentration should be tested. The large number of replicates in the 42-day test is due to the fact that reproduction is often more variable than growth (reproduction typically has coefficient of variation (CV) values of >20% compared to growth CV values of <10%) (USEPA, 2000). It is advisable that sufficient test concentrations are used to allow good model estimation. The spacing factor between concentrations should not be greater than two (an exception could be made in cases when the dose response curve has a shallow slope). The number of replicates at each treatment can be reduced if the number of test concentrations with different responses is increased. Increasing the number of replicates or reducing the size of the test concentration intervals tends to lead to narrower confidence intervals for the test.

## **PROCEDURE**

### **Conditions of exposure**

53. The procedure and conditions of 42-day test, including preparation of spiked-sediment, water renewal, and incubation conditions are identical to those used in the 10-day test. The differences are outlined in the following paragraphs (paragraphs 54–59).

### **Addition of test organisms**

54. Age of *H. azteca* at the start of the test must be between 7- to 8-day old. The 42-day test should start with a narrower range in size or age of *H. azteca* (i.e., 1-day range in age) to reduce potential variability in growth at the end of tests, compared to 10-day test. Test organisms are collected by isolating adult organisms for 24 h, then retrieving the young produced during that period. The collected young amphipods are 0–1 days old at the time of collection and will be 7–8 days old after being held for 7 days. The age range within the population of organisms used to start the test must be no more than 24 h (i.e., the range of 7- to 8-days old can be used). Since the sexes of juvenile amphipods cannot be identified, randomly selected 10 amphipods are transferred to each test beaker.

### **Test concentrations**

55. The results of a 10-day test (Part I) can be used to determine the concentration levels in 42-day test. A preliminary range-finding 42-day test is also helpful to determine the range of

concentrations for the definitive 42-day test.

### **Transferring to a water-only beaker**

56. On Day 28, the sediment is sieved using a sieve (e.g., mesh size: 300  $\mu\text{m}$ ) and the surviving adult amphipods in each sediment beaker are placed in 300-mL water-only beakers containing 150 to 275 mL of clean water and 5 mL of quartz sand. If young amphipods are found when sieving the sediment, the number of young amphipods must be recorded. Either static, semi-static, or flow-through system can be used for 14 days of reproduction monitoring period.

### **Food**

57. Without addition of food, the test organisms may starve during exposures. It is necessary to feed the amphipods, preferably daily or at least three times per week. As long as the validity criteria are met, any type of food can be provided. However, the addition of excess or different types of food should be avoided because it might alter the bioavailability of contaminants in the sediment and/or promote the growth of fungi or bacteria on the sediment surface. Here, two examples of feeding regime are shown. First, YCT and flake food (e.g., TetraMin or TetraFin) are provided as follows: 1.0 mL of YCT per beaker-day throughout the 42-day in combination with 0.25 mg (the first week), 0.50 mg (the second week), 1.0 mg (the third week), 1.5 mg (the fourth week), 2.0 mg (the fifth week), and 2.5 mg (the sixth week) of flake food per beaker-day. The other example of diet combination is commercially available diatoms (e.g., *Thalassiosira weissflogii*) and flake food as follows: 0.50 mg (the first week), 0.75 mg (the second week), 1.0 mg (the third week), 1.5 mg (the fourth week), 2.0 mg (the fifth week), and 2.5 mg (the sixth week) of diatom suspension, and flake food as described in the first option. Any other diatoms or alga instead of *Thalassiosira weissflogii* can be applied if their suitability has been demonstrated. When testing strongly adsorbing substances (e.g.,  $\log K_{OW} > 5$ ) or substances covalently binding to sediment, food may be added to sediment before spiking of the test substance and subsequent stabilization. For this, plant material should be used instead of fish food, for example the addition of 0.5% (dry weight) finely ground leaves of stinging nettle (*Urtica dioeca*), mulberry (*Morus alba*), white clover (*Trifolium repens*), spinach (*Spinacia oleracea*) or of other plant material (*Cerophyl* or alpha-cellulose) may be used (OECD, 2004). The applicability of plant materials to the amphipod sediment test remains unclear, and their use should be verified during the development of this TG.

### **Ending a test**

58. On Days 35 and 42, all young amphipods are pipetted from a test beaker and the number is counted. All live and apparently dead adult amphipods are counted without being transferred from the beaker, and their sexes are identified. The adult males are judged by the presence of an enlarged second gnathopod and all other adults are considered as females. Technicians must be trained and able to discriminate male and female amphipods. Images of individual amphipods can be taken to help the discrimination of sexes. The number of young per surviving

female is calculated by dividing the total number of young produced in a replicate by the number of adult female organisms surviving on Day 42 in that replicate.

### **Analytical measurement**

#### **Concentration of the test substance in test beaker**

59. When intermediate measurements are made (for example on day 7) and if the analysis needs large samples which cannot be taken from test vessels without influencing the test system, analytical determinations should be performed on samples from additional test vessels treated in the same way (including the presence of test organisms) but not used for biological observations.

### **DATA AND REPORTING**

#### **TEST REPORT**

60. The test report should include the following information:

##### **Test chemical:**

- ✓ physical nature and, where relevant, physical-chemical properties (water solubility, vapour pressure, partition coefficient in soil or in sediment, stability in water, etc);
- ✓ chemical identification data (common name, chemical name, structural formula, CAS number, etc.) including purity and analytical method for quantification of test chemical.

##### **Test species:**

- ✓ test animals used: species, scientific name, source of organisms and breeding conditions;
- ✓ information on handling of juvenile amphipods until the start of test;
- ✓ age of test animals when added to test vessels.

##### **Test conditions:**

- ✓ sediment used (i.e., formulated or natural sediment);
- ✓ for natural sediment, location and description of sediment sampling site, including, if possible, contamination history; characteristics: pH, organic carbon content, C/N ratio and granulometry (if appropriate).
- ✓ preparation of formulated sediment: ingredients and characteristics (organic carbon content, pH, moisture, etc. at the start of the test);
- ✓ preparation of the test water (if reconstituted water is used) and characteristics (oxygen concentration, pH, conductivity, hardness, etc.);
- ✓ depth of sediment and overlying water;
- ✓ volume of overlying and pore water; weight of wet sediment with and without pore water;
- ✓ test vessels (material and size);
- ✓ method of spiking sediment: test concentrations used, number of replicates and use of solvent if any;



- ✓ stabilization phase of the spiked sediment-water system: duration and conditions, justification of extended stabilization (if appropriate);
- ✓ water-renewal procedure used (i.e., static, semi-static, or flow-through) and frequency of renewal;
- ✓ incubation conditions: temperature, light cycle and intensity, aeration (if provided);
- ✓ detailed information on feeding including type of food, preparation, amount and feeding regime.

**Results:**

- ✓ the nominal test concentrations, the measured test concentrations and the results of all analyses to determine the concentration of the test chemical in the test vessel, including assessment of mass balance if appropriate;
- ✓ water quality within the test vessels, i.e. pH, temperature, dissolved oxygen, hardness and ammonia;
- ✓ number of surviving amphipods per vessel and concentration at the end of test;
- ✓ mean individual dry weight of amphipods per vessel and concentration, if appropriate;
- ✓ number of male and female adult amphipods per vessel and concentration at the end of test (i.e., Day 42);
- ✓ number of young amphipods observed per vessel per day (i.e., Day 28, 35 and 42);
- ✓ observed abnormal behavior (e.g., sediment avoidance), if any;
- ✓ estimates of toxic endpoints, for example EC<sub>x</sub> (and associated confidence intervals), NOEC and/or LOEC, and the statistical methods used for their determination;
- ✓ discussion of the results, including any influence on the outcome of the test resulting from deviations from this Guideline.

## **REFERENCES**

American Society for Testing and Materials (2020) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment- Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. E1706 – 20

Ankley GT, Benoit DA, Hoke RA, Leonard EN, West CW, Phipps GL, Mattson VR, Anderson LA (1993) Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sediments: Effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25, 12–19.

Cui X, Gan J (2013) Comparing behavior of pyrethroids between formulated and natural sediments. Environ Toxicol Chem 32(5): 1033-1039.

ECHA (2017a) Guidance on the Biocidal Regulation. Volume IV Environment – Assessment and Evaluation (Parts B + C). Helsinki (FI).

ECHA (2017b) Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7b: endpoint specific guidance. Helsinki (FI).

Environment and Climate Change Canada (2017) Biological test method: test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Third Edition. RM.33. September 2017.

Hiki K, Fischer CF, Nishimori T, Endo S, Watanabe H, Yamamoto H (2023) Influence of water exchange rates on toxicity and bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in sediment toxicity tests. Environ. Sci. Processes Impacts 25 (3):609-620.

International Organization for Standardization (2013) Water Quality-Determination of Toxicity of Fresh Water Sediments Using *Hyalella azteca*. Report No. ISO 16303:2013 Geneva, Switzerland.

Ivey C, Ingersoll C (2016) Influence of bromide on the performance of the amphipod *Hyalella azteca* in reconstituted waters. Environ Toxicol Chem 35(10): 2425-2429.

Kemble N, Dwyer C, Ingersoll C, Dawson T, Norberg-King T (1999) Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. Environ Toxicol Chem 18(2): 222-230.

Major K, Soucek DJ, Giordano R, Wetzel MJ, Soto-Adames F (2013) The common ecotoxicology laboratory strain of *Hyalella azteca* is genetically distinct from most wild strains sampled in eastern North America. Environ Toxicol Chem 32(11): 2637-2647.

OECD (1992) Ready Biodegradability. Test Guideline 301.

OECD (2004) Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. Test Guideline 218.

OECD (2006a) Ready Biodegradability – CO<sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test). Test Guideline 310.

OECD (2006b). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Series on Testing and Assessment No. 54, OECD Paris.

OECD (2012) *Daphnia magna* Reproduction Test. Test Guideline 211.

OECD (2019). Guidance Document on Aqueous-phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult test chemicals. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23 (second edition).

USEPA (2000) Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

USEPA (2016a) OCSPP 850.1735: Spiked Whole Sediment 10-Day Toxicity Test, Freshwater Invertebrates. EPA 712/C/16/002. October 2016.

USEPA (2016b) OCSPP 850.1020: Gammarid Amphipod Acute Toxicity Test. EPA 712/C/16/012. October 2016.

Zumwalt DC, Dwyer FJ, Greer IE, Ingersoll CG (1994) A water-renewal system that accurately delivers small volumes of water to exposure chambers. Environ Toxicol Chem 13(8): 1311-1314.

## ANNEX 1

For the purpose of this guideline the following definitions are used:

Conditioning period or aging period is the interval between spiking a test chemical and the addition of the spiked sediment to test vessels.

Formulated sediment or reconstituted, artificial or synthetic sediment, is a mixture of materials used to mimic the physical components of a natural sediment.

Overlying water is the water placed over sediment in the test vessel.

Pore water or interstitial water is the water occupying space between sediment and soil particles.

Spiked sediment is sediment to which test chemical has been added.

Stabilization period is the interval between the addition of the spiked sediment to test vessels and the addition of test organisms to the test vessels.

## ANNEX 2

### RECOMMENDATIONS FOR CULTURE OF FRESHWATER AMPHIPODS

1. *Hyalella azteca* and other freshwater amphipod species including *Gammarus pulex*, *G. pseudolimnaeus*, and *G. fossarum* must be cultured in a controlled temperature laboratory facility. All equipment, containers, and accessories that might contact the organisms or culture water within the culturing facility must be clean, rinsed as appropriate, and made of non-toxic materials (e.g., glass, Teflon, nylon, and stainless steel). Culture water should be renewed routinely and aerated gently to maintain the DO at 80% to 100% of saturation. The temperature of culture water should be  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  for *H. azteca* and  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  for *Gammarus* sp., as a daily average. Additionally, the instantaneous temperature of the culture water should be  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  and  $18 \pm 3^\circ\text{C}$ . A 16-h light and 8-h dark photoperiod is used.

2. Sources of culture water may be uncontaminated supply of groundwater, surface water, or reconstituted water for both *H. azteca* and *Gammarus* sp.. Acceptable water must allow satisfactory survival, growth, and reproduction of the test species. For *H. azteca*, several recipes of reconstituted freshwater have been proposed. Among them, five-salt reconstituted water (SAM-5S) is recommended (Borgmann 1996). The following recipe provides reconstituted water within a hardness of 120 to 140 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , 0.8 mg Br/L, 1.8 mg Cl/L, conductivity of 300 to 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , and pH of 6.5 to 8.5 and has been suitable for culturing *H. azteca* as demonstrated in many laboratories (Environment and Climate Change Canada, 2017). The Ca:Br ratio shall be kept constant since these are essential for *H. azteca* and must be present together (Borgmann, 1996). Na and  $\text{HCO}_3$  are the most essential ions for *H. azteca* survival, and Mg and K are needed for optimal growth. To prepare 40 L of SAM-5S reconstitute freshwater, use reagent grade chemicals (anhydrous salts) as follows:

- ✓ To 100 mL of highly purity distilled deionized or reverse osmosis water in a glass beaker add the following:
  - Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ): 4.44 g
  - Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ): 3.36 g
  - Magnesium Sulphate ( $\text{MgSO}_4$ ): 1.20 g
  - Potassium chloride (KCl): 149 mg
  - Sodium bromide (NaBr): 41.2 mg
- ✓ Stir the contents of the beaker until all of the salts are dissolved.
- ✓ Place about 20 L of high purity deionized or distilled water in a clean container.

- ✓ Pour the contents of the beaker (i.e., 100 mL water containing the salts) into the container, ensuring the entire contents of the beaker is transferred, and fill the container to 40 L with deionized or distilled water.
  - ✓ Aerate the mixture for at least 24 h at room temperature before use.
3. Substrates such as gauze strips, nylon mesh, plastic mesh, uncontaminated leaves, or shredded paper towels are placed in each culture chamber and replaced necessary.
  4. A single ration diet such as commercial fish food flakes (e.g., TetraFin, TetraMin, and Zeigler) or a mixed diet such as yeast- cerophyl and trout chow (YCT) are provided to the cultures. The amount of food distributed to each culture chamber will vary with the age and number of the amphipods in the chamber.

### **References**

ASTM (2020) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates: E1706-20. ASTM International, West Conshohocken, PA, USA.

USEPA (2016b) OCSPP 850.1020: Gammarid Amphipod Acute Toxicity Test. EPA 712/C/16/012. October 2016.

Borgmann U (1996) Systematic analysis of aqueous ion requirements of *Hyaletta azteca*: A standard artificial medium including the essential bromide ion. Archives Environ Contam Toxicol 30(3): 356-363.

Environment and Climate Change Canada (2017) Biological test method: test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyaletta azteca*. Third Edition. RM.33. September 2017.

## **ANNEX 3**

### **PREPARATION OF FORMULATED SEDIMENT**

#### **Sediment composition**

The composition of the formulated sediment should be as follows:

Constituent	Characteristics	Dry weight ratio
Quartz sand	Grain size: > 50% of the particles should be in the range of 50-200 $\mu\text{m}$	75–76%
Kaolin	Kaolinite content 30%	20%
Peat	Sphagnum moss peat, as close to pH 5.5-6.0 as possible, no visible plant remains, finely ground (particle size $\leq$ 1 mm) and air dried.	4–5%
CaCO <sub>3</sub>	Pulverized, chemically pure	0.05–1%
Water	Water used for the toxicity test	30–50%

#### **Preparation**

The peat is air dried and ground to a fine powder. A suspension of the required amount of peat powder in deionized water is prepared using a high-performance homogenizing device. The pH of this suspension is adjusted to  $5.5 \pm 0.5$  with CaCO<sub>3</sub>. The suspension is conditioned for at least two days with gentle stirring at  $20 \pm 2$  °C, to stabilize pH and establish a stable microbial component. pH is measured again and should be  $6.0 \pm 0.5$ . Then the peat suspension is mixed with the other constituents (sand and kaolin clay) and deionized water to obtain a homogeneous sediment with a water content in a range of 30–50% of dry weight of the sediment. The pH of the final mixture is measured once again and is adjusted to 6.5 to 7.5 with CaCO<sub>3</sub> if necessary. Samples of the sediment are taken to determine the dry weight and the organic carbon content. Organic carbon content of the final mixture should be 2% ( $\pm 0.5\%$ ) and is to be adjusted by the use of appropriate amounts of peat and sand.

#### **Storage**

The dry constituents for preparation of the artificial sediment may be stored in a dry and cool place at room temperature. The formulated (wet) sediment should not be stored prior to its use in the test. It should be used immediately after the aging period.

#### **References**

OECD Guideline 218 (2004) Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment

DRAFT



## ANNEX 4

### SEX DETERMINATION OF HYALELLA AZTECA

Adult male *Hyalella azteca* can be identified by enlarged second gnathopods (Figure A4-1). The absence of the enlarged gnathopods and the presence of developing eggs can be used to positively identify females (Figure A4-1). However, amphipods not identified as male are assumed to be female even if eggs are not present.

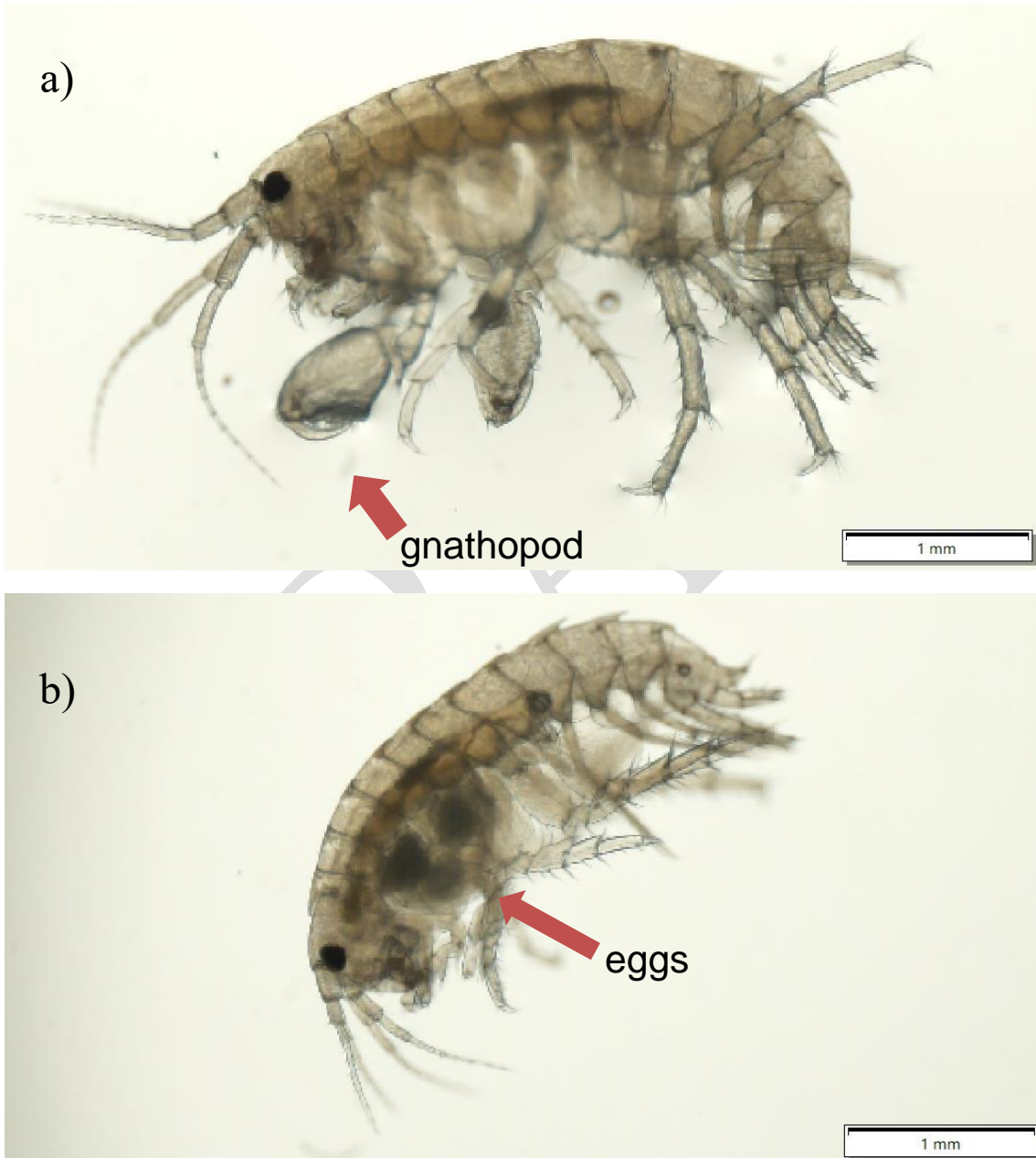


Figure A4-1. Photos of adult *Hyalella azteca* after 42 days of chronic toxicity test. (a) A male amphipod with enlarged gnathopods and (b) a female with developing eggs.

## ANNEX 5

### **MASS BALANCE CALCULATIONS FOR SEDIMENT-WATER TOXICITY TESTS; EXAMPLE FOR SPIKED SEDIMENT TEST PERFORMED WITH FRESHWATER AMPHIPODS**

1. The starting point for a mass balance calculation for a study with sediment-dweller organisms in sediment-water tests using spiked sediment is the measured concentrations of the chemical in the test system considering the concentrations at the beginning and end of the study as well any additional intermediate concentrations available.
2. The mass balance calculation in the case of studies with sediment-dwellers with spiked sediment is illustrated below for one test chemical stable in sediment and one test chemical unstable in sediment such as two pesticides with different characteristics.
3. The information on the analytical determination of the chemical needed for the mass balance calculation is given for the one example in Table A5-1. Now we have only one measurement data that can be shown here, thus we will add another chemical data after performing experiments. The measurements in this case were at three time points (2 hours and 28 days after starting exposure). For simplicity, they are reported here only at the lowest and highest concentrations tested. However, measurements at additional tested concentrations are recommended, particularly in the case of the chemicals that are difficult to test (e.g., when concentrations are poorly maintained in the test system).
4. For the two examples below, the test system contains an amount of sediment of 90 g-wet (55 mL) and a volume of overlying water of 220 mL; it is assumed that the pore water has a volume of 9 mL. Based on this information, it is possible to calculate the amount of chemical that partitions to the various compartments by multiplying the concentration by the volume/amount of water/sediment and to calculate the percentage in each compartment with respect to that initially contained in the spiked sediment.
5. In order to assess the fate of the test chemical in the sediment/water system, the mass balance calculation was performed for each time point for which measurements were available (see Tables A5-2a and Tables A5-2b).

Example 1: Test chemical stable in sediment

**Table A5-1:** Measured concentrations of the test chemical in different compartments of a spiked sediment study with *Hyalella azteca* under flow-through condition.

Measured concentrations–						
Nominal (µg/kg)	2 hours			28 days		
	Overlying water (ng/L)	Pore water (ng/L)	Sediment (µg/kg)	Overlying water (ng/L)	Pore water (ng/L)	Sediment (µg/kg)
Control	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
0.5	<LOQ	1.2	0.46	<LOQ	5.8	0.32
8	<LOQ	24	6.6	<LOQ	30	4.1

LOQ: limit of quantification.

**Table A5-2:** Example of mass balance calculations for the test chemical.

Amounts and proportions calculated from measured concentrations						
Nominal (µg)	2 hours			28 days		
	Overlying water (ng)	Pore water (ng)	Sediment (ng)	Overlying water (ng)	Pore water (ng)	Sediment (ng)
Control	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
0.5	< 0.022	0.011 (0.0%)	37 (100%)	< 0.022	0.052 (0.1%)	26 (70%)
8	< 0.022	0.22 (0.0%)	530 (100%)	< 0.022	0.27 (0.1%)	330 (62%)

Each value represents the amount of the test chemical in each compartment (i.e., overlying water, pore water, and sediment) based on the assumption that overlying water, pore water, and sediment were 220 mL, 9 mL, and 81 g-dry, respectively and that LOQ for overlying water was 0.1 ng/L. Values in parentheses indicate the proportions of the test chemical in each compartment, which was calculated by assuming the amount measured in pore water and sediment after 2 hours of exposure as 100%.

6. In the example 1, the test chemical was measured almost exclusively in the sediment at the start of exposure (i.e. more than 99.9 %), which was expected since the sediment had been spiked prior to the start of the experiment. At the end of the exposure (i.e. after 28 days), the proportion of the test chemical in the sediment decreased to 62–70 % of that initially measured.

The proportions of the test chemical in both overlying and pore water were below 0.2% over 28 days likely due to extremely high hydrophobicity of this chemical. Although this experiment was performed under a flow-through condition at the rate of 2 volumes addition per day, the low concentration in overlying water led to negligible discharge outside the test beaker. Specifically, the discharge over 28 days accounted for less than 1% of the initially measured amounts. Therefore, the reduction in sediment concentrations during exposure might be attributed to degradation rather than discharge outside the test beaker.

Example 2: Test chemical unstable in sediment

Not yet performed. We will add this example after obtaining the experimental result.

DRAFT