

II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

REGLAMENTAI

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) 2016/266

2015 m. gruodžio 7 d.

kuriuo, derinant prie technikos pažangos, iš dalies keičiamas Reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH)

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB ir 2000/21/EB ⁽¹⁾, ypač į jo 13 straipsnio 2 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 440/2008 ⁽²⁾ yra išdėstyti pagal Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 taikytini bandymų metodai, skirti cheminių medžiagų fizikinėms ir cheminėms savybėms, taip pat toksiškumui ir ekotoksiškumui nustatyti;
- (2) Reglamentą (EB) Nr. 440/2008 būtina atnaujinti – įtraukti EBPO neseniai patvirtintus naujus ir atnaujintus bandymų metodus, taip siekiant atsižvelgti į technikos pažangą ir užtikrinti, kad, laikantis Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES ⁽³⁾ nuostatų, bandymų tikslais būtų naudojama mažiau gyvūnų. Dėl šio projekto konsultuotasi su suinteresuotaisiais subjektais;
- (3) pritaikymas apima dvidešimt bandymo metodų: vienas naujas metodas skirtas fizikinei ir cheminei savybei nustatyti, įtraukta vienuolika naujų metodų ir atnaujinti trys ekotoksiškumo vertinimo bandymų metodai, taip pat įtraukti penki nauji išlikimo ir elgsenos aplinkoje vertinimo metodai;
- (4) todėl Reglamentas (EB) Nr. 440/2008 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;
- (5) šiame reglamente numatytos priemonės atitinka pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį įsteigto komiteto nuomonę,

⁽¹⁾ OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

⁽²⁾ 2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) (OL L 142, 2008 5 31, p. 1).

⁽³⁾ 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (OL L 276, 2010 10 20, p. 33).

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2015 m. gruodžio 7 d.

Komisijos vardu
Pirmininkas
Jean-Claude JUNCKER

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas taip:

- 1) Priedo pradžioje prieš A dalį įrašoma pastaba:

„Pastaba.

Prieš bet kurį iš toliau pateikiamų bandymo metodų naudojant bandymams su cheminėmis medžiagomis, sudarytomis iš kelių sudedamųjų dalių (MCS), su nežinomos ar kintamos sudėties medžiagomis, sudedamaisiais reakcijų produktais ar biologinėmis medžiagomis (UVCB) arba su mišiniais, jei atitinkamo metodo aprašyme nenurodyta, ar metodas tinkamas bandymams su MCS, UVCB ar mišiniais atlikti, reikia apsvastyti, ar metodas tinkamas numatytam reguliavimo tikslui.

Jei bandymo metodas naudojamas bandymams su MCS, UVCB ar mišiniu atlikti, reikėtų, kiek įmanoma, gauti pakankamai informacijos apie jų sudėtį, pvz., nustatant jo sudedamųjų dalių cheminį tapatumą, jų kiekius ir svarbias tų cheminių medžiagų savybes.“

- 2) Įterpiamas A.24 skyrius:

„A.24. PASISKIRSTYMO (N-OKTANOLIO / VANDENS) KOEFICIENTAS. DIDELIO SLĖGIO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODAS

ĮVADAS

Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 117 (2004).

1. Pasiskirstymo koeficientas (P) apibrėžiamas kaip medžiagos, ištirpintos dvifazėje dviejų iš esmės nesimaišančių tirpiklių sistemoje, pusiausvyros koncentracijų tuose tirpikliuose santykis. Jeigu pasirinkti tirpikliai yra n-oktanolis ir vanduo, tai:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanolis}}{C_{\text{vanduo}}}$$

Kadangi pasiskirstymo koeficientas yra dviejų koncentracijos verčių dalmuo, jis yra nedimensinis dydis, paprastai išreiškiamas dešimtainiu logaritmu.

2. Tiriant cheminių medžiagų išlikimą aplinkoje, P_{ow} yra vienas svarbiausių tyrimo parametrų. Įrodyta, kad tarp nejonizuotos formos medžiagų P_{ow} ir jų biologinio kaupimosi žuvyse esama labai svarbaus ryšio. Taip pat įrodyta, kad P_{ow} parametras pravartu žinoti prognozuojant medžiagų įgertį į dirvožemį bei dugnines nuosėdas ir nustatant kiekybinius medžiagų struktūros ir savybių ryšius, svarbius tiriant labai įvairių biologinių jų poveikį.
3. Taikyti šį bandymo metodą iš pradžių pasiūlyta remiantis C. V. Eadsforth ir P. Moser straipsniu (1). Šio bandymo metodo kūrimą ir EBPO tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą 1986 m. koordinavo Vokietijos Federacinės Respublikos aplinkos apsaugos agentūra *Umweltbundesamt* (2).

PRADINIAI SVARSTYMAI

4. Intervale nuo – 2 iki 4 (kai kada iki 5 ar daugiau) esančios $\log P_{ow}$ vertės (1) gali būti nustatomos atliekant bandymą pagal kratomos kolbos metodą (šio priedo A.8 skyrius, EBPO bandymo gairės Nr. 107). Taikant HPLC metodą $\log P_{ow}$ intervalas yra nuo 0 iki 6 (1), (2), (3), (4), (5). Pagal pastarąjį metodą gali reikėti apskaičiuoti P_{ow} įvertį, kad būtų galima parinkti tinkamas etalonines medžiagas ir patvirtinti bet kokias iš bandymo duomenų padarytas išvadas. Apskaičiavimo metodai trumpai aptarti šio bandymo metodo aprašymo priedėlyje. Didelio slėgio skysčių chromatografija (HPLC) atliekama izokratinio būdu.
5. P_{ow} vertės priklauso nuo tokių aplinkos sąlygų kaip temperatūra, pH, joninė jėga ir t. t., todėl, siekiant teisingai aiškinti P_{ow} duomenis, šios sąlygos turėtų būti nustatytos atliekant bandymą. Galbūt bus sukurtas kitas metodas jonizuojamoms medžiagoms (žr., pvz., EBPO gairių dėl pH matavimo metodo taikymo jonizuotoms medžiagoms projektą (6)), kurį būtų galima taikyti kaip alternatyvų metodą. Nors šių EBPO gairių projektu gali būti tinkama remtis nustatant tokių jonizuojamų medžiagų P_{ow} , kai kuriais atvejais labiau tinka taikyti HPLC metodą, pasirinkus aplinkai būdingą pH lygį (žr. 9 skirsnį).

(1) Viršutinė riba nurodyta todėl, kad patikslinus pasiskirstymo pusiausvyrą, prieš imant pavyzdžius analiziniais nustatymams, abu sluoksniai turi visiškai atsiskirti vienas nuo kito. Dirbant kruopščiai, P_{ow} verčių viršutinė riba gali būti dar aukštesnė.

METODO PRINCIPAS

6. Atvirkštinių fazių HPLC atliekama naudojant analizės kolonėles, įkrautas rinkoje parduodamomis kietosiomis fazėmis su ilgomis angliavandenių grandinėmis (pvz., C8, C18), chemiškai sujungtomis su silicio dioksidu.
7. Į tokią kolonėlę įšvirkšta cheminė medžiaga, pernešama judančiosios fazės, kolonėlėje pasiskirsto tarp judančiosios tirpiklio fazės ir nuostoviosios angliavandenių fazės. Šiose fazėse medžiagos sulaikomos proporcingai jų pasiskirstymo angliavandenių terpėje ir vandenyje koeficientui: pirmiausia eliuuojamos hidrofilinės, paskiausia – lipofilinės medžiagos. Medžiagų sulaikymo trukmė apibūdinama sulaikymo gebos koeficientu k , kuris išreiškiamas formule

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

kurioje t_R yra bandomosios medžiagos sulaikymo trukmė, o t_0 – laukimo trukmė, t. y. kiek laiko vidutiniškai reikia tirpiklio molekulei prasiskverbti per kolonėlę. Kiekybinių analizės metodų taikyti nebūtina – tereikia nustatyti sulaikymo trukmę.

8. Bandomosios medžiagos oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą galima apskaičiuoti bandymu nustatant jos sulaikymo gebos koeficientą k ir įrašant k į lygtį

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

kurioje

a ir b yra tiesinės regresijos koeficientai.

Šią lygtį galima sudaryti taikant tiesinę regresiją etaloninių medžiagų oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientų logaritmams $\log k$ etaloninių medžiagų sulaikymo gebos koeficientų logaritmų atžvilgiu.

9. Taikant atvirkštinių fazių HPLC metodą galima gauti pasiskirstymo koeficientų $\log P_{ow}$ įverčius intervale nuo 0 iki 6, tačiau išimtiniais atvejais $\log P_{ow}$ gali siekti ir nuo 6 iki 10, todėl gali reikėti pakeisti judančiąją fazę (3). Šis metodas netinka stiprioms rūgštims ir bazėms, kompleksiniams metalų junginiams, su eliuentu reaguojančioms medžiagoms ar paviršinio aktyvumo medžiagoms. Nejonizuotos formos jonizuojamų medžiagų (laisvųjų rūgščių arba laisvųjų bazių) matavimus galima atlikti tik naudojant tinkamą buferinį tirpalą, kurio pH lygis nesiektų pK_a (laisvosios rūgšties) arba viršytų pK_a (laisvosios bazės). Taip pat galbūt bus sukurtas jonizuojamų medžiagų bandymo pH-metrinis metodas (6), kurį būtų galima taikyti kaip alternatyvų metodą (6). Jeigu $\log P_{ow}$ vertė nustatoma siekiant klasifikuoti aplinkai gresiančius pavojus ar vertinti riziką aplinkai, bandymo pH intervalas turėtų būti toks pat, kaip gamtinėje aplinkoje, t. y. nuo 5,0 iki 9.
10. Kartais gautų rezultatų aiškinimas gali būti sudėtingas dėl priemaišų, dėl kurių sunku grafike tinkamai priskirti smailes. Jeigu tiriant mišinį gauti rezultatai sudaro neišskaidytą juostą, ataskaitoje reikėtų nurodyti viršutinę ir žemutinę $\log P_{ow}$ ribas ir kiekvienos $\log P_{ow}$ smailės procentinį plotą. Homologinės grupės mišinių atveju taip pat reikėtų nurodyti svertinį $\log P_{ow}$ vidurkį (7), apskaičiuotą pagal atskiras P_{ow} vertes ir atitinkamų smailių ploto procentines vertes (8). Skaičiuojant reikėtų atsižvelgti į visas smailes, kurios užima 5 % arba daugiau bendro visų smailių ploto (9):

$$\log P_{ow} \text{ svertinis vidurkis} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\% \text{ ploto})}{\text{bendras smailių plotas } \%} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\%_i \text{ ploto})}{\sum_i \% \text{ ploto}}$$

Svertinį $\log P_{ow}$ vidurkį tinka naudoti tik tada, kai cheminės medžiagos arba mišiniai (pvz., talo alyvos) priklauso homologinei eilei, kaip antai alkanų grupei. Atliekant mišinių matavimus, patikimus rezultatus galima gauti naudojant analitinį detektorį, jei jis vienodai jautriai reaguoja į visas mišinio sudėtyje esančias medžiagas ir jei jas būtų galima tinkamai atskirti.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

11. Prieš taikant šį metodą reikėtų žinoti bandomosios medžiagos disociacijos konstantą, struktūrinę formulę ir tirpumą judančiojoje fazėje. Taip pat naudinga turėti informacijos apie jos hidrolizę.

KOKYBĖS KRITERIJAI

12. Kad matavimai būtų patikimesni, reikiami nustatymai turi būti atliekami po du kartus.

- Pakartojamumas. Kartojant matavimus vienodomis sąlygomis ir naudojant tas pačias etalonines medžiagas, gautos $\log P_{ow}$ vertės turėtų sutapti $\pm 0,1 \log$ vieneto tikslumu.
- Atkuriamumas. Jeigu kartojant matavimus naudojamos kitos etaloninės medžiagos, galima gauti skirtingus rezultatus. Pasirinktų bandomųjų medžiagų $\log k$ ir $\log P_{ow}$ santykio koreliacijos koeficientas R paprastai yra apie 0,9 ir atitinka oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą $\log P_{ow} + 0,5 \log$ vieneto tikslumu.

13. Per tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą nustatyta, kad taikant HPLC metodą galima gauti $\log P_{ow}$ vertes, $\pm 0,5$ vieneto besiskiriančias nuo pagal kratomos kolbos metodą gaunamų verčių (2). Daugiau palyginimų galima rasti literatūros šaltiniuose (4), (5), (10), (11), (12). Tiksliausi rezultatai gaunami iš koreliacijos grafikų, sudarytų naudojant struktūriškai susijusias etalonines medžiagas (13).

ETALONINĖS MEDŽIAGOS

14. Siekiant susieti išmatuotą cheminės medžiagos sulaikymo gebos koeficientą k su jos P_{ow} reikia nubrėžti bent 6 taškų kalibracinę kreivę (žr. 24 skirsnį). Tinkamas etalonines medžiagas parenka naudotojas. Bandomosios medžiagos $\log P_{ow}$ turėtų patekti į etaloninių medžiagų $\log P_{ow}$ verčių intervalą, t. y. bent vienos etaloninės medžiagos P_{ow} turėtų būti didesnis, o kitos – mažesnis negu bandomosios medžiagos P_{ow} . Ekstrapoliavimą reikėtų taikyti tik išimtiniais atvejais. Patartina naudoti bandomajai medžiagai struktūriškai artimas etalonines medžiagas. Etaloninių medžiagų $\log P_{ow}$ vertės kalibravimui turėtų būti gautos iš patikimų bandymų duomenų, tačiau kai medžiagoms būdingos didelės (paprastai viršijančios 4) $\log P_{ow}$ vertės, o patikimų bandymų duomenų nėra, galima naudoti apskaičiuotas vertes. Jeigu naudojamos ekstrapoliuotos vertės, reikėtų nurodyti ribinę vertę.
15. Yra paskelbti daugelio cheminių medžiagų grupių $\log P_{ow}$ verčių išsamūs sąrašai (14) (15). Jeigu nėra duomenų apie struktūriškai artimų medžiagų pasiskirstymo koeficientus, galima atlikti daugiau bendro pobūdžio kalibravimą naudojant kitas etalonines medžiagas. Rekomenduojamos etaloninės medžiagos ir jų P_{ow} vertės išvardytos 1 lentelėje. Jonizuojamų medžiagų atveju joje nurodytos nejonizuotos formos vertės. Šių verčių patikimumas ir kokybė patikrinti per tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą.

1 lentelė.

Rekomenduojamos etaloninės medžiagos

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-butanonas (metiletiketonas)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridinas	0,5	
3	62-53-3	Anilinas	0,9	
4	103-84-4	Acetanilidas	1,0	
5	100-51-6	Benzilo alkoholis	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenolis	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksiacto rūgštis	1,4	pKa = 3,12

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Fenolis	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenolis	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benznitrilas	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetnitrilas	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzilo alkoholis	1,6	
13	98-86-2	Acetofenonas	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenolis	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzenkarboninė rūgštis	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloranilinas	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzenas	1,9	
18	104-54-1	Cinamilo alkoholis (stiolis)	1,9	
19	65-85-0	Benzenkarboksirūgštis	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezolis	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Cinamono rūgštis	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizolas	2,1	
23	93-58-3	Metilbenzenkarboksilatas	2,1	
24	71-43-2	Benzenas	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzenkarboninė rūgštis	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorfenolis	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloretilenas	2,4	
28	1912-24-9	Atrazinas	2,6	
29	93-89-0	Etilbenzenkarboksilatas	2,6	
30	1194-65-6	2,6-dichlorbenznitrilas	2,6	
31	535-80-8	3-chlorbenzenkarboninė rūgštis	2,7	pKa = 3,82

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluenas	2,7	
33	90-15-3	1-naftolis	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloranilinas	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzenas	2,8	
36	1746-13-0	Alilfenileteris	2,9	
37	108-86-1	Brombenzenas	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzenas	3,2	
39	119-61-9	Benzofenonas	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenolis	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timolis	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorbenzenas	3,4	
43	122-39-4	Difenilaminas	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalenas	3,6	
45	93-99-2	Fenilo benzoatas	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzenas	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorfenolis	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenilas	4,0	
49	120-51-4	Benzilbenzenkarboksilatas	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-(antr- butil)-fenolis	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorbenzenas	4,2	
52	143-07-7	Dodekano rūgštis	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenileteris	4,2	
54	85-01-8	Fenantrenas	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzenas	4,6	

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenzilas	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridinas	4,9	
58	206-44-0	Fluorantenas	5,1	
59	603-34-9	Trifenilaminas	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

METODO APRAŠYMAS

Pasiskirstymo koeficiento išankstinis įvertis

16. Jei būtina nustatyti apytikrį bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientą, geriausia tai daryti taikant apskaičiavimo metodą (žr. priedėlį) arba, kai tinka, naudojant bandomosios medžiagos tirpumo grynuose tirpikliuose santykį.

Aparatūra

17. Bandymui atlikti reikalingas skystafazis chromatografas su mažai pulsuojančiu siurbliu ir tinkama aptikimo sistema. Daugelio įvairių grupių cheminėms medžiagoms tinka naudoti 210 nm bangų ilgio UV detektorių arba lūžio rodiklio (RI) detektorių. Nuostoviojoje fazėje esančios polinės grupės gali labai sutrikdyti HPLC kolonėlės veikimą, todėl polinių grupių procentas nuostoviosiose fazėse turėtų būti minimalus (16). Galima naudoti rinkoje parduodamas mikrodalelių atvirkštinių fazių įkrovas arba jau įkrautas kolonėles. Tarp išvirkštimo sistemos ir analizės kolonėlės gali būti įdėta apsauginė kolonėlė.

Judančioji fazė

18. Eliuentinis tirpiklis ruošiamas iš HPLC tinkamo metanolio ir distiliuoto arba dejonizuoto vandens ir prieš naudojant nuduojamas. Eliuavimas turėtų būti izokratinis. Metanolio ir vandens santykis turėtų būti toks, kad vandens būtų ne mažiau kaip 25 %. Medžiagoms, kurių log P = 6, eliuoti per valandą, esant 1 ml/min. debitui, paprastai pakanka, kad metanolio ir vandens santykis mišinyje būtų 3:1 (tūriniais procentais). Kai medžiagos log P viršija 6, eliuavimo (taip pat ir etaloninių medžiagų) trukmę gali reikėti sutrumpinti sumažinant judančiosios fazės poliškumą arba sutrumpinant kolonėlę.
19. Bandomoji ir etaloninės medžiagos turi būti tirpios judančiojoje fazėje ir pakankamos koncentracijos, kad jas būtų galima aptikti. Į metanolio ir vandens mišinį priedų galima dėti tik išimtiniais atvejais, nes jie keičia kolonėlės savybes. Tokiais atvejais būtina įsitikinti, kad naudojami priedai nekeičia bandomosios medžiagos ir etaloninių medžiagų sulaukymo trukmės. Jeigu metanolio ir vandens mišinys netinka, galima naudoti kito organinio tirpiklio ir vandens (pvz., etanolio ir vandens, acetonitrilo ir vandens arba izopropilo alkoholio (2-propanolio) ir vandens) mišinį.
20. Eliuento pH vertė yra itin svarbi jonizuojamoms medžiagoms. Ji turėtų patekti į kolonėlei eksploatuoti tinkamą pH verčių intervalą (paprastai 2–8). Patartina naudoti buferinius tirpalus. Naudojant kai kuriuos organinės fazės ir buferinio tirpalo mišinius reikia saugotis, kad nesusidarytų druskų nuosėdų, ir nesugadinti kolonėlės. Paprastai nepatartina naudoti kvarcinių nuostoviųjų fazių HPLC matavimams tada, kai pH viršija 8, nes dėl naudojamos šarminės judančiosios fazės gali greitai pablogėti kolonėlės veikimas.

Tirpiniai

21. Bandomosios ir etaloninės medžiagos turi būti pakankamai grynos, kad chromatogramose būtų galima priskirti smalles atitinkamoms medžiagoms. Bandymui arba kalibravimui naudojamos medžiagos, kai įmanoma, ištirpinamos judančiojoje fazėje. Jeigu bandomoji ir etaloninės medžiagos tirpinamos ne judančiojoje fazėje, o kitame tirpiklyje, judančiąją fazę reikėtų naudoti galutiniam atskiedimui prieš išvirkščiant į kolonėlę.

Bandymo sąlygos

22. Temperatūra atliekant matavimą neturėtų svyruoti daugiau kaip ± 1 °C.

Laukimo trukmės t_0 nustatymas

23. Laukimo trukmę t_0 galima nustatyti naudojant tokias organines medžiagas, kurios nėra sulaikomos (pvz., tiokarbamidą arba formamidą). Laukimo trukmę tiksliau nustatyti galima pagal išmatuotą sulaikymo trukmę arba naudojant maždaug septynis homologinės eilės narius (pvz., n-alkilmetilketonus) (17). Sulaikymo trukmė $t_R(n_C + 1)$ grafike pavaizduojama kaip $t_R(n_C)$ funkcija; n_C yra anglies atomų skaičius. Gaunama tiesė $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A) t_0$; A šiuo atveju yra $k(n_C + 1)/k(n_C)$ atitinkanti konstanta. Laukimo trukmė t_0 nustatoma iš atkarpos $(1 - A)t_0$ ir krypties koeficiento A.

Regresijos lygtis

24. Tada sudaromas tinkamų etaloninių medžiagų, kurių $\log P$ vertės yra artimos numatomi bandomosios medžiagos $\log P$ vertei, $\log k$ ir $\log P$ santykio koreliacijos grafikas. Praktikoje vienu kartu išvirkščijama 6–10 etaloninių medžiagų ir nustatoma jų sulaikymo trukmė (geriausia tai padaryti įrašančiuoju integratoriumi, sujungtu su aptikimo sistema). Atitinkami sulaikymo gebos koeficientų logaritmai $\log k$ grafike pavaizduojami kaip $\log P$ funkcija. Siekiant atsižvelgti į galimus kolonėlės veikimo pokyčius, regresijos lygtis sudaroma reguliariais laiko intervalais, ne rečiau kaip kartą per dieną.

BANDOMOSIOS MEDŽIAGOS P_{ow} NUSTATYMAS

25. Išvirkščijamas kuo mažesnis bandomosios medžiagos kiekis – tik tiek, kad ją būtų įmanoma aptikti. Jos sulaikymo trukmė nustatoma matuojant du kartus. Bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientas gaunamas interpoliuojant apskaičiuotą sulaikymo gebos koeficientą kalibracinėje kreivėje. Kai pasiskirstymo koeficientai yra labai maži arba labai dideli, būtina atlikti ekstrapoliaciją. Tokiais atvejais ypač svarbu atkreipti dėmesį į regresijos tiesės pasiklivimo ribas. Jeigu ėminio sulaikymo trukmė nepatenka į nustatytą standartinių etaloninių medžiagų sulaikymo trukmės verčių intervalą, reikėtų nurodyti ribinę vertę.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**Bandymo ataskaita**

26. Ataskaitoje turi būti nurodyta:
- (jei nustatytas) preliminarus pasiskirstymo koeficiento įvertis, apskaičiuotos vertės ir pasirinktas metodas;
 - jei taikytas apskaičiavimo metodas – išsamus jo aprašymas, be kita ko, nurodant naudotą duomenų bazę ir pateikiant išsamią informaciją apie fragmentų pasirinkimą;
 - bandomoji medžiaga ir etaloninės medžiagos: jų grynumas, struktūrinė formulė ir CAS numeris;
 - naudotos įrangos ir darbo sąlygų aprašymas: analizės kolonėlė, apsauginė kolonėlė, judančioji fazė, aptikimo priemonės, temperatūros intervalas, pH;
 - eliuavimo profiliai (chromatogramos);
 - laukimo trukmė ir kaip ji nustatyta;
 - kalibravimui naudotų etaloninių medžiagų sulaikymo duomenys ir iš literatūros šaltinių gautos jų $\log P_{ow}$ vertės;
 - pritaikytos regresijos tiesės ($\log k$ pagal $\log P_{ow}$) duomenys ir jos koreliacijos koeficientas, įskaitant pasikliautinusius intervalus;
 - vidutiniai bandomosios medžiagos sulaikymo duomenys ir interpoliuota $\log P_{ow}$ vertė;
 - mišinio atveju – eliuavimo profilio chromatograma su nurodytomis ribomis;

- $\log P_{ow}$ vertės pagal $\log P_{ow}$ smailės procentinį plotą;
- apskaičiavimas naudojant regresijos tiesę;
- apskaičiuotas svertinis $\log P_{ow}$ verčių vidurkis, jei jis buvo apskaičiuotas.

NUORODOS

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

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

Priedėlis

P_{ow} apskaičiavimo metodai

ĮVADAS

1. Šiame priedėlyje pateiktas trumpas įvadas, kaip apskaičiuoti P_{ow}. Daugiau informacijos ieškokite literatūroje (1), (2).
2. Apskaičiuotos P_{ow} vertės naudojamos:
 - sprendžiant, kuri bandymo metodą taikyti: kai $\log P_{ow}$ yra nuo -2 iki 4, taikomas kratomos kolbos metodas, o kai $\log P_{ow}$ yra nuo 0 iki 6 – HPLC metodas;
 - nustatant, kokiomis sąlygomis reikėtų atlikti HPLC (etalonines medžiagas, metanolio ir vandens santykį);
 - tikrinant bandymo metodais gautų verčių patikimumą;
 - kai bandymo metodai netaikytini, tinkamam įverčiui nustatyti.

Apskaičiavimo metodų esmė

3. Šiame priedėlyje siūlomi apskaičiavimo metodai pagrįsti teoriniu molekulės dalijimu į atitinkamas mažesnes struktūras – fragmentus, kurių patikimi $\log P_{ow}$ dydžiai yra žinomi; $\log P_{ow}$ gaunamas sudedant tų fragmentų vertes ir intramolekulinių sąveikų pataisos dėmenis. Molekulių fragmentų konstantų ir pataisos dėmenų sąrašai paskelbti literatūroje (1), (2), (3), (4), (5), (6). Kai kurie iš jų reguliariai atnaujinami (3).

Apskaičiuotų verčių patikimumas

4. Apskritai kuo sudėtingesnė medžiaga tiriama, tuo mažiau galima pasikliauti apskaičiavimo metodais. Nesudėtingų, mažos molekulinės masės, tik vieną ar dvi funkcines grupes turinčių molekulių atveju tarp įvairiais fragmentavimo metodais gautų rezultatų ir matavimais nustatytų verčių galima tikėtis 0,1–0,3 $\log P_{ow}$ vieneto nuokrypio. Paklaidos dydis priklausys nuo taikomų fragmentų konstantų patikimumo, gebėjimo atpažinti intramolekulines sąveikas (pvz., vandenilio jungtis) ir tinkamo pataisos dėmenų naudojimo. Jonizuojamų medžiagų atveju būtina atsižvelgti į jonų krūvį ir jonizacijos laipsnį (10).

Fujita-Hansch π metodas

5. Fujita *et al.* (7) nustatyta hidrofobinio pakaito darinio konstanta π apibūdinama taip:

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

Šioje formulėje PhX yra aromatinis darinys, o PhH – pradinė medžiaga,

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

Šis π metodas visų pirma taikomas aromatiniams medžiagoms. Daugelio pakaitų π vertės pateiktos literatūroje (4), (5).

Rekker metodas

6. Pagal Rekker metodą (8) $\log P_{ow}$ vertė apskaičiuojama taip:

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

Šioje formulėje a_i yra tam tikro fragmento pasikartojimų molekulėje skaičius, o f_i – to fragmento $\log P_{ow}$ inkrementinis dydis. Sąveikos dėmenys gali būti išreiškiami kaip vienos atskiros konstantos C_m (vadinamosios „magiškosios konstantos“) sveikasis kartotinis. Fragmentų konstantos f_i ir C_m nustatytos iš 1 054 eksperimentinių P_{ow} verčių (825 medžiagų) sąrašo, atlikus daugianarę regresinę analizę (6), (8). Sąveikos dėmenys nustatomi pagal konkrečias taisykles (6), (8), (9).

Hansch-Leo metodas

7. Pagal Hansch ir Leo metodą (4) $\log P_{ow}$ vertė apskaičiuojama taip:

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

Šioje formulėje f_i yra fragmento konstanta, F_j – pataisos dėmuo (faktorius), a_i ir b_j – atitinkamas kartojimosi dažnis. Atomų ir grupių fragmentinių verčių ir pataisos dėmenų F_j sąrašai sudaryti pagal bandymų ir klaidų metodą naudojant eksperimentines P_{ow} vertes. Pataisos dėmenys suskirstyti į kelias klases (1), (4). Sukurta speciali programinė įranga padeda dirbant atsižvelgti į visas taisykles ir pataisos dėmenis (3).

MIŠRUSIS METODAS

8. Sudėtingų molekulių $\log P_{ow}$ galima kur kas tiksliau apskaičiuoti dalijant molekulę į didesnes struktūrines dalis, kurių patikimos $\log P_{ow}$ vertės yra nurodytos lentelėse (3), (4) arba nustatytos matavimais. Tada tokių fragmentų (pvz., heterociklų, antrachinono, azobenzeno) vertes galima derinti su vertėmis, gautomis pagal Hansch π metodą, arba su Rekker ar Leo metodo fragmentų konstantomis.

Pastabos

- i) Apskaičiavimo metodai taikytini tik iš dalies arba visiškai jonizuotoms medžiagoms, atsižvelgiant į būtinus pataisos faktorius.
- ii) Jei galima tikėtis esant intramolekulinių vandenilinių jungčių, būtina pridėti atitinkamus pataisos dėmenis (maždaug nuo +0,6 iki +1,0 $\log P_{ow}$ vieneto) (1). Tokių jungčių buvimą galima nustatyti naudojant erdvinius modelius arba spektroskopinius duomenis.
- iii) Jeigu yra kelios galimos tautomerinės formos, skaičiavimus reikėtų atlikti naudojant labiausiai tikėtiną formą.
- iv) Reikėtų atidžiai sekti fragmentų konstantų sąrašų keitimus.

NUORODOS APIE APSKAIČIAVIMO METODUS

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

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

3) C.3 skyrius pakeičiamas taip:

„C.3. GĖLAVANDENIŲ DUMBLIŲ IR MELSVABAKTERIŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 201 (2006 m., priedas pataisytas 2011 m.). Nustatyta, kad šį bandymo metodą reikėtų taikyti tam tikroms papildomoms rūšims ir atnaujinti, kad jis atitiktų cheminių medžiagų pavojingumo vertinimo ir klasifikacijos reikalavimus. Šis pakeitimas atliktas remiantis gausia sukaupta praktine patirtimi, cheminių medžiagų toksiškumo dumbliams tyrimų srities mokslo pažanga ir tuo, kad iš pradžių patvirtinus šį metodą, jis pradėtas plačiai taikyti reglamentavimo reikmėms.
2. Vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

3. Šio bandymo paskirtis – nustatyti cheminės medžiagos poveikį gėlavandenių mikrodumблиų ir (arba) melsvabakterių augimui. Eksponentiškai augantys bandomieji organizmai atskiromis partijomis paruoštos kultūrose yra paprastai 72 valandas veikiami bandomosios cheminės medžiagos. Nors bandymo trukmė gana trumpa, per jį galima įvertinti poveikį kelioms organizmų kartoms.
4. Sisteminis atsakas į poveikį yra dumblių kultūrų (bandymo vienetų) serijos, veikiamos įvairių koncentracijų bandomosios cheminės medžiagos, augimo sulėtėjimas. Šis atsakas vertinamas kaip bandomosios medžiagos koncentracijos funkcija tos medžiagos poveikio nepatyrusių kontrolinių kultūrų vidutinio augimo kartotiniuose bandiniuose atžvilgiu. Siekiant, kad visapusiškai pasireikštų sisteminis atsakas į toksinį poveikį (optimalusis jautris), organizmų kultūros turėtų pakankamai ilgą laiko tarpą nevaržomai eksponentiškai augti nestokodamos mitybinių medžiagų ir nuolatinio apšvietimo sąlygomis, po to išmatuojant savitojo augimo greičio sumažėjimą.
5. Augimas ir augimo slopinimas kiekybiškai nustatomi matuojant dumblių biomasės pokyčius laike. Dumblių biomasė išreiškiama sausosios medžiagos mase tūrio vienetui, pvz., kiek miligramų dumblių yra viename bandymo tirpalo litre. Kadangi sausosios medžiagos masę matuoti sunku, vietoj jos naudojami pakaitiniai parametrai. Iš jų dažniausiai pasirenkamas ląstelių skaičius; kiti pakaitiniai parametrai yra ląstelių tūris, fluorescencija, optinis tankis ir t. t. Turėtų būti žinomas išmatuoto pakaitinio parametro perskaičiavimo į biomasę koeficientas.
6. Bandymo vertinamoji baigtis yra augimo slopinimas, išreiškiamas kaip biomasės didėjimo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu logaritminis dydis (vidutinis savitasis augimo greitis). Pagal vidutinius savituosius augimo greičius, išmatuotus naudojant bandymo tirpalų seriją, nustatoma konkretų procentinį augimo greičio sumažėjimą $x\%$ (pvz., 50 %) sukelianti bandomosios medžiagos koncentracija, kuri išreiškiama E_xC_x (pvz., E_xC_{50}).
7. Taikant šį bandymo metodą naudojamas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kurią gali reikėti nustatyti pagal kai kurių valstybių konkrečius norminius reikalavimus. Išeiga apibrėžiama kaip biomasės skirtumas, atsiradęs nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios iki pabaigos. Pagal išeigą, nustatytą naudojant bandymo tirpalų seriją, apskaičiuojama konkretų procentinį išeigos sumažėjimą $x\%$ (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).

8. Taip pat galima statistiškai nustatyti mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

9. Nustatant bandymo sąlygas gali būti naudinga žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą: jos struktūrinę formulę, grynumą, patvarumą veikiant šviesai, patvarumą bandymo sąlygomis, šviesos sugerties savybes, pKa ir virsmo tyrimų rezultatus, įskaitant biologinį skaidumą vandenyje.
10. Reikėtų žinoti bandomosios medžiagos tirpumą vandenyje, oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą (P_{ow}) ir garų slėgį; turėtų būti taikomas patvirtintas metodas tos medžiagos kiekiui bandymo tirpaluose nustatyti, žinant jos regeneravimo našumą ir aptikimo ribą.

BANDYMO TINKAMUMAS

11. Tinkamas bandymas turėtų atitikti šiuos veiksmingumo kriterijus:
- per 72 val. bandymo laikotarpį kontrolinių kultūrų biomasė turėtų eksponentiškai padidėti bent 16 kartų; tai atitinka savitąjį augimo greitį $0,92 \text{ para}^{-1}$. Bandymams dažniausiai naudojamų rūšių organizmai paprastai auga kur kas greičiau (žr. 2 priedėlį). Bandymas gali neatitikti šio kriterijaus, kai pasirinktos rūšies organizmai auga lėčiau negu 2 priedėlyje išvardytų rūšių organizmai. Tokiu atveju bandymo laikotarpį reikėtų pratęsti iki tol, kol kontrolinės kultūros padidės bent 16 kartų; augimas turi būti eksponentinis per visą bandymo laikotarpį. Jeigu reikiamas padidėjimo koeficientas – 16 kartų – pasiekiamas greičiau, bandymo laikotarpį galima sutrumpinti (minimali trukmė yra 48 val.), palaikant neribotą, eksponentinį augimą per visą bandymą;
 - kontrolinių kultūrų savitųjų augimo greičių atskirais laiko tarpais (0–1, 1–2 ir 2–3 paros per 72 val. trukmės bandymą) vidutinis variacijos koeficientas (žr. variacijos koeficiento apibrėžtį 1 priedėlyje) neturi viršyti 35 %. Kaip apskaičiuoti savitąjį augimo greitį atskirais laiko tarpais per bandymą, nurodyta 49 skirsnyje. Šis kriterijus taikomas vidutinei variacijos koeficientų, apskaičiuotų naudojant kontrolines kultūras kartotiniuose bandiniuose, vertei;
 - bandymams naudojant *Pseudokirchneriella subcapitata* ir *Desmodesmus subspicatus*, kartotinių bandinių kontrolinių kultūrų vidutinių savitųjų augimo greičių visu bandymo laikotarpiu variacijos koeficientas neturi viršyti 7 %; bandymui naudojant kitas, mažiau įprastas rūšis, ši vertė neturėtų viršyti 10 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

12. Bandymo procedūrai patikrinti galima atlikti bandymą su etalonine chemine medžiaga arba medžiagomis, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, kuris naudotas per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (1). Atliekant bandymus su žaliadumbliais, kaip etaloninę cheminę medžiagą taip pat galima naudoti kalio dichromatą. Etaloninės cheminės medžiagos bandymus patartina atlikti bent dukart per metus.

BANDYMO TAIKOMUMAS

13. Šį bandymo metodą lengviausia taikyti vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis paprastai lieka vandenyje. Bandymams naudojant lakias, lengvai išsigeriančias (adsorbuojamas), spalvingas, vandenyje mažai tirpias chemines medžiagas arba medžiagas, kurios gali paveikti mitybinių arba mineralinių medžiagų įsisavinimą iš bandymo terpės, gali reikėti atitinkamai pakeisti aprašytą bandymo procedūrą (pvz., bandymą atlikti uždaroje sistemoje, kondicionuoti bandymo indus). Rekomendacijų dėl kai kurių tinkamų pakeitimų pateikta literatūroje (2), (3), (4).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

14. Bandymo indai ir kita aparatūra, su kuria liečiasi bandymo tirpalai, turėtų būti pagaminti tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Bandymo reikmenys turėtų būti kruopščiai plaunami, taip užtikrinant, kad dumblių augimo ar bandymo tirpalų sudėties nepaveiktų jokie organiniai ar neorganiniai teršalai.

15. Įprasti bandymo indai yra stiklinės kolbos – tokių matmenų, kad pakaktų bandomųjų organizmų kultūros tūriui išmatuoti per bandymą ir į jas patektų pakankama anglies dioksido masė iš aplinkos oro (žr. 30 skirsnį). Atminkite, kad skysčio tūris turi būti pakankamas analiziniams nustatymams (žr. 37 skirsnį).
16. Be to, per bandymą gali reikėti kai kurių arba visų toliau išvardytų įrenginių.
- Kultūros auginimo aparatūra. Rekomenduojama naudoti spintą arba kamerą, kurioje būtų galima $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ tikslumu palaikyti pasirinktą inkubacijos temperatūrą.
 - Apšvietimo matavimo prietaisai. Svarbu pažymėti, kad matuojamos vertės gali priklausyti nuo šviesos stiprio matavimo metodo ir ypač jutiklio (kolektoriaus) tipo. Matavimus patartina atlikti naudojant sferinį (4π) jutiklį (reaguojantį į tiesioginę ir atspindėtą šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) arba 2π jutiklį (reaguojantį į šviesą, krintančią visais kampais virš matavimo plokštumos).
 - Aparatūra dumblių biomasėi matuoti. Įprasčiausias dumblių biomasės pakaitinis parametras – ląstelių skaičius – gali būti nustatomas elektroniniu dalelių skaitikliu, mikroskopu su skaičiavimo kamera arba tėkmės citometru. Kiti pakaitiniai parametrai vietoj biomasės gali būti matuojami tėkmės citometru, fluorimetru, spektrofotometru arba kolorimetru. Pravartu nustatyti perskaičiavimo koeficientą, pagal kurį iš ląstelių skaičiaus nustatoma sausosios medžiagos masė. Siekiant atlikti naudingus matavimus spektrofotometru esant mažoms biomasės koncentracijoms, gali reikėti naudoti kiuvetes, kurių šviesos kelio ilgis būtų bent 4 cm.

Bandomieji organizmai

17. Bandymui galima naudoti kelių rūšių nepritvirtintus mikrodumblis ir melsvabakteres. Pagal nustatytą šio bandymo metodo procedūrą tinka naudoti 2 priedėlyje išvardytas patvirtintas padermes.
18. Jeigu naudojami kitų rūšių dumbliai, bandymo ataskaitoje turėtų būti nurodyta jų padermė ir arba (kilnė). Įsitikinkite, kad bandymui pasirinktų dumblių eksponentinį augimą pagrindinėmis bandymo sąlygomis bus galima užtikrinti per visą bandymo laikotarpį.

Auginimo terpė

19. Rekomenduojama rinktis vieną iš dviejų auginimo terpių – EBPO siūlomą terpę arba JAV aplinkos apsaugos agentūros AAP (angl. *algal assay procedure*) terpę; šių terpių sudėtis parodyta 3 priedėlyje. Įsidėmėtina, kad skiriasi abiejų terpių pradinė pH vertė ir buferinė talpa (pH didėjimui reguliuoti). Todėl bandymų rezultatai gali skirtis dėl naudojamos terpės, ypač atliekant jonizuojamų cheminių medžiagų bandymus.
20. Auginimo terpes tam tikrais atvejais gali reikėti modifikuoti, pvz., atliekant metalų ir kompleksų (chelantų) bandymus arba bandymus esant skirtingoms pH vėrtėms. Modifikuotos terpės naudojimas turėtų būti išsamiai aprašytas ir pagrįstas (3), (4).

Pradinė biomasės koncentracija

21. Visų bandomųjų kultūrų biomasės pradinis kiekis turi būti vienodas ir pakankamai mažas, kad būtų įmanomas eksponentinis augimas per visą inkubacinį periodą nerizikuojant, kad pritrūks mitybinių medžiagų. Pradinis biomasės kiekis (sausosios medžiagos masė) neturėtų viršyti 0,5 mg/l. Rekomenduojama pradinė ląstelių koncentracija:

Pseudokirchneriella subcapitata 5×10^3 – 10^4 ląstelių/ml

Desmodesmus subspicatus 2 – 5×10^3 ląstelių/ml

Navicula pelliculosa 10^4 ląstelių/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 ląstelių/ml

Synechococcus leopoliensis 5×10^4 – 10^5 ląstelių/ml

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos

22. Tikėtiną poveikį sukeliančių cheminės medžiagos koncentracijų intervalą galima nustatyti remiantis intervalo nustatymo bandymų rezultatais. Atliekant galutinį nustatomąjį bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija, kurios daugiklis neviršytų 3,2. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir atsako kreivė yra gulsčia, gali būti pagrįsta rinktis didesnę daugiklį. Patartina, kad pasirinktų koncentracijos verčių eilutė apimtų intervalą, kuriam esant dumblių augimo greitis slopinamas 5–75 %.

Kartotiniai ir kontroliniai bandiniai

23. Bandymo plane turėtų būti numatyta paruošti po tris kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius. Jeigu nereikia nustatyti NOEC, bandymo planą galima keisti – padidinti koncentracijų skaičių ir sumažinti kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių. Kontrolinių kartotinių bandinių turi būti ne mažiau kaip trys. Geriausia, kad jų būtų dukart daugiau negu kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinių bandinių.
24. Galima paruošti atskirą bandymo tirpalų rinkinį bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų analiziniams nustatymams (žr. 36 ir 38 skirsnius).
25. Kai bandomajai cheminei medžiagai soliubilizuoti naudojamas tirpiklis, į bandymo planą būtina įtraukti papildomus kontrolinius bandinius su tuo tirpikliu, kurio koncentracija būtų tokia pati, kaip ir bandomųjų kultūrų induose.

Sėjamos kultūros paruošimas

26. Siekiant pripratinti bandymui naudojamus dumblius prie bandymo sąlygų ir užtikrinti, kad dumbliai į bandymo tirpalus būtų sėjami per jų eksponentinio augimo tarpsnį, sėjama kultūra bandymo terpėje paruošiama iki bandymo pradžios likus 2–4 dienoms. Dumblių biomasė turėtų būti tvarkoma taip, kad sėjamos kultūros augimas iki bandymo pradžios būtų iš esmės eksponentinis. Sėjama kultūra turėtų būti inkubuojama tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir bandomosios kultūros. Sėjamos kultūros biomasės didėjimą reikėtų matuoti, siekiant įsitikinti, kad jos augimas atitinka normalų tai bandomajai padermei būdingą intervalą kultūros auginimo sąlygomis. Dumblių kultūrų auginimo procedūros pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Siekiant išvengti vienalaikio ląstelių dalijimosi per bandymą, gali reikėti palaukti, kol sėjamos kultūros organizmai pasidaugins antrą kartą.

Bandymo tirpalų ruošimas

27. Auginimo terpės ir pradinės bandymui naudojamų dumblių biomasės koncentracijos turi būti vienodos visuose bandymo tirpaluose. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai paprastai ruošiami sumaišant bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą su auginimo terpe ir sėjama kultūra. Pradiniai tirpalai paprastai ruošiami ištirpinant cheminę medžiagą bandymo terpėje.
28. Galima naudoti tirpiklius, pvz., acetoną, tret-butilo alkoholį ir dimetilformamidą, kaip nešiklius vandenyje mažai tirpioms cheminėms medžiagoms įmaišyti į bandymo terpę (2), (3). Tirpiklio koncentracija neturėtų viršyti 100 µl/l. Tos pačios koncentracijos tirpiklio turėtų būti dedama į visų bandymo serijos kultūrų (įskaitant kontrolines kultūras) indus.

Inkubacija

29. Bandymo indai užkemšami pralaidžiais orui kamščiais, sukratomi ir dedami į kultūros auginimo aparatą. Dumbliai per visą bandymą turi būti suspenduoti ir juos turi lengvai pasiekti anglies dioksidas, todėl indus reikėtų dažnai sukratyti arba pamaišyti. Bandomųjų kultūrų laikymo temperatūra turėtų būti 21–24 °C, reguliuojama ± 2 °C tikslumu. Jeigu naudojami 2 priedėlyje nenurodytų, pvz., tropinių rūšių organizmai, galbūt tiktų juos laikyti aukštesnėje temperatūroje, su sąlyga, kad nebūtų nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų. Bandymo kolbas patartina atsitiktine tvarka sudėti į inkubatorių ir kasdien sukeisti jas vietomis.
30. Kontrolinių bandinių terpės pH per bandymą neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto. Atliekant bandymą su metalais ir cheminėmis medžiagomis, kurios iš dalies jonizuojasi, kai pH lygis yra artimas bandymo pH, gali reikėti riboti pH kitimą, kad būtų gauti atkuriami ir tikslūs bandymo rezultatai. Techniškai įmanoma pasiekti, kad pH vertė pakistų mažiau kaip 0,5 vieneto, užtikrinant tinkamą CO₂ masės patekimo iš aplinkos oro į bandomąjį tirpalą spartą, pvz., dažniau pakratan indą. Taip pat galima mažinti CO₂ suvartojimą, sumažinant pradinės biomasės kiekį ar bandymo trukmę.

31. Paviršius, ant kurio inkubuojamos kultūros, turėtų būti nuolat ir vienodai apšviestas liuminescencinėmis, pvz., šaltai baltos arba dienos šviesos lempomis. Dumblių ir melsvabakterių padermėms šviesos reikia nevienodai. Šviesos stipris turėtų būti pritaikytas naudojamiems bandomiesiems organizmams. Rekomenduojamų rūšių žaliadumbliams tinkamas šviesos stipris bandymo tirpalų lygiu yra $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, matuojant tinkamu jutikliu esant fotosintzei optimaliam $400\text{--}700 \text{ nm}$ bangų ilgio intervalui. Kai kurios rūšys, ypač *Anabaena flos-aquae*, gerai auga esant ne tokiai stipriai šviesai; labai intensyvi šviesa gali joms pakenkti. Vidutinis šviesos stipris tokioms rūšims turėtų būti nuo 40 iki $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (jeigu apšvietimo matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, $4\,440\text{--}8\,880 \text{ lx}$ apšvietimas šaltai balta šviesa maždaug atitinka rekomenduojamą $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ šviesos stiprį). Šviesos stipris neturi kisti daugiau kaip $\pm 15 \%$ vidutinio šviesos, kuria apšviečiama inkubavimo vieta, stiprio.

Bandymo trukmė

32. Įprasta bandymo trukmė – 72 val., tačiau visus 11 skirsnyje nurodytus tinkamumo kriterijus atitinkantis bandymas gali trukti ir trumpesnę arba ilgesnę laiko tarpą.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

33. Dumblių biomasę kiekvienoje kolboje matuojama bent kartą per dieną per visą bandymo laikotarpį. Jeigu matavimai atliekami naudojant mažus biomasės kiekius, iš bandymo tirpalo ištrauktus pipete, po to biomasės papildyti nereikia.
34. Biomasės matavimai atliekami rankiniu būdu suskaičiuojant ląsteles per mikroskopą arba naudojant elektroninį dalelių skaitiklį (nustatant ląstelių skaičių ir (arba) biologinį tūrį). Galima taikyti ir kitus metodus, pvz., srovinę citometriją, *in vitro* arba *in vivo* chlorofilo fluorescenciją (5), (6) arba optinio tankio matavimą, jei galima įrodyti pakankamą koreliaciją su biomase, atitinkančia bandymui naudojamos biomasės intervalą.
35. Tirpalų pH turi būti išmatuotas pradedant ir baigiant bandymą.
36. Jeigu yra analizės procedūra, tinkama bandomajai cheminei medžiagai pasirinktame koncentracijų intervale nustatyti, reikėtų išanalizuoti bandymo tirpalus, siekiant patikrinti pradinės jų koncentracijas ir per visą bandymą palaikyti poveikiui reikalingas koncentracijas.
37. Atliekant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos analizę bandymo pradžioje ir pabaigoje, gali pakakti išanalizuoti tik vieną mažą ir vieną didelę bandymui pasirinktas koncentracijas ir numatomą EC_{50} vertę apytikriai atitinkančią koncentraciją, jeigu tikėtina, kad tos medžiagos efektyviosios koncentracijos per bandymą pakis mažiau kaip 20% vardinį verčių. Jeigu manoma, jog koncentracijos pasikeis tiek, kad nebepateks į $80\text{--}120 \%$ vardinės koncentracijos intervalą, patartina pradedant ir baigiant bandymą atlikti visų bandymui pasirinktų koncentracijų analizę. Kai bandomosios cheminės medžiagos yra lakios, nepatvarios arba lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos), jų veikimo laikotarpiu rekomenduojama kas 24 val. imti papildomus pavyzdžius analizei, kad būtų galima tiksliau nustatyti, koks bandomosios medžiagos kiekis prarastas. Gali reikėti paruošti papildomų kartotinių bandinių su šiomis cheminėmis medžiagomis. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas visais atvejais reikia nustatyti tik viename kartotiniame bandymui pasirinktos koncentracijos inde (arba analizuojant sujungtą kartotinio bandinio indų turinį).
38. Bandymo terpės, specialiai ruošiamos efektyviosioms koncentracijoms per bandymą analizuoti, turėtų būti apdorojamos taip pat, kaip ir bandymui naudojamos terpės, t. y. į jas pasėjami dumbliai ir sudaromos tokios pačios inkubacijos sąlygos. Jeigu reikia išanalizuoti ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, gali reikėti dumblius atskirti nuo terpės. Patartina juos atskirti centrifuguojant, nustačius mažą perkrovos jėgą – tik tiek, kiek reikia dumbliams nusodinti.
39. Jeigu yra įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją per visą bandymą pavyko išlaikyti nepakitusią daugiau kaip $\pm 20 \%$ vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatus galima analizuoti remiantis vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jeigu nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos nukrypa daugiau kaip $\pm 20 \%$, rezultatus reikėtų analizuoti remiantis efektyviųjų koncentracijų geometriniu vidurkiu arba modeliais, kuriais parodytas bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimas (3), (7).
40. Dumblių augimo slopinimo bandymo sistema yra dinamiškesnė nei daugelio kitų trumpalaikių toksiškumo vandens organizmams bandymų, todėl gali būti sunku nustatyti faktines efektyviasias koncentracijas, ypač

lengvai išsigeriančių (adsorbuojamų) cheminių medžiagų, bandomų mažomis koncentracijomis. Tokiais atvejais bandomosios cheminės medžiagos dingimas iš tirpalo, jai išsigeriant į augančios dumblių biomasės paviršių, nereiškia, kad jos nebėra bandymo sistemoje. Analizuojant bandymo rezultatus, reikėtų patikrinti, ar per bandymą sumažėjus bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, kartu sumažėjo dumblių augimo slopinimas. Jeigu taip, galima apsvarstyti, kaip reikėtų parodyti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimą taikant tinkamą modelį (7), o jeigu ne, rezultatų analizę galbūt reikėtų pagrįsti pradinėmis (vardinėmis arba išmatuotomis) koncentracijos vertėmis.

Kiti stebėjimai

41. Reikėtų per mikroskopą apžiūrėti sėjamą kultūrą, siekiant įsitikinti, kad ji yra normalios ir sveikos išvaizdos, ir pastebėti bet kokius neįprastus dumblių išvaizdos pakitimus (galėjusius atsirasti veikiant bandomajai cheminei medžiagai) bandymo pabaigoje.

Ribų nustatymo bandymas

42. Tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jeigu išankstinis bandymas parodo, kad bandomoji cheminė medžiaga neturi toksinio poveikio, kol jos koncentracija nesiekia 100 mg/l arba tirpumo bandymo terpėje ribos (mažesnės iš šių verčių), galima atlikti ribų nustatymo bandymą, palyginant kontrolinės grupės ir vienos bandomosios (100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos) grupės atsaką į poveikį. Taip gautus rezultatus labai patartina patvirtinti atliekant efektyviosios koncentracijos analizę. Ribų nustatymo bandymas turi atitikti visas pirmiau aprašytas bandymo sąlygas ir tinkamumo kriterijus, tačiau kartotiniai bandiniai su bandomąja medžiaga turėtų būti ne mažiau kaip šeši. Kontrolinės ir bandomosios grupių atsako kintamuosius galima analizuoti taikant statistinį kriterijų vidurkiams palyginti, pvz., Stjudento t kriterijų. Jeigu abiejų grupių dispersijos yra nelygios, analizę reikėtų atlikti taikant nelygioms dispersijoms pritaikytą t kriterijų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Augimo kreivių braižymas

43. Bandymo induose esančią biomasę galima išreikšti matavimui naudojamų pakaitinių parametrų (pvz., ląstelių skaičiaus, fluorescencijos) vienetais.
44. Rengiant augimo kreivių grafikus, į lenteles surašomos įvertintos bandomųjų ir kontrolinių kultūrų biomasės koncentracijos vertės, bandomosios medžiagos koncentracijos vertės ir matavimo laikas, skaičiuojamas bent valandos tikslumu. Šiame pirmajame etape galima naudoti tiek logaritminių, tiek linijinių parametrų skales, tačiau logaritminės skales naudoti būtina ir pagal jas paprastai geriau pavaizduojami organizmų augimo pokyčiai per bandymo laikotarpį. Įsidėmėtina, kad eksponentinis augimas logaritminėse koordinatėse vaizduojamas tiese, kurios nuolydis (krypties koeficientas) rodo savitąjį augimo greitį.
45. Naudodami grafikus patikrinkite, ar kontrolinės kultūros per visą bandymą eksponentiškai augo numatytu greičiu. Kitiškai įvertinkite visus duomenų taškus ir apžiūrėkite grafikus, patikrinkite neapdorotus duomenis ir procedūras, ar nėra klaidų. Ypač atidžiai tikrinkite kiekvieną duomenų tašką, kuris atrodo pasislinkęs dėl sistemingosios paklaidos. Jeigu akivaizdžiai yra ir (arba) labai tikėtina, kad yra procedūros klaidų, atitinkamas duomenų taškas pažymimas kaip riktas ir neįtraukiamas vėliau atliekant statistinę analizę (jeigu dumblių koncentracijos vertė viename iš dviejų ar trijų kartotinių indų yra lygi nuliui, tai gali reikšti, kad tame inde nebuvo tinkamai pasėti dumbliai arba indas buvo nepakankamai išvalytas). Bandymo ataskaitoje aiškiai nurodykite, dėl kokių priežasčių tam tikri duomenų taškai atmeti kaip riktai; tik (retai pasitaikančios) procedūros klaidos, o ne preciziškumo trūkumas, yra pateisinama priežastis. Statistinės riktų nustatymo procedūros tik iš dalies padeda išspręsti šią problemą ir negali atstoti ekspertų vertinimo. Riktus (atitinkamai juos pažymėjus) geriausia palikti tarp kitų duomenų taškų, vėliau kokia nors forma pateikiamų kaip grafikų arba lentelių duomenys.

Atsako kintamieji

46. Bandymo paskirtis – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį dumblių augimui. Pagal šį bandymo metodą apibūdinami du atsako kintamieji, nes įvairiose jurisdikcijose skiriasi prioritetai ir norminiai reikalavimai. Siekiant, kad bandymo rezultatai būtų priimtini visose jurisdikcijose, poveikį reikėtų vertinti taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius a ir b :
 - a) vidutinis savitasis augimo greitis. Šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal logaritmą biomasės didėjimą (per parą) bandymo laikotarpiu;
 - b) išeiga – atsako kintamasis, reiškiantis biomasės skirtumą, atsiradusį nuo bandymo pradžios iki pabaigos.

47. Pažymėtina, kad taikant šiuos du atsako kintamuosius apskaičiuotos toksiškumo vertės nėra lygintinos tarpusavyje ir jų skirtumą būtina pripažinti naudojant bandymo rezultatus. Turint omenyje atitinkamų metodų matematinį pagrindą, jeigu laikomasi bandymo pagal šį metodą sąlygų, pagal vidutinį savitąjį augimo greitį nustatytos EC_x vertės ($E_r C_x$) paprastai yra didesnės negu išėiga pagrįsti rezultatai ($E_y C_x$). To nereikėtų suprasti kaip abiejų atsako kintamųjų jautrio skirtumo – tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka apibrėžta remiantis bendrąja eksponentinio dumblių augimo nevaržomose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas vertinamas pagal poveikį augimo greičiui, nepriklausomai nuo kontrolinės kultūros absoliučiojo savitojo augimo greičio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento ar bandymo trukmės. Kitu atsako kintamuoju – išėiga – pagrįsti rezultatai, priešingai, yra priklausomi nuo visų šių kitų kintamųjų. $E_y C_x$ vertė priklauso nuo kiekvienam bandymui naudojamos dumblių rūšies savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris įvairių rūšių ir net atskirų dumblių padermių gali būti skirtingas. Šio atsako kintamojo nereikėtų naudoti lyginant kelių dumblių rūšių ar net atskirų padermių jautrį nuodingosioms medžiagoms. Nors toksiškumui vertinti moksliniu požiūriu labiau tinka vidutinis savitasis augimo greitis, pagal šį bandymo metodą numatyta naudoti ir išėiga pagrįstus toksiškumo įverčius, kurie yra privalomi pagal kai kuriose valstybėse galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.

Vidutinis augimo greitis

48. Vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu apskaičiuojamas kaip kiekvieno atskiro kontrolinių ir bandomųjų grupių indo biomasės logaritminis padidėjimas pagal lygtį [1]:

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

kurioje:

μ_{i-j} – yra vidutinis savitasis augimo greitis per laiko tarpą $i-j$;

X_i – biomasė i laiku;

X_j – biomasė j laiku.

Apskaičiuojama kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

49. Vidutinis savitasis augimo greitis per visą bandymo trukmę (paprastai 0–3 paras) apskaičiuojamas kaip pradinę vertę naudojant pasėtos biomasės kiekio vardinę vertę, o ne išmatuotą pradinę vertę, nes toks skaičiavimas paprastai yra tikslesnis. Jeigu mažą pasėlio biomasės kiekį galima pakankamai tiksliai nustatyti biomasei matuoti skirta įranga (pvz., tėkmės citometru), galima naudoti išmatuotą pradinę biomasės koncentraciją. Taip pat įvertinkite augimo greitį atskirais laiko tarpais, apskaičiuojamą kaip kiekvienos bandymo dienos (0–1, 1–2 ir 2–3 parų) savitasis augimo greitis, ir ištyrkite, ar kontrolinių bandinių augimo greitis tebėra tolygus (žr. tinkamumo kriterijus 11 skirsnyje). Jeigu savitasis augimo greitis pirmąją parą yra kur kas mažesnis negu bendras vidutinis savitasis augimo greitis, tai gali reikšti latentinį periodą. Nors kontrolinių kultūrų latentinį periodą galima sutrumpinti arba visiškai panaikinti tinkamai pasėjant iš anksto paruoštą kultūrą, jeigu latentinį periodą patiria bandomosios medžiagos veikiamos kultūros, tai gali reikšti, kad jos atsigauna po pradinio toksinio streso arba iš pradžių patirtas bandomosios cheminės medžiagos poveikis vėliau susilpnėja netekus dalies jos kiekio (be kita ko, dėl gerties į dumblių biomasės paviršių). Taigi, augimo greitis atskirais laiko tarpais gali būti nustatomas siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį jos veikimo laikotarpiu. Jeigu tokie nustatyti augimo greičiai atskirais laiko tarpais reikšmingai skiriasi nuo vidutinio augimo greičio, tai rodo nuokrypį nuo tolygaus eksponentinio augimo ir reikia nuodugnai ištyti augimo kreives.
50. Apskaičiuokite augimo greičio procentinį slopinimą kiekviename kartotiniame bandinyje su bandomąja medžiaga pagal lygtį [2]:

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

kurioje:

$\%I_r$ – vidutinio savitojo augimo greičio sumažėjimas procentais;

μ_c – kontrolinės grupės vidutinio savitojo augimo greičio (μ) vidutinė vertė;

μ_T – vidutinis savitasis augimo greitis kartotiniame bandinyje su bandomąja medžiaga.

51. Kai ruošiant bandymo tirpalus naudojami tirpikliai, apskaičiuojant augimo slopinimo procentinį dydį reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinius bandinius, o ne kontrolinius bandinius be tirpiklių.

Išėiga

52. Išėiga apskaičiuojama kaip nuo bandymo pradžios iki pabaigos atsiradęs biomasės skirtumas kiekviename atskirame kontrolinių ir bandomųjų grupių inde. Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės išėigos vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio išėigos sumažėjimą procentais ($\%I_y$) galima apskaičiuoti pagal formulę

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

Šioje formulėje:

$\%I_y$ – išėigos sumažėjimas procentais;

Y_c – vidutinė kontrolinės grupės išėigos vertė;

Y_T – bandomosios grupės kartotinio bandinio išėigos vertė.

Koncentracijos ir atsako kreivės braižymas

53. Nubraižykite augimo slopinimo procentinio lygio ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmo grafiką ir nuodugnai jį išnagrinėkite, nekreipdami dėmesio į tuos duomenų taškus, kurie per pirmąjį etapą buvo pažymėti kaip riktai. Iš akies arba kompiuterinio interpoliavimo būdu nubrėžkite per duomenų taškus tolydžią liniją, kad gautumėte pradinę koncentracijos ir atsako santykio vaizdą. Tada taikykite išsamesnį, geriausia kompiuterinį statistinį, metodą. Priklausomai nuo numatomos duomenų paskirties, kokybės (preciziškumo) bei kiekio ir turimų duomenų analizės priemonių, galima (kartais labai pagrįstai) nuspręsti baigti duomenų analizę šiame etape ir tiesiog iš akies nubrėžtoje kreivėje rasti pagrindinius EC_{50} , EC_{10} ir (arba) EC_{20} dydžius (taip pat žr. tolesnį skirsnį, kuriame rašoma apie skatinamąjį poveikį). Statistinio metodo galima netaikyti dėl tokių pagrįstų priežasčių:

- apdorojant tuos duomenis kompiuterizuotais metodais gauti rezultatai nebūtų patikimesni negu ekspertų vertinimo rezultatai. Tokiais atvejais naudojant kai kurias kompiuterines programas gali net nepavykti gauti patikimo sprendinio (iteracijos gali nekonverguoti ir t. t.);
- turimomis kompiuterinėmis programomis neįmanoma tinkamai apdoroti atsako į augimo skatinimą duomenų (žr. toliau).

Statistinės procedūros

54. Tikslas yra kiekybiškai nustatyti koncentracijos ir atsako santykį atliekant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba Weibull vienetus (8), tačiau geriau atlikti procedūras netiesinės regresijos metodais, per kurias geriau apdorojami neišvengiami duomenų neatitikimai ir nukrypimai nuo glodžiuųjų skirstinių. Artėjant prie nulinio arba visiško augimo slopinimo, tokie neatitikimai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (8). Pažymėtina, kad standartiniai analizės metodai naudojant probito, logito arba Weibull transformuotus dydžius yra skirti dvireikšmiams (pvz., gaistamumo arba išgyvenimo) kintamiesiems, todėl norint naudoti juos augimo ar biomasės duomenims, būtina juos atitinkamai pritaikyti. Konkrečios EC_x verčių nustatymo iš tolydžiuųjų duomenų procedūros aprašytos literatūroje (9), (10), (11). Netiesinės regresijos analizės taikymas išsamiau aprašytas 5 priedėlyje.

55. Analizuodami kiekvieną atsako kintamąjį, remdamiesi koncentracijos ir atsako santykiu, apskaičiuokite EC_x verčių taškinius įverčius. Kai įmanoma, reikėtų nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasiklovimo ribas. Reikėtų pagal grafiką arba statistiškai įvertinti atsako duomenų atitiktį regresijos modeliui. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirų kartotinių bandinių atsakus, o ne visos bandomosios grupės vidutinės vertės. Tačiau jeigu netiesinę kreivę pritaikyti yra sunku arba neįmanoma dėl per didelės duomenų sklaidos, šią problemą galima apeiti atliekant nustatytų grupės vidutinių verčių regresiją – taip praktiškai sumažinama spėjamų riktų įtaka. Pasirinkus šį būdą, bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti, kad nukrypta nuo įprastos procedūros, nes pritaikant kreivę atskiriems kartotiniams bandiniams nebuvo gauta tinkamo rezultato.
56. Be to, jeigu esami regresijos modeliai ir (arba) metodai netinka turimiems duomenims, EC_{50} įverčius ir pasiklovimo ribas taip pat galima gauti atliekant tiesinę interpoliaciją su saviranka (angl. *bootstrapping*) (13).
57. Vertinant bandomosios cheminės medžiagos poveikio augimo greičiui LOEC, taigi ir NOEC, būtina palyginti bandomosios grupės vidutinės vertės taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Taip gautą kiekvienos koncentracijos grupės vidurkį reikia palyginti su kontrolinės grupės vidurkiu taikant tinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudinga taikyti Dunnett arba Williams kriterijų (12), (14), (15), (16), (17). Būtina įvertinti, ar tinka ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį vertinimą galima atlikti naudojant grafiką arba taikant formalųjį kriterijų (17). Tinka taikyti Levene arba Bartlett kriterijus. Jeigu netinka dispersijų vienalytiškumo prielaida, kartais galima tai pataisyti logaritmine duomenų transformacija. Jei dispersija yra itin nevienalytė ir to neįmanoma pataisyti transformuojant duomenis, reikėtų apsvarstyti galimybę atlikti analizę kitais metodais, pvz., taikant laipsninio mažinimo *Jonkheere trend* kriterijus. Papildomų rekomendacijų, kaip nustatyti NOEC, pateikta literatūroje (11).
58. Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus, rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir vietoj jos naudoti regresiją pagrįstus EC_x taškinius įverčius. Pagal šį dumblių bandymo metodą tinkama x vertė nenustatyta, tačiau atrodo, kad tinka į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (kuri priklauso nuo pasirinkto atsako kintamojo). Ataskaitoje geriausia nurodyti abi (EC_{10} ir EC_{20}) vertes.

Augimo skatinimas

59. Esant nedidelėms bandomųjų medžiagų koncentracijoms, kartais pastebima, kad jos skatina bandomųjų organizmų augimą (tai vadinama neigiamu slopinimu). Šio reiškinio priežastis gali būti hormezė („toksinis skatinimas“) arba tai, kad kartu su bandomąja medžiaga į naudojamą minimalią terpę pridėta augimo skatinimo veiksnių. Pažymėtina, kad neorganinių mitybinių medžiagų pateikimas į terpę neturėtų turėti jokio tiesioginio poveikio organizmams, nes bandymo terpėje per visą bandymo laiką turėtų būti palaikomas mitybinių medžiagų perteklius. Į mažų dozių sukeltą skatinamąjį poveikį paprastai galima nekreipti dėmesio apskaičiuojant EC_{50} , jeigu jis nėra labai didelis. Tačiau jeigu toks poveikis yra itin didelis arba reikia apskaičiuoti EC_x vertę, kai x yra mažas, gali reikėti specialių procedūrų. Kai įmanoma, organizmų atsaką į skatinamąjį poveikį reikėtų įtraukti atliekant duomenų analizę, o jeigu naudojant turimą kreivių pritaikymo programinę įrangą į nedidelį skatinamąjį poveikį atsižvelgti neįmanoma, galima taikyti tiesinę interpoliaciją su saviranka. Jeigu skatinamasis poveikis itin didelis, galbūt tiktų taikyti hormezės modelį (18).

Netoksinis augimo slopinimas

60. Kai bandomosios medžiagos sugeria šviesą, organizmų augimas gali sulėtėti dėl tamsinimo sumažėjus gaunamam šviesos kiekiui. Tokių fizinių reiškinių poveikį reikėtų skirti nuo toksinio poveikio, atitinkamai pakeičiant bandymo sąlygas, ir ataskaitoje jį reikėtų aprašyti atskirai. Rekomendacijų pateikta literatūroje (2), (3).

BANDYMO ATASKAITA

61. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- Medžiagos fizikinė prigimtis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant tirpumo vandenyje ribą.
- Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (pvz., CAS numeris), įskaitant grynumą (priemaišas).

Bandomosios rūšys

- Pasirinkta padermė, tiekėjas arba šaltinis ir kultūros auginimo sąlygos.

Bandymo sąlygos

- Bandymo pradžios data ir trukmė.
- Bandymo plano aprašymas: naudojami bandymo indai, kultūrų tūriai, biomasės tankis bandymo pradžioje.
- Terpės sudėtis.
- Bandymui pasirinktos koncentracijos ir kartotiniai bandiniai (pvz., kartotinių bandinių skaičius, bandymui pasirinktų koncentracijų skaičius ir taikyta geometrinė progresija).
- Bandymo tirpalų ruošimo aprašymas, įskaitant tirpiklių naudojimą ir t. t.
- Kultūros auginimo aparatūra.
- Šviesos stipris ir apšvietimo kokybė (šaltinis, vienalytiškumas).
- Temperatūra.
- Bandomosios koncentracijos – vardinės bandymui pasirinktos koncentracijos ir bet kokie analizių, atliktų nustatant bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo induose, rezultatai. Reikėtų nurodyti bandomosios medžiagos regeneravimo našumą pagal pasirinktą metodą ir kiekybinio nustatymo ribą bandymo matricoje.
- Bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo.
- Biomasės nustatymo metodas ir matuojamo parametro bei sausosios medžiagos masės sąsajos įrodymas.

Rezultatai

- Visų bandomosios grupės indų pH vertės bandymo pradžioje ir pabaigoje.
- Kiekvienos kolbos biomasė kiekviename matavimo taške ir biomasės matavimo metodas.
- Augimo kreivės (biomasės kaip laiko funkcijos grafikas).
- Apskaičiuoti kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių bandinių variacijos koeficientas.
- Koncentracijos ir poveikio santykio grafikas.
- Toksiškumo įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , ir atitinkami pasikliautiniai intervalai. LOEC ir NOEC vertės (jeigu apskaičiuotos) ir statistiniai metodai, pagal kuriuos jos nustatytos.
- Jei taikytas ANOVA metodas – mažiausio aptinkamo poveikio dydis (pvz., mažiausias reikšminis skirtumas).
- Bet koks bandomosiose grupėse nustatytas augimo skatinimas.
- Bet kokie kiti pastebėti reiškiniai, pvz., dumblių sandaros (morfologiniai) pokyčiai.
- Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Biomasė – gyvų organizmų populiacijos masė, išreiškiama tam tikrame tūrio vienetuose esančios sausosios medžiagos masė, pvz., kiek miligramų dumblių yra viename bandymo tirpalo litre (mg/l). Biomasės sąvoka paprastai suprantama kaip masė, tačiau per šį bandymą šis terminas vartojamas masei tūrio vienetuose apibūdinti. Be to, per šį bandymą vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, kaip antai ląstelių skaičius, fluorescencija ir t. t., taigi biomasės sąvoka apima ir šiuos pakaitinius matavimo vienetus.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Variacijos koeficientas – nedimensinis tam tikro parametro kintamumo matas, apibrėžiamas kaip standartinio nuokrypio ir vidurkio santykis. Jį galima išreikšti ir procentine verte. Kartotinių kontrolinių kultūrų vidutinio savitojo augimo greičio vidutinis variacijos koeficientas turėtų būti apskaičiuojamas taip:

1. pagal kasdienio (atskirų laiko tarpų) augimo greičius apskaičiuojamas atitinkamo kartotinio bandinio vidutinio savitojo augimo greičio variacijos koeficientas (procentais);
2. apskaičiuojama visų taip, kaip nurodyta pirmojoje įtraukoje, apskaičiuotų verčių vidutinė vertė, pagal kurią gaunamas kartotinių kontrolinių kultūrų kasdienio (atskirų laiko tarpų) savitojo augimo greičio vidutinis variacijos koeficientas.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomojo organizmo augimas per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį (kuris, jeigu skiriasi nuo visos arba įprastos bandymo trukmės, turi būti tiksliai nurodytas) sumažėja x % (pvz., 50 %). Pagal augimo greitį arba išėigą nustatytai EC vertei vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai E_xC (augimo greičio) ir E_xC (išėigos).

Auginimo terpė – visiškai paruošta sintetinė kultūrai auginti skirta terpė, kurioje per bandymą auginami bandomosios cheminės medžiagos veikiami dumbliai. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai ištirpinama auginimo terpėje.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – logaritminis biomasės didėjimas bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymui pasirinkta koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas cheminės medžiagos slopinamasis poveikis bandomųjų organizmų augimui (kai $p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijų verčių kenksmingas poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandymui pasirinkta koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC koncentracija.

Atsako kintamasis – toksiškumui vertinti naudojamas kintamasis, gautas pagal bet kurį iš matuojamų parametrų, kuriais apibūdinama biomasė taikant skirtingus apskaičiavimo metodus. Pagal šį bandymo metodą atsako kintamieji yra augimo greitis ir išėiga, nustatyti matuojant pačią biomasę arba kurį nors iš nurodytų pakaitinių parametrų.

Savitasis augimo greitis – atsako kintamasis, apibrėžiamas kaip stebimo parametro (pagal šį bandymo metodą – biomasės) natūraliųjų logaritmų skirtumo ir atitinkamo laikotarpio dalmuo.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Išėiga – matuojamo kintamojo verčių bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas, kuriuo išreiškiamas biomasės padidėjimas per bandymo laikotarpį.

2 priedėlis

Bandymui tinkamos padermės**Žaliadumbliai**

Pseudokirchneriella subcapitata (anksčiau vadinti *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.

Desmodesmus subspicatus (anksčiau vadinti *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG.

Titnagdumbliai

Navicula pelliculosa, UTEX 664.

Melsvabakterės

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1.

Padermių šaltiniai

Rekomenduojamas dumblių padermes galima gauti kaip viena rūšies kultūras iš šių rinkinių (išvardyti abėcėlės tvarka):

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

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

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

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

Rekomenduojamų naudoti rūšių išvaizda ir savybės

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Išvaizda	Lenktos, susuktos pavienės ląstelės	Ovalo formos, daugiausia pavienės ląstelės	Lazdelės	Ovalo formos ląstelių grandinės	Lazdelės
Dydis (ilgis ir plotis), μm	8–14 $\times$ 2–3	7–15 $\times$ 3–12	7,1 $\times$ 3,7	4,5 $\times$ 3	6 $\times$ 1
Ląstelės tūris (μm^3 /ląstelė)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Sausoji ląstelių masė (mg/ląstelė)	2–3 $\times 10^{-8}$	3–4 $\times 10^{-8}$	3–4 $\times 10^{-8}$	1–2 $\times 10^{-8}$	2–3 $\times 10^{-9}$
Augimo greitis ⁽³⁾ (para^{-1})	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Išmatuotas elektroniniu dalelių skaitikliu.

⁽²⁾ Apskaičiuotas pagal dydį.

⁽³⁾ Dažniausiai pastebimas augimo EBPO siūlomoje terpėje greitis esant maždaug 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ šviesos stipriui ir 21 °C temperatūrai.

Konkrečios rekomendacijos dėl bandymams rekomenduojamų rūšių kultūrų auginimo ir priežiūros***Pseudokirchneriella subcapitata* ir *Desmodesmus subspicatus***

Šiuos žaliadumblius apskritai lengva prižiūrėti įvairiose auginimo terpėse. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai. Ląstelės paprastai yra pavienės, jų tankį lengva išmatuoti elektroniniu dalelių skaitikliu arba mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Itin svarbu užtikrinti, kad nesibaigtų atnaujinamos atskiromis partijomis ruošiamos kultūros eksponentinio augimo tarpsnis, nes atgaivinti pasibaigus šiam tarpsniui būtų sunku.

Anabaena flos-aquae sudaro viena prie kitos prikibusių ląstelių grandinių sankaupas, kurių dydis gali kisti priklausomai nuo kultūros auginimo sąlygų. Šias sankaupas gali reikėti suardyti, kai biomasei nustatyti atliekami skaičiavimai mikroskopu arba elektroniniu dalelių skaitikliu.

Siekiant suardyti ląstelių grandines ir taip sumažinti jų skaičiaus kintamumą, dalinius ėminius galima apdoroti ultragarsu. Ilgiau, negu reikia grandinėms sutrumpinti, ultragarsu apdorojamos ląstelės gali žūti. Kiekvieno apdorojimo ultragarsu intensyvumas ir trukmė turi būti vienodi.

Siekiant kompensuoti kintamumą, suskaičiuokite pakankamai daug hemocitometro laukų (bent 400 ląstelių). Tai padės patikimiau nustatyti tankį mikroskopu.

Bendrą *Anabaena* ląstelių tūrį galima nustatyti elektroniniu dalelių skaitikliu, ląstelių grandines suardžius atsargiai apdorojant ultragarsu. Kad ląstelės nesuirtų, apdorojimo ultragarsu jėga turi būti reguliuojama.

Siekiant užtikrinti, kad į bandymo indus sėjama dumblių suspensija būtų gerai sumaišyta ir vienalytė, naudojamas sukurinis maišytuvas arba panašus tinkamas būdas.

Bandymo indus reikėtų pastatyti ant sukamosios arba slankiojamosios purtyklės stalo ir maišyti maždaug 150 sūkių per minutę greičiu. Arba galima suplakti indų turinį darant pertraukas – taip *Anabaena* būtų mažiau linkę sudaryti gniužulus. Jei susidaro gniužulų, būtina stengtis paimti reprezentatyvius ėminius biomasei matuoti. Norint suardyti dumblių gniužulus, prieš imant ėminius gali reikėti juos stipriai pakratyti.

Synechococcus leopoliensis

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai.

Synechococcus leopoliensis yra pavienės lazdelės formos ląstelės, kurios yra labai mažos, todėl matuojant biomasę jas sunku suskaičiuoti mikroskopu. Pravartu naudoti elektroninius dalelių skaitiklius, pritaikytus mažesnėms, iki maždaug 1 µm dydžio dalelėms skaičiuoti. Taip pat tinka atlikti *in vitro* fluorimetrinius matavimus.

Navicula pelliculosa

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai. Atminkite, kad terpės sudėtyje turi būti silikato.

Tam tikromis auginimo sąlygomis *Navicula pelliculosa* gali sudaryti sankaupas. Dėl lipidų susidarymo šių dumblių ląstelės kartais sudaro plėvelę terpės paviršiuje. Tokiomis sąlygomis imant dalinius ėminius biomasei nustatyti, būtina imtis specialių priemonių, kad ėminiai būtų reprezentatyvūs. Gali reikėti stipriai sukratyti dumblius, pvz., sūkuriniu maišytuvu.

3 priedėlis

Auginimo terpės

Galima naudoti vieną iš šių dviejų auginimo terpių:

— EBPO terpė – originali EBPO TG 201 terpė, taip pat naudojama pagal standartą ISO 8692;

— JAV aplinkos apsaugos agentūros AAP terpė, taip pat naudojama pagal ASTM.

Šioms terpėms ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

AAP (JAV aplinkos apsaugos agentūros) terpės ir EBPO TG 201 terpės sudėtis

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

EDTA ir geležies molinis santykis vos viršija vienetą; taip nesusidaro geležies nuosėdų ir kartu sunkiųjų metalų jonų chelodara yra minimali.

Bandymui naudojant titnagdumblius *Navicula pelliculosa*, siekiant gauti 1,4 mg Si/l koncentraciją, į abi terpes turi būti papildomai dedama $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Terpės pH vertė gaunama nusistovėjus pusiausvyrai tarp terpės karbonatinės sistemos ir atmosferos oro dalinio CO_2 slėgio. Apytikris santykis tarp pH vertės, esant 25 °C temperatūrai, ir molinės hidrokarbonato koncentracijos išreiškiamas formule

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

Esant 15 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (JAV aplinkos apsaugos agentūros siūlomoje terpėje), o esant 50 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (EBPO terpėje).

Bandymo terpių elementinė sudėtis

Elementas	AAP terpė	EBPO terpė
	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

EBPO terpės ruošimas

Mitybinė medžiaga	Koncentracija pradiniam tirpale
1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
2 pradinis tirpalas: geležis	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Mitybinė medžiaga	Koncentracija pradiniam tirpale
3 pradinis tirpalas: mikroelementai	
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
4 pradinis tirpalas: hidrokarbonatas	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	

Pradiniai tirpalai sterilizuojami membraninio filtravimo būdu (vidutinis akučių skersmuo 0,2 μm) arba apdorojant autoklave (120 °C temperatūroje, 15 min.). Tirpalai laikomi tamsoje, 4 °C temperatūroje.

Autoklave negalima apdoroti 2 ir 4 pradinių tirpalų, jie sterilizuojami membraninio filtravimo būdu.

Auginimo terpė paruošiama į vandenį įpilant atitinkamą 1–4 pradinių tirpalų kiekį.

Į 500 ml sterilizuoto vandens įpilama:

10 ml 1 pradinio tirpalo;

1 ml 2 pradinio tirpalo;

1 ml 3 pradinio tirpalo;

1 ml 4 pradinio tirpalo.

Atskiedžiama sterilizuotu vandeniu iki 1 000 ml tūrio.

Terpė pakankamai ilgai laikoma, kad tarp jos ir atmosferos oro nusistovėtų CO_2 pusiausvyra, jei reikia, kelias valandas barbotuojant sterilų filtruotą orą.

JAV aplinkos apsaugos agentūros terpės ruošimas

- Po 1 ml kiekvieno iš 2.1–2.7 punktuose nurodytų pradinių tirpalų įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ir atskiedžiama iki 1 litro tūrio.
- Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai ruošiami 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ištirpinant toliau nurodytus medžiagų kiekius. 2.1, 2.2, 2.3 ir 2.4 punktuose nurodytus reagentus galima sumaišyti viename pradiniam tirpalui.

2.1 $NaNO_3$ 12,750 g

2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6,082 g

2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g
2.4	Mitybinių mikroelementų pradiniai tirpalai (žr. 3)	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	NaHCO_3	7,500 g
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Žr. 1 pastabą.

1 pastaba. Tinka tik bandomosioms titnagdumblių rūšims. Galima dėti tiesiai į terpę (202,4 mg) arba kaip pradinį tirpalą, kad galutinė koncentracija terpeje būtų 20 mg/l Si.

3. Mitybinių mikroelementų pradinis tirpalas ruošiamas 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ištirpinant:

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

2 pastaba. Tinka dėti tik į titnagdumblių rūšių pradinių kultūrų terpes.

4. Nustatoma $7,5 \pm 0,1$ pH vertė įdedant 0,1 N arba 1,0 N NaOH arba HCl.
5. Terpės perfiltruojamos į sterilią talpą per 0,22 μm akučių membraninį filtrą, jeigu bus naudojamas dalelių skaitiklis, arba per 0,45 μm akučių filtrą, jeigu dalelių skaitiklis nebus naudojamas.
6. Terpė iki naudojimo laikoma tamsoje, maždaug 4 °C temperatūroje.

4 priedėlis

Dumblių kultūrų auginimo procedūros pavyzdys**Bendrosios pastabos**

Pagal šią procedūrą dumblių kultūros auginamos toksiškumo bandymams atlikti.

Tinkamais metodais užtikrinkite, kad dumblių kultūros nebūtų užkrėstos bakterijomis. Gali būti patartina naudoti sterilizuotas kultūras, tačiau turi būti gautos ir naudojamos vienuose dumblių kultūros.

Stengiantis išvengti užkrėtimo bakterijomis ir kitais dumbliais, visus veiksmus būtina atlikti steriliomis sąlygomis.

Naudojama įranga ir medžiagos

Žr. šio bandymo metodo aprašymą („Aparatūra“).

Dumblių kultūrų gavimo procedūros*Mitybinių medžiagų tirpalų (terpių) ruošimas*

Paruošiami visų į terpę dedamų mitybinių medžiagų druskų koncentruoti pradiniai tirpalai, kurie laikomi tamsoje ir šaltai. Šie tirpalai sterilizuojami filtruojant arba apdorojant autoklave.

Terpė ruošama į sterilų distiliuotą vandenį įpilant reikiamą pradinio tirpalo kiekį, imantis apsaugos nuo užkrėtimo priemonių. Ruošiant kietąją terpę įdedama 0,8 % agarų.

Pradinė kultūra

Pradinės kultūros yra mažos dumblių kultūros, kurios reguliariai perkeliama į šviežią terpę ir naudojamos kaip pradinė bandymų medžiaga. Jeigu kultūros reguliariai nenaudojamos, jos perkeliama ant gulsčiojo agarų mėgintuvėliuose. Šios kultūros bent kartą per du mėnesius perkeliama į šviežią terpę.

Pradinės kultūros auginamos tinkamoje terpėje (apie 100 ml tūrio) kūginėse kolbose. 20 °C temperatūroje nuolatinio apšvietimo sąlygomis inkubuojamus dumblius reikia perkelti kas savaitę.

Į kolbą su šviežia terpe sterilia pipete perkeliama toks „senos“ kultūros kiekis, kad pradinė koncentracija greitai augančių rūšių atveju būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Konkrečios rūšies dumblių augimo greitį galima nustatyti iš augimo kreivės. Žinant augimo greitį, galima įvertinti, koks turėtų būti į naują terpę perkeliama kultūros tankis. Tai reikia padaryti anksčiau, negu atitinkama kultūra pasieks žūties tarpsnį.

Iš anksto paruošta kultūra

Iš anksto paruošta kultūra naudojama bandomųjų kultūrų pasėliui reikalingam dumblių kiekiui gauti. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama per eksponentinio augimo tarpsnį, paprastai maždaug po 2–4 parų inkubacinio periodo. Dumblių kultūrose esančios deformuotos arba neįprastos sandaros ląstelės turi būti pašalintos.

5 priedėlis

Duomenų analizė netiesinės regresijos būdu**Bendrosios pastabos**

Per dumblių ir kitų mikroorganizmų augimo bandymus gaunamas atsakas – biomasės augimas – yra iš esmės tolydusis arba metrinis kintamasis – proceso greitis, jei naudojamas augimo greitis, ir jo integralas pagal laiką, kintamuoju pasirinkus biomasę. Abu dydžiai lyginami su atitinkamu bandomosios medžiagos neveikiamų kartotinių kontrolinių bandinių vidutiniu atsaku, kuris yra didžiausias atsakas nustatytomis sąlygomis (pagrindiniai lemiamą įtaką turintys veiksniai per dumblių bandymą yra šviesa ir temperatūra). Bandymo sistema yra paskirstytoji arba vienalytė ir biomasę galima vertinti kaip ištisinį parametą neatsižvelgiant į atskiras ląsteles. Tokioje sistemoje būdingo atsako dispersijos pasiskirstymas (paprastai apibūdinamas logaritminiu normaliuoju arba normaliuoju paklaidų skirstiniu) siejamas tik su bandymo veiksniais. Tai yra priešinga tipiniams dvireikšmių kintamųjų bioanalizės atsakams, dėl kurių dažnai daroma prielaida, kad atskirų organizmų atsparumas (paprastai išreikštas binominiu skirstiniu) yra vyraujantis dispersijos komponentas. Šiuo atveju kontrolinės grupės atsakas yra nulinio arba foninio lygio.

Nesudėtingu atveju normalizuotas arba santykinis atsakas r tolygiai mažėja nuo 1 (nulinis slopinimas) iki 0 (100 % slopinimas). Įsidėmėtina, kad visi atsakai turi asocijuotąją paklaidą ir kad gali būti apskaičiuotas tariamas neigiamas slopinimas, kuris būtų tik atsitiktinės paklaidos rezultatas.

Regresinė analizė*Modeliai*

Regresinės analizės tikslas – koncentracijos ir atsako kreivę kiekybiškai apibūdinti kaip matematinės regresijos funkciją $Y = f(C)$ arba, dažniau, $F(Z)$, kai $Z = \log C$. Naudojant atvirkštinę funkciją $C = f^{-1}(Y)$ galima apskaičiuoti EC_x vertes, įskaitant EC_{50} , EC_{10} ir EC_{20} , ir jų 95 % pasiklivimo ribas. Įrodyta, kad dumblių augimo slopinimo bandymais gautiems koncentracijos ir atsako santykiams apibūdinti tinka kelios paprastos matematinių funkcijų formulės. Tokios funkcijos yra, pvz., logistinė lygtis, nesimetrinė Weibull lygtis ir logaritminio normaliojo skirstinio funkcija. Visos jos yra sigmoidės, asimptotiškai artėjančios prie vieneto, kai $C \rightarrow 0$, ir prie nulio, kai $C \rightarrow$ begalybė.

Neseniai pasiūlyta kaip alternatyvą asimptotiniams modeliams taikyti tolydžiosios slenksčio funkcijos modelius (pvz., Kooijman „populiacijos augimo slopinimo“ modelį, Kooijman *et al.*, 1996). Pagal šį modelį daroma prielaida, kad poveikio nėra, kol koncentracija nesiekia tam tikros ribinės EC_0 vertės, įvertinamos ekstrapoliuojant atsako ir koncentracijos santykį iki sankirtos su koncentracijos verčių ašimi, naudojant paprastą tolydžiąją funkciją, nediferencijuojamą pradžios taške.

Įsidėmėtina, kad analizė gali būti atliekama paprasčiausiai naudojant minimalias liekanų kvadratų (pastovios dispersijos atveju) sumas arba svertinių kvadratų sumas, jeigu kompensuojamas dispersijos nevienalytiškumas.

Procedūra

Taikomą procedūrą galima glaustai apibūdinti taip: pasirinkta tinkama funkcinė lygtis $Y = f(C)$ pritaikoma turimiems duomenims taikant netiesinę regresiją. Siekiant iš turimų duomenų gauti kuo daugiau informacijos, geriau naudoti atskirus kiekvienos kolbos matavimų duomenis, o ne vidutines kartotinių bandinių vertes. Kita vertus, esant didelei dispersijai, iš praktinės patirties yra žinoma, kad naudojant kartotinių bandinių vidurkius galima atlikti patikimesnį, mažiau duomenų sistemingųjų paklaidų veikiamą matematinį vertinimą negu tada, kai naudojamas kiekvienas atskiras paliktas duomenų taškas.

Grafike pavaizduojama pritaikyta kreivė kartu su matavimų duomenimis ir patikrinama, ar kreivė pritaikyta tinkamai. Šiuo tikslu gali būti itin naudinga atlikti liekanų analizę. Jeigu pasirinkta koncentracijos ir atsako pritaikymo funkcija tinka ne visai kreivei arba tik kuriai nors esminei jos daliai aprašyti, pvz., atsako „duobei“ esant mažoms koncentracijos vėrtėms, vietoj simetrinės pasirenkama kita pritaikoma kreivė, pvz., nesimetrinė Weibull funkcijos kreivė. Dėl neigiamo slopinimo gali kilti problemų, pvz., naudojant logaritminio normaliojo skirstinio funkciją; tokiu atveju irgi reikės rinktis kitą regresijos funkciją. Tokių neigiamų verčių nepartartina prilyginti nuliui ar

priskirti joms mažą teigiamą vertę, nes taip būtų iškreiptas paklaidų pasiskirstymas. Norint įvertinti EC_x , kai x yra mažas, vertes, galbūt būtų pritaikyti kreivę atskirose jos dalyse, pvz., mažo slopinimo dalyje. Pagal pritaikytą lygtį apskaičiuojami („atvirkštinio įvertinimo“ būdu) $C = f^{-1}(Y)$ būdingųjų taškų įverčiai EC_x ir ataskaitoje pateikiamas bent EC_{50} įvertis bei vienas iš dviejų EC_x , esant mažam x , įverčių. Iš bandymų praktikos žinoma, kad dėl dumblių bandymo preciziškumo paprastai galima pakankamai tiksliai įvertinti 10 % slopinimo lygį, jeigu yra pakankamai duomenų taškų, nebent, esant mažoms koncentracijoms, iškraipantysis veiksnys būtų augimo skatinimas. EC_{20} įverčio preciziškumas dažnai yra kur kas didesnis negu EC_{10} , nes EC_{20} paprastai yra maždaug tiesiojoje vidurinės koncentracijos ir atsako kreivės dalyje. Kartais EC_{10} duomenis gali būti sunku aiškinti dėl skatinamojo poveikio augimui. Todėl, nors EC_{10} vertę paprastai galima pakankamai tiksliai nustatyti, rekomenduojama ataskaitoje visada nurodyti ir EC_{20} .

Svertiniai koeficientai

Bandymų dispersija apskritai yra nepastovi ir į ją paprastai įeina proporcinis komponentas, taigi įprastai galima sėkmingai atlikti svertinę regresinę analizę. Tokiai analizei naudojami svertiniai koeficientai paprastai laikomi atvirkščiai proporcingais dispersijai:

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

Naudojant daugelį regresijos programų galima pasirinkti svertinę regresinę analizę, svertinius koeficientus pateikiant lentelėje. Patogu normalizuoti svertinius koeficientus dauginant juos iš $n/\sum w_i$ (n yra duomenų taškų skaičius), kad jų suma būtų lygi vienetui.

Atsakų normalizavimas

Normalizavimas pagal vidutinį kontrolinių bandinių atsaką kelia tam tikrų metodinių problemų ir gaunama gan sudėtingos struktūros dispersija. Kai augimo slopinimo procentinė vertė gaunama dalijant konkretų atsako vertę iš kontrolinių bandinių atsako vidurkio, atsiranda papildoma paklaida dėl kontrolinių bandinių vidurkio paklaidos, todėl būtina atlikti regresijos svertinių koeficientų ir pasiklivimo ribų pataisą dėl kovariacijos su kontroliniais bandiniais (Draper ir Smith, 1981), nebent ši paklaida būtų labai maža. Įsidėmėtina, jog svarbu didelis kontrolinių bandinių vidutinio atsako įverčio preciziškumas, kad santykinio atsako suminė dispersija būtų kuo mažesnė. Ši dispersija atrodo taip:

(apatinis i indeksas reiškia i koncentracijos lygį, 0 indeksas – kontrolinius bandinius)

$$Y_i = \text{santykinis atsakas} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i),$$

kurio dispersija $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$,

ir kadangi $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ ir $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$,

esant normaliajam duomenų skirstiniui ir m_i bei m_0 kartotiniams bandiniams: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

suminė santykinio atsako Y_i dispersija yra

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

Kontrolinių bandinių vidurkio paklaida yra atvirkščiai proporcinga kvadratinei šakniai iš suvidurkintų kontrolinių kartotinių bandinių skaičiaus; kartais galima pagrįstai įtraukti iš anksčiau sukauptus duomenis ir taip labai sumažinti paklaidą. Pagal alternatyvią procedūrą nereikia normalizuoti duomenų ir pritaikyti absoliučiąjį atsakų dydžių, įskaitant kontrolinių bandinių atsakų duomenis, tačiau reikia naudoti kontrolinių bandinių atsako vertę kaip papildomą parametą, pritaikomą netiesinės regresijos būdu. Naudojant įprastą 2 parametrų regresijos lygtį, pagal šį metodą reikia pritaikyti 3 parametrus, todėl reikia daugiau duomenų taškų negu taikant netiesinę regresiją duomenims, kurie normalizuojami naudojant iš anksto nustatytą kontrolinių bandinių atsaką.

Atvirkštiniai pasikliautiniai intervalai

Netiesinės regresijos pasikliautinių intervalų apskaičiavimas atliekant atvirkštinį įvertinimą yra gana sudėtingas ir įprastuose statistikos kompiuterinių programų rinkiniuose jo nėra kaip tipinės pasirinkties. Apytikrius pasikliautinius intervalus galima gauti naudojant įprastas netiesinės regresijos programas ir atliekant parametrų keitimą (Bruce ir Versteeg, 1992), kurį sudaro matematinės lygties perrašymas pagal reikiamus taškų įverčius, pvz., EC_{10} ir EC_{50} kaip vertinamus parametrus (tarkime, kad yra funkcija $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentracija})$ ir naudojami apibrėžiamieji santykiai $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ bei $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ funkcijai $f(\alpha, \beta, \text{koncentracija})$ pakeisti lygiaverte funkcija $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentracija})$).

Labiau tiesioginis apskaičiavimas (Andersen *et al.*, 1998) atliekamas nekeičiant pradinės lygties ir taikant Taylor eilutės skleidinį apie r_1 ir r_0 vidurkius.

Neseniai išpopuliarėjo savirankos (angl. *bootstrap*) metodai. Taikant tokius metodus empiriniam dispersijos skirstiniui vertinti naudojami matavimų duomenys ir, naudojant atsitiktinių skaičių generatorių, dažnai imami pakartotiniai ėminiai.

NUORODOS

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

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

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

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

4) C.11 skyrius pakeičiamas taip:

„C.11. AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO SLOPINIMO BANDYMAS (ANGLIES IR AMONIO OKSIDACIJA)“

IVADAS

- Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 209 (2010). Jis skirtas cheminės medžiagos poveikiui aktyviojo dumblo mikroorganizmams (daugiausia bakterijoms) nustatyti matuojant jų kvėpavimo intensyvumą (anglies ir (arba) amonio oksidaciją) nustatytais konkrečiomis sąlygomis, esant įvairioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms. Šis bandymo metodas pagrįstas ETAD (dažiklių gamybos pramonės ekologijos ir toksikologijos asociacijos) bandymais (1), (2), ankstesnėmis EBPO bandymo gairėmis Nr. 209 (3) ir pakeistu ISO 8192 standartu (4). Šio bandymo tikslas – taikant greitąjį atrankos metodą, vertinti cheminių medžiagų poveikį nuotekų valymo įrenginių biologinio (aerobinio) valymo etape naudojamo aktyviojo dumblo mikroorganizmams. Šio bandymo rezultatais taip pat galima remtis nustatant neslopinančias bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijas, tinkamas naudoti atliekant biologinio skaidumo tyrimus (pvz., šio priedo C.4 A–F, C.9, C.10, C.12 ir C.29 skyriai, EBPO TG302C). Tokiu atveju šį bandymą galima atlikti kaip atrankos bandymą, panašų į intervalo arba ribų nustatymo bandymą (žr. 39 skirsnį), vertinant tik bendrąjį kvėpavimą. Tačiau šia informacija reikėtų atsargiai remtis atliekant lengvo biologinio skaidumo bandymus (šio priedo C.4 A–F ir C.29 skyriai), per kuriuos pasėlio koncentracija yra kur kas mažesnė nei pagal šį bandymo metodą. Iš tiesų, nors per šį kvėpavimo slopinimo bandymą gali būti nustatyta, kad jokio slopinimo nėra, tai dar nereiškia, kad būtų pripažintos neslopinančios sąlygos atliekant lengvo biologinio skaidumo bandymą pagal šio priedo C.4 A–F arba C.29 skyrių.

2. Apskritai atrodo, jog nuo tada, kai pirmą kartą paskelbta apie kvėpavimo slopinimo bandymą, jis atliekamas sėkmingai, tačiau kartais pranešama apie gautus klaidingus rezultatus, pvz., (2), (4), (5). Kartais gaunamos dvifazės kvėpavimo pagal koncentraciją kreivės, iškraipyti dozės ir atsako santykio grafikai ar netikėtai mažos EC_{50} vertės (5). Ištyrus nustatyta, jog tokie rezultatai gaunami tada, kai bandymo aktyviajam dumblui yra būdinga stipri nitrifikacija ir bandomoji cheminė medžiaga amonio oksidaciją veikia labiau negu bendrąją heterotrofinę oksidaciją. Todėl tokių klaidingų rezultatų galima išvengti atliekant papildomus bandymus naudojant specialų nitrifikacijos inhibitorių. Išmatuojant deguonies sugerties greitį esant tokiam inhibitoriui, pvz., N-aliltiokarbamidui (ATU), ir be jo, galima atskirai apskaičiuoti bendros, heterotrofinės ir dėl nitrifikacijos vykstančios deguonies sugerties lygius (4), (7), (8). Taip galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos slopinamąjį poveikį abiem procesams ir tiek organinės (heterotrofinės) anglies oksidacijos, tiek amonio oksidacijos (nitrifikacijos) EC_{50} vertes apskaičiuoti įprastu būdu. Pažymėtina, jog kai kuriais retais atvejais N-aliltiokarbamido slopinamasis poveikis gali iš dalies arba visiškai išnykti dėl kompleksodaros su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis arba terpės priedais, pvz., Cu^{++} jonais (6). Cu^{++} jonai yra būtini *Nitrosomonas*, tačiau didesnėmis koncentracijomis toksiški.
3. Užtikrinti nitrifikaciją atliekant aerobinį nuotekų valymą kaip būtiną azoto junginių šalinimo iš nuotekų, denitrifikuojant dujinius darinius, proceso etapą yra itin svarbus uždavinys, ypač Europos šalyse; ES neseniai nustatė žemesnės azoto koncentracijos išvalytose nuotekose, išleidžiamose į nuotekų priimtumą, ribines vertes (¹).
4. Daugeliu atvejų pakanka taikyti tokį metodą, pagal kurį būtų įvertintas poveikis organinės anglies oksidacijos procesams. Tačiau kai kuriais atvejais, siekiant išaiškinti gautus rezultatus ir suprasti šį poveikį, reikia ištirti poveikį vien nitrifikacijai arba atskirai ištirti poveikį nitrifikacijai ir poveikį organinei anglies oksidacijai.

BANDYMO METODO ESMĖ

5. Sintetinėmis nuotekomis maitinamo aktyviojo dumblo ėminių kvėpavimo intensyvumas matuojamas uždaroje kameroje su deguonies elektrodu po 3 val. sąlyčio su bandomąja medžiaga. Atsižvelgiant į tikėtiną poveikio scenarijų, sąlytis galėtų trukti ir ilgiau. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra greitai suskaidoma, pvz., abiotiškai hidrolizės būdu, arba yra laki ir pastovios jos koncentracijos palaikyti neįmanoma, papildomai galima nustatyti trumpesnę, pvz., 30 min., poveikio laikotarpį. Poveikio dieną turėtų būti patikrintas kiekvienos partijos aktyviojo dumblo jautris naudojant tinkamą etaloninę cheminę medžiagą. Per šį bandymą paprastai nustatoma bandomosios cheminės medžiagos EC_x (pvz., EC_{50}) ir (arba) nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC).
6. Organinę anglį oksiduojančių mikroorganizmų deguonies suvartojimo slopinimas gali būti išreiškiamas atskirai nuo amonij oksiduojančių mikroorganizmų, išmatuojant deguonies suvartojimo spartą su N-aliltiokarbamidu ir be jo (tai specialus inhibitorius, stabdantis pirmosios pakopos nitrobakterijų amonio oksidavimą į nitritą). Šiuo atveju deguonies sugerties greičio procentinis slopinimas apskaičiuojamas palyginant deguonies sugerties greitį veikiant bandomajai cheminei medžiagai su atitinkamų kontrolinių bandinių be bandomosios cheminės medžiagos vidutiniu deguonies sugerties greičiu, tiek naudojant specialųjį inhibitorių N-aliltiokarbamidą, tiek be jo.
7. Bet kokią deguonies sugertį per abiotinius procesus galima nustatyti išmatuojant sugerties greitį bandomosios cheminės medžiagos, sintetinių nuotekų terpės ir vandens mišiniuose be aktyviojo dumblo.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Kad būtų įmanoma teisingai aiškinti bandymo rezultatus, reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos tapatybę (geriausia CAS numerį), pavadinimą (IUPAC), grynumą, tirpumą vandenyje, garų slėgį, lakumą ir įgerties (adsorbcijos) savybes. Lakiųjų cheminių medžiagų bandymų paprastai neįmanoma tinkamai atlikti be specialių atsargumo priemonių (žr. 21 skirsnį).

(¹) 1991 m. gegužės 21 d. Tarybos direktyva 91/271/EEB dėl miesto nuotekų valymo (OL L 135, 1991 5 30, p. 40).

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

9. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms, mažai tirpioms ir lakioms cheminėms medžiagoms. Tačiau gali būti ne visada įmanoma gauti riboto tirpumo cheminių medžiagų EC_{50} vertes, o atliekant lakiųjų cheminių medžiagų bandymus, patikimus rezultatus įmanoma gauti tik tada, kai didžioji bandomosios cheminės medžiagos dalis (pvz., > 80 %) lieka reakcijos mišinyje iki veikimo laikotarpio (-ių) pabaigos. Reikėtų pateikti papildomų patvirtinamųjų analitinių duomenų, siekiant patikslinti EC_x koncentraciją tais atvejais, kai esama neaiškumų dėl bandomosios cheminės medžiagos stabilumo arba lakumo.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

10. Siekiant įsitikinti bandymo metodo ir bandymo sąlygų patikimumu, reikėtų reguliariai atlikti bandymus su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis, o poveikio dieną patikrinti kiekvienos mikroorganizmų pasėlio partijos aktyviojo dumblo jautrį. Kaip etaloninę slopinamąją poveikį turinčią cheminę medžiagą rekomenduojama naudoti 3,5-dichlorfenolį (3,5-DCP) – tai žinomas kvėpavimo inhibitorius, naudojamas atliekant daugelį įvairaus pobūdžio slopinamojo ir (arba) toksinio poveikio bandymų (4). Matuojant bendrojo kvėpavimo slopinimą, kaip etaloninę cheminę medžiagą taip pat galima naudoti vario (II) sulfato pentahidratą (9). Kaip specialų etaloninį nitrifikacijos inhibitorių galima naudoti N-metilaniliną (4).

TINKAMUMO KRITERIJAI IR ATKURIAMUMAS

11. Tuščių (be bandomosios ar etaloninės cheminės medžiagos) kontrolinių bandinių deguonies sugerties greitis turėtų būti ne mažiau kaip 20 mg deguonies vienam gramui aktyviojo dumblo (sausosios suspenduotų kietųjų medžiagų masės) per valandą. Jei greitis yra mažesnis, bandymą reikėtų pakartoti naudojant išplautą aktyvųjį dumblą arba iš kito šaltinio gautą dumblą. Kartotinių kontrolinių bandinių deguonies sugerties greičio variacijos koeficientas nustatomojo bandymo pabaigoje neturėtų būti didesnis kaip 30 %.
12. 2004 m. atlikus ISO organizuotą tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (4), per kurį naudotas buitinių nuotekų aktyvusis dumblas, nustatytos 3,5-DCP EC_{50} vertės matuojant bendrąjį kvėpavimą buvo nuo 2 iki 25 mg/l, matuojant heterotrofinį kvėpavimą – nuo 5 iki 40 mg/l, matuojant nitrifikacinį kvėpavimą – nuo 0,1 iki 10 mg/l. Jeigu nustatyta 3,5-DCP EC_{50} vertė nepatenka į tikėtiną intervalą, bandymą reikėtų pakartoti naudojant iš kito šaltinio gautą aktyvųjį dumblą. Vario (II) sulfato pentahidrato EC_{50} vertė, matuojant bendrąjį kvėpavimą, turėtų būti 53–155 mg/l (9).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir aparatūra

13. Turėtų būti naudojama įprasta laboratorinė įranga ir šie reikmenys:
- a) bandymo indai – pvz., 1 000 ml tūrio cheminės stiklinės, kuriose laikoma 500 ml reakcijos mišinio (žr. 1 pav. – 5);
 - b) ištirpusio deguonies koncentracijos matavimo kamera ir priedai; tinkamas deguonies elektrodas; uždara talpa ėminiui laikyti be viršerdvės, su savirašiu (pvz., 2 priedėlio 1 pav. – 7, 8, 9); vietoj jos galima naudoti biocheminiam deguonies suvartojimui (BDS) matuoti skirtą butelį su pritaikyta mova deguonies elektrodui prie butelio kaklelio pritvirtinti (žr. 3 priedėlio 2 pav.). Kad įstatant deguonies elektrodą nebūtų išstumta ir prarasta butelyje esančio skysčio, patartina visų pirma per movą įstatyti piltuvėlį ar stiklinį vamzdelį arba naudoti indus išlenktais kraštais. Abiem atvejais reikėtų naudoti magnetinį maišiklį arba kitą maišymo priemonę, pvz., savimaišį zondą;
 - c) inertine medžiaga padengti magnetiniai maišikliai ir kartotuvai, skirti naudoti matavimo kameroje ir (arba) bandymo induose;
 - d) aeratorius. Jeigu reikia, suslėgtas oras turėtų būti leidžiamas per tinkamą filtrą, iš jo pašalinant dulkes ir riebalus, ir per plovikles su vandeniu orui drėkinti. Indų turinys turėtų būti aeruojamas naudojant Pastero pipetes arba kitus cheminių medžiagų nesugėriamčius aeratorius. Sukamoji purtyklė, kurios sukimosi greitis būtų 150–250 sūkių/min., gali būti naudojama, pvz., 2 000 ml talpos kolboms, siekiant tiekti dumblui reikalingą deguonį ir išspręsti problemas, kylančias, kai cheminės medžiagos pernelyg gausiai putoja, yra lakios ir todėl prarandamos arba sunkiai išsklaidomos barbotuojant. Bandymo sistema paprastai susideda iš nuolat aeruojamų ir tam tikra seka (pvz., 10–15 min. intervalais) paruoštų cheminių stiklinių, kurių turinys atitinkama eilės tvarka analizuojamas. Taip pat galima naudoti patvirtintus instrumentus mišiniams aeruoti ir kartu deguonies vartojimo greičiui matuoti juose;

- e) pH-metras;
- f) centrifuga – įprasta dumbalui tinkama stalinė centrifuga, kurios sparta siekia 10 000 m/s².

Cheminiai reagentai

14. Per visą bandymą turėtų būti naudojami analiziškai grynai cheminiai reagentai.

Vanduo

15. Turėtų būti naudojamas distiliuotas arba dejonizuotas vanduo, kuriame būtų mažiau nei 1 mg/l ištirpusios organinės anglies, nebent konkrečiai tiktų naudoti vandentiekio vandenį be chloro.

Sintetinių nuotekų mitybinė terpė

16. Terpė ruošiama iš toliau nurodytų sudedamųjų dalių, kurių kiekiai turėtų būti tokie:

— peptono	16 g
— mėsos ekstrakto (arba panašaus augalinio ekstrakto)	11 g
— karbamido	3 g
— natrio chlorido (NaCl)	0,7 g
— kalcio chlorido dihidrato (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— magnio sulfato heptahidrato (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— bevandenio kalio monohidrofosfato (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— distiliuoto arba dejonizuoto vandens iki 1 litro tūrio.	

17. Šio tirpalo pH turėtų būti $7,5 \pm 0,5$. Jeigu paruošta terpė naudojama ne iš karto, ją reikėtų laikyti tamsoje 0–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip savaitę arba tokiomis sąlygomis, kad nepakistų jos sudėtis. Įsidėmėtina, jog šios sintetinių nuotekų terpės koncentracija yra 100 kartų didesnė negu terpės, aprašytos EBPO techninėje ataskaitoje „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas metodas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologiniam skaidumui nustatyti) (1976 m. birželio 11 d.), be to, į šią terpę dedama dikalto vandenilio fosfato.
18. Kitu atveju, ruošiant terpę laikymui, galima atskirai sterilizuoti jos sudedamąsias dalis arba peptonas ir mėsos ekstraktas gali būti dedami prieš pat bandymą. Prieš naudojant terpę reikėtų gerai sumaišyti ir, jei reikia, jos pH vertę patikslinti iki $7,5 \pm 0,5$.

Bandomoji cheminė medžiaga

19. Lengvai vandenyje tirpstančioms bandomosioms medžiagoms reikėtų paruošti tiek pradinio tirpalo, kad nebūtų viršyta jų tirpumo vandenyje riba (neturi susidaryti nuosėdų). Vandenyje mažai tirpios medžiagos, mišiniai, kurių įvairios sudedamosios dalys yra nevienodai tirpios vandenyje, ir lengvai išigeriančios (adsorbuojamos) medžiagos turėtų būti dedamos tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriamos. Tokiais atvejais galima naudoti pradinius tirpalus, jeigu ištirpusių bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijų analiziniai nustatymai atliekami bandymo induose (prieš įdedant aktyvųjį dumblą). Ištirpusių bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijų analizinis nustatymas taip pat turi būti atliekamas bandymo induose tuo atveju, jeigu ruošiamos vandenyje ištirpusios dalys (angl. *water accommodated fractions*, WAF). Nereikėtų naudoti organinių tirpiklių, dispergentų ar emulsiklių tirpumui padidinti. Pradinius tirpalus ir dar nesumaišytas suspensijas apdoroti ultragarsu, pvz., per naktį, galima tada, kai pakanka informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą tokiomis sąlygomis.
20. Bandomoji cheminė medžiaga gali neigiamai paveikti bandymo sistemos pH. Mišinių su bandomąja chemine medžiaga pH vertes reikėtų išmatuoti dar iki bandymo pradžios, per išankstinį bandymą, siekiant nustatyti, ar reikės patikslinti pH prieš pagrindinį bandymą ir dar kartą pagrindinio bandymo dieną. Bandomosios cheminės medžiagos vandeniniai tirpalai arba suspensijos, kai reikia, turėtų būti neutralizuojami prieš įdedant pasėlį. Tačiau kadangi neutralizuojant gali pakisti cheminės medžiagos savybės, priklausomai nuo tyrimo tikslų, galima papildomais bandymais įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį dumblui netikslinant pH vertės.

21. Lakiųjų cheminių medžiagų toksinis poveikis, ypač kai atliekant bandymą sistemoje barbotuojamas oras, gali būti nevienodai didelis dėl tokios medžiagos kiekio mažėjimo jos veikimo laikotarpiu. Atliekant šių medžiagų bandymus reikėtų imtis atsargumo priemonių – atskirai išanalizuoti kontrolinius mišinius su tokia medžiaga ir atitinkamai pakeisti aeravimo normą.

Etaloninė cheminė medžiaga

22. Kaip etaloninę cheminę medžiagą naudojant 3,5-dichlorfenolį, reikėtų paruošti tirpalą iš 1,00 g 3,5-dichlorfenolio ir 1 000 ml vandens (15). Kad ši medžiaga greičiau ištirptų, reikėtų naudoti šiltą vandenį ir (arba) apdoroti tirpalą ultragarsu, o kai tirpalas atauš iki kambario temperatūros, papildyti jį iki reikiamo tūrio. Tačiau reikėtų užtikrinti, kad nepakistų etaloninės medžiagos struktūra. Tirpalo pH vertę reikėtų patikrinti ir, jei reikia, patikslinti naudojant NaOH arba H_2SO_4 , kad pH būtų 7–8.
23. Jeigu kaip etaloninė cheminė medžiaga naudojamas vario (II) sulfato pentahidratas, jo koncentracijos turi būti 58 mg/l, 100 mg/l ir 180 mg/l (besiskiriančios 1,8 karto). Ši medžiaga dedama tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriamą (kai bendras bandymo tirpalo tūris yra 500 ml, imama 29, 50 arba 90 mg medžiagos), tada ištirpinama 234 ml autoklave apdoroto vandentiekio vandens. Vario (II) sulfato pentahidratas yra lengvai tirpstanti medžiaga. Pradedant bandymą į tirpalą įdedama 16 ml sintetinių nuotekų ir 250 ml aktyviojo dumblo.

Specialus nitrifikacijos inhibitorius

24. Reikėtų paruošti 2,32 g/l N-aliltiokarbamido (ATU) pradinį tirpalą. Įpylus 2,5 ml šio pradinio tirpalo į inkubuojamą 500 ml bendro tūrio mišinį, gaunama galutinė 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l) koncentracija, kurios, kaip žinoma, pakanka (4) nitrifikacijai visiškai (100 %) sustabdyti nitrifikuojančiame aktyviajame dumble, kuriame yra 1,5 g/l suspenduotų kietųjų medžiagų.

Abiotinė kontrolė

25. Tam tikromis retomis sąlygomis, kai bandomoji cheminė medžiaga turi stipriai redukuojančių savybių, matuojant gali būti nustatyta nemaža abiotinė deguonies sugertis. Tokiais atvejais, siekiant skirti bandomosios cheminės medžiagos abiotinę deguonies sugertį nuo mikroorganizmų kvėpavimo, būtina abiotinė kontrolė. Abiotinius kontrolinius bandinius galima paruošti į bandymo mišinius nededant pasėlio. Abiotinius kontrolinius bandinius be pasėlio taip pat galima naudoti atliekant patvirtinamuosius analizinius matavimus, siekiant nustatyti per bandomosios medžiagos veikimo etapą pasiektą koncentracijos lygį, pvz., naudojant vandenyje mažai tirpių cheminių medžiagų pradinius tirpalus, kurių sudedamosios dalys nevienodai tirpios vandenyje. Konkrečiais atvejais gali reikėti paruošti abiotinį kontrolinį bandinį naudojant sterilizuotą (pvz., apdorojus autoklave arba pridėjus sterilizuojančių toksinių medžiagų) pasėlį. Kai kurios cheminės medžiagos gali išskirti arba sugerti deguonį tuo atveju, jeigu jų paviršiaus plotas yra pakankamai didelis tokiai reakcijai vyksti, net jeigu tai reakcijai įprastai reikėtų kur kas aukštesnės temperatūros ar slėgio. Todėl daugiau dėmesio reikėtų skirti peroksi- grupės medžiagoms. Sterilizuotas pasėlis užima didelį paviršiaus plotą.

Pasėlis

26. Aktyvusis dumblas bendroms reikmėms turėtų būti imamas iš tinkamai veikiančio nuotekų valymo įrenginio, į kurį patenka daugiausia buitinės nuotekos, aeracijos rezervuaro išleidimo angos arba arti jos. Atsižvelgiant į bandymo tikslą, gali būti naudojamas ir kitų tinkamų rūšių arba iš kitų šaltinių gautas, pvz., laboratorijoje išaugintas aktyvusis dumblas. Tinkama suspenduotų dumblo kietųjų medžiagų koncentracija yra 2–4 g/l. Tačiau iš kelių valymo įrenginių surinktas dumblas veikiausiai turėtų skirtingų savybių, skirtingi jo jautris įvairiam poveikiui.
27. Dumblą galima naudoti tokį, koks jis surinktas, tačiau reikėtų pašalinti stambias daleles paliekant dumblą trumpam (pvz., 5–15 min.) nusistovėti ir tada viršutinį smulkesnių kietųjų dalelių sluoksnį nupilant arba nukošiant (pvz., per 1 mm² dydžio akučių sieta). Vietoj to dumblą galima sumaišyti iki vienalytės masės, įjungus maišytuvą maždaug 15 sekundžių ar ilgiau, tačiau reikia stengtis, kad nebūtų per didelių šlyties jėgų ir temperatūros pokyčių ilgai maišant maišytuvu.

28. Dažnai reikia išplauti dumblą, pvz., jeigu jam būdingo kvėpavimo intensyvumas yra mažas. Pirmiausia reikėtų dumblą kurį laiką centrifuguoti, pvz., 10 min. apie 10 000 m/s² greičiu, kad susidarytų skaidrus paviršinis skystis ir nuotekų kietųjų medžiagų gumulas. Susidariusį paviršinį skystį reikėtų pašalinti, tada dumblą dar kartą suspenduoti vandentiekio vandenyje be chloro, sukratyti ir pašalinti plovimo vandenį dar kartą centrifuguojant bei nupilant. Jeigu reikia, plovimo ir centrifugavimo procesas kartojamas. Žinant resuspenduoto dumblo tūrį, turėtų būti nustatyta jo sausosios medžiagos masė ir dumblo koncentracija padidinta pašalinant dalį skysčio arba dumblas dar labiau atskiestas vandentiekio vandeniu be chloro, kad būtų gauta reikiama dumblo kietųjų medžiagų koncentracija – 3 g/l. Aktyvusis dumblas turėtų būti nuolat aeruojamas (pvz., 2 l/min. sparta) esant bandymo temperatūrai, ir, jeigu įmanoma, naudojamas tą pačią dieną, kurią surinktas. Jei tai neįmanoma, dumblą reikėtų kasdien maitinti sintetinių nuotekų mitybine terpe (į 1 l aktyviojo dumblo dedama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės) ir jį laikyti galima ne ilgiau kaip dar dvi dienas. Tada dumblas naudojamas bandymui ir, jeigu jo aktyvumas (vertinant pagal jam būdingo heterotrofinio ir nitrifikacinio kvėpavimo intensyvumą) reikšmingai nepakitę, bandymo rezultatai pripažįstami tinkamais.
29. Gali kilti sunkumų tuo atveju, jeigu inkubuojamas dumblas užputoja tiek, kad putas ir į jas patekusios kietosios dumblo dalelės išsiveržia iš aeracijos rezervuarų. Kai kada putojimą gali sukelti vien sintetinės nuotekos, tačiau putojimo taip pat reikėtų tikėtis tada, kai bandomoji cheminė medžiaga yra paviršinio aktyvumo medžiaga arba jos sudėtyje yra paviršinio aktyvumo medžiagų. Iš bandymo mišinių pašalinus dalį kietųjų dumblo medžiagų, dirbtinai sumažinamas dumblo kvėpavimo intensyvumas ir tai gali būti klaidingai palaikyta slopinamojo poveikio rezultatu. Be to, aeruojant paviršinio aktyvumo medžiagos tirpalą, ta medžiaga kaupiasi putų sluoksnyje, todėl efektyvioji jos koncentracija sumažėja pašalinus putas iš bandymo sistemos. Putojimą galima kontroliuoti paprastais mechaniniais būdais (pvz., kartais rankomis pamaišant stikline lazdele) arba įdedant silikoningą emulsijos priešpučio, kurio sudėtyje nėra paviršinio aktyvumo medžiagų, ir (arba) taikant kratomos kolbos aeravimo metodą. Jeigu putojimo problema kyla dėl naudojamų sintetinių nuotekų, reikėtų pakeisti nuotekų sudėtį pridedant priešpučio reagento, pvz., 50 µl/l. Jeigu putojimą sukelia pati bandomoji cheminė medžiaga, putojimui sustabdyti reikalingą priešpučio kiekį reikėtų nustatyti didžiausiai bandomosios medžiagos koncentracijai ir tada visus atskirus aeracijos rezervuarus (įskaitant tuos, kuriuose nesusidaro putų, pvz., tuščių kontrolinių ir etaloninių bandinių indus) apdoroti vienodai. Jeigu naudojami priešpučiai, neturėtų būti sąveikos tarp jų ir pasėlio ir (arba) bandomosios cheminės medžiagos.

BANDYMO PROCEDŪRA

30. Galima nustatyti trijų skirtingų rūšių deguonies sugerties – bendrosios, tik heterotrofinės ir tik nitrifikacinės – slopinimą. Paprastai turėtų pakakti išmatuoti bendrąjį deguonies sugerties slopinimą. Poveikį heterotrofinei deguonies sugeriai, vykstančiai dėl organinės anglies oksidacijos ir amonio oksidacijos, būtina nustatyti tada, kai konkrečiai reikia gauti šias dvi atskiras konkrečios cheminės medžiagos tyrimo vertinamąsias baigtis arba (nebūtinai) paaiškinti neįprastas dozės ir atsako santykio kreives, gautas išmatavus bendrosios deguonies sugerties slopinimą.

Bandymo sąlygos

31. Bandymas turėtų būti atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje.

Bandymo mišiniai

32. Bandymo mišiniai (F_T 1 lentelėje) iš vandens, sintetinių nuotekų mitybinės terpės ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti ruošiami taip, kad būtų gautos įvairios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vardinės vertės (mišinio sudedamųjų dalių kiekių pavyzdį žr. 1 lentelėje). Jeigu reikia, pH patikslinamas iki $7,5 \pm 0,5$; mišinius reikėtų atskiesti vandeniu ir įdėti pasėlio tiek, kad galutinis mišinio tūris būtų vienodas visuose induose. Tada indai pradedami aeruoti.

Etaloninės medžiagos mišiniai

33. Mišiniai (F_R) su etalonine chemine medžiaga, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, vietoj bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti ruošiami taip pat, kaip ir bandomieji mišiniai.

Tušti kontroliniai bandiniai

34. Tuščius kontrolinius bandinius (F_b) reikėtų paruošti bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje atliekant bandymus, kuriems bandymo indai ruošiami tam tikra seka nustatytais laiko intervalais. Kai naudojant bandymo įrangą deguonies suvartojimą galima matuoti vienu metu keliuose bandiniuose, bent po du tuščius kontrolinius bandinius reikėtų įtraukti į kiekvieną atskirą vienu metu analizuojamų bandinių grupę. Į tuščius kontrolinius bandinius dedama po vienodą aktyviojo dumblo ir sintetinės terpės kiekį, tačiau nededama bandomosios ar etaloninės cheminės medžiagos. Juos reikėtų atskiesti vandeniu iki bandomųjų ir etalonių medžiagų mišinių tūrio.

Abiotinė kontrolė

35. Kai būtina, pavyzdžiui, žinant arba įtariant, kad bandomoji cheminė medžiaga turi stipriai redukuojančių savybių, reikėtų paruošti F_A mišinį abiotiniam deguonies suvartojimui matuoti. Bandomosios cheminės medžiagos ir sintetinių nuotekų mitybinės terpės kiekiai šiame mišinyje bei jo tūris turėtų būti tokie patys, kaip ir bandomųjų mišinių, tačiau į jį nededama aktyviojo dumblo.

Bendra darbo tvarka ir matavimai

36. Bandomųjų ir etalonių medžiagų mišiniai, taip pat tušti ir abiotiniai kontroliniai bandiniai inkubuojami bandymo temperatūroje, dirbtinės aeracijos (0,5–1 l/min.) sąlygomis, siekiant palaikyti ištirpusio deguonies koncentraciją, viršijančią 60–70 % soties vertę, ir kad dumblo gumulėliai visą laiką būtų suspenduoti. Taip pat, kad dumblo gumulėliai būtų suspenduoti, paruoštas kultūras būtina maišyti. Inkubacinis periodas prasideda nuo tada, kai aktyviojo dumblo pasėlis iš pradžių sumaišomas su kitomis galutinio mišinio sudedamosiomis dalimis. Po inkubacinio periodo, praėjus nustatytam bandomosios medžiagos veikimo laikui (paprastai 3 valandoms), paimami ėminiai ir ištirpusio deguonies koncentracijos sumažėjimas išmatuojamas specialioje kameroje (3 priedėlio 2 pav.) arba visiškai pripildytame BOD butelyje. Inkubacinio periodo pradžios eiga taip pat priklauso nuo turimos įrangos gebos matuoti deguonies vartojimo greitį. Pavyzdžiui, jeigu turimas tik vienas deguonies zondas, matavimai atliekami atskirai. Šiuo atveju reikėtų paruošti įvairius bandymui reikalingus sintetinių nuotekų mišinius, tačiau į juos nedėti pasėlio ir reikiamas dumblo porcijas atskirai įdėti į kiekvieną tos serijos bandymo indą. Kiekvieno indo inkubacija turėtų būti pradedama paeiliui patogiais laiko intervalais, pvz., kas 10–15 min. Kitu atveju matavimo sistemoje gali būti keli zondai, todėl galima vienu metu atlikti kelis matavimus; šiuo atveju pasėlį galima vienu metu įdėti į atitinkamų grupių indus.
37. Visuose bandomųjų bei etalonių medžiagų ir tuščiuose (tačiau ne abiotinės kontrolės) mišiniuose aktyviojo dumblo koncentracijos vardinė vertė yra 1,5 g suspenduotų kietųjų medžiagų viename mišinio litre. Deguonies suvartojimą reikėtų matuoti po 3 poveikio valandų. Kaip aprašyta 5 skirsnyje, kai tinka, reikėtų atlikti matavimus po papildomų 30 minučių poveikio.

Dumblo nitrifikacinė geba

38. Siekiant nustatyti, ar dumblas yra nitrifikuojantis, ir jei taip – nitrifikacijos proceso greitį, reikėtų paruošti tokius mišinius (F_N), kurie būtų kaip tušti kontroliniai ir papildomi „kontroliniai“ mišiniai (F_N), tačiau į juos papildomai dedama 11,6 mg/l N-aliltiokarbamido. Šie mišiniai turėtų būti aeruojami ir 3 valandas inkubuojami 20 ± 2 °C temperatūroje, po to išmatuojamas deguonies sugerties greitis ir apskaičiuojamas deguonies sugerties dėl nitrifikacijos greitis.

Bandymų planai*Intervalo nustatymo bandymas*

39. Kai reikia, atliekamas išankstinis bandymas, per kurį įvertinamas deguonies vartojimo slopinimo nustatomajam bandymui tinkamų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų intervalas. Kitu atveju per išankstinį bandymą gali būti nustatyta, kad bandomoji cheminė medžiaga deguonies vartojimo neslopina, todėl nustatomojo bandymo atlikti nereikia, tačiau šiuo atveju matavimai turėtų būti atlikti trijuose didžiausios bandomosios koncentracijos (paprastai 1 000 mg/l, tačiau didžiausia koncentracija priklauso nuo to, kokius duomenis reikia gauti) kartotiniuose bandiniuose.

1 lentelė.

Išankstiniam bandymui naudojamų mišinių pavyzdžiai

Reagentas	Pradinė koncentracija				
Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas	10 g/l				
Sintetinės terpės pradinis tirpalas	Žr. 16 skirsnį				
Aktyviojo dumblo pradinė suspensija	3 g/l suspenduotų kietųjų medžiagų				
Mišinių sudedamosios dalys	Į bandomuosius indus dedami kiekiai (žr. a pastabą) ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas (ml) (19–21 skirsniai)	0,5	5	50	0	50
Sintetinių nuotekų mitybinės terpės pradinis tirpalas (ml) (16 skirsnis)	16	16	16	16	16
Aktyviojo dumblo suspensija (ml) (26–29 skirsniai)	250	250	250	250	0
Vanduo (15 skirsnis)	233,5	229	184	234	434
Bendras mišinių tūris (ml)	500	500	500	500	500
Mišinio sudedamųjų dalių koncentracijos					
Bandomosios cheminės medžiagos suspensija (mg/l) Aktyvusis dumblas (suspenduotos kietosios medžiagos) (mg/l)	10	100	1 000	0	1 000
	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) Tą pačią procedūrą reikėtų atlikti naudojant etaloninę cheminę medžiagą, kolbose gaunant F_{R1-3} mišinį.

40. Atliekant bandymą reikėtų rinktis bent tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas, pvz., 10 mg/l, 100 mg/l ir 1 000 mg/l, kartu naudojant tuščią kontrolinį bandinį ir, jei reikia, bent tris abiotinius kontrolinius bandinius su didžiausiomis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis (žr. pavyzdį 1 lentelėje). Geriausia parinkti tokią mažiausią koncentraciją, kuri neturėtų jokio poveikio deguonies vartojimui. Kai tinka, reikėtų apskaičiuoti deguonies sugerties greitį ir nitrifikacijos greitį, o tada apskaičiuoti šių procesų slopinimo lygį procentais. Atsižvelgiant į bandymo tikslą, taip pat galima paprasčiausiai nustatyti ribinės koncentracijos, pvz., 1 000 mg/l, toksiškumą. Jeigu, esant tokiai koncentracijai, statistiškai reikšmingo toksinio poveikio nėra, tolesnių bandymų su didesnėmis ar mažesnėmis koncentracijomis atlikti nebūtina. Reikia pažymėti, kad vandenyje mažai tirpios medžiagos, mišiniai, kurių sudedamosios dalys yra nevienodai tirpios vandenyje, ir lengvai išsigeriančios (adsorbuojamos) medžiagos turėtų būti dedami tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriami. Šiuo atveju nustatytą bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūrį reikėtų pakeisti skiedimui tinkamu vandeniu.

Nustatomasis bandymas

Bendrosios deguonies sugerties slopinimas

41. Atliekant šį bandymą reikėtų naudoti per išankstinį bandymą nustatytą koncentracijos verčių intervalą. Siekiant gauti tiek NOEC, tiek EC_x (pvz., EC₅₀) vertes, daugeliu atvejų rekomenduojama naudoti šešis kontrolinius bandinius ir penkis bandomosios medžiagos koncentracijas, nustatytas geometrinės progresijos seka, paruošiant penkis kartotinius bandinius. Abiotinės kontrolės kartoti nereikia, jeigu per išankstinį bandymą abiotinės deguonies sugerties nenustatyta; tačiau jeigu nustatyta reikšminga abiotinė deguonies sugertis, reikėtų paruošti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos abiotinius kontrolinius bandinius. Dumblo jautrį reikėtų patikrinti naudojant etaloninę cheminę medžiagą 3,5-dichlorfenolį. Reikėtų tikrinti kiekvienos bandymų serijos dumblo jautrį, nes yra žinoma, kad jis kinta. Visais atvejais po 3 valandų (ir, jei reikia, papildomų 30 minučių) iš bandymo indų paimami ėminiai ir deguonies sugerties greitis išmatuojamas kameroje su deguonies elektrodu. Pagal gautus duomenis apskaičiuojamas konkretus kontrolinių ir bandomųjų mišinių kvėpavimo intensyvumas, tada apskaičiuojamas procentinis slopinimo lygis pagal 7 lygtį (pateikta toliau).

Heterotrofinio kvėpavimo ir nitrifikacijos slopinimo skyrimas

42. Naudojant specialų nitrifikacijos inhibitorių ATU galima tiesiogiai įvertinti bandomųjų cheminių medžiagų slopinamąjį poveikį heterotrofinei oksidacijai, o atimant deguonies sugerties greitį, veikiant ATU, iš bendrosios sugerties greičio (be ATU) galima apskaičiuoti poveikį nitrifikacijos greičiui. Reikėtų paruošti du reakcijos mišinių rinkinius pagal 41 skirsnyje aprašytus bandymo planus, skirtus EC_x arba NOEC nustatyti, tačiau viename iš šių rinkinių reikėtų į kiekvieną mišinį papildomai įdėti ATU (galutinė šios medžiagos koncentracija turėtų būti 11,6 mg/l; įrodyta, kad ji visiškai nuslopina nitrifikaciją dumble, kurio suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracija siekia iki 3 000 mg/l) (4). Deguonies sugerties greitis turėtų būti matuojamas po bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio; šios tiesioginės vertės parodo tik heterotrofinį kvėpavimą, o skirtumai tarp jų ir atitinkamo bendrojo kvėpavimo intensyvumo reiškia nitrifikaciją. Tada apskaičiuojami įvairūs slopinimo laipsniai.

Matavimai

43. Po bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio (-ių) reikėtų iš pirmojo aeracijos rezervuaro paimtą ėminį perkelti į kamerą su deguonies elektrodu (2 priedėlio 1 pav.) ir iškart išmatuoti ištirpusio deguonies koncentraciją. Naudojant kelių elektrodų sistemą, matavimus galima atlikti vienu metu. Maišyti (naudojant dengtą magnetą) būtina ta pačia sparta, kaip ir kalibruojant elektrodą, taip užtikrinant, kad zondas kuo mažiau vėluodamas reaguotų į deguonies koncentracijų kaitą ir matavimo inde būtų atliekami reguliarūs bei atkuriami deguonies matavimai. Paprastai pakanka savimaišio zondo sistemos su keliais deguonies elektrodais. Kameras tarp matavimų reikėtų išplauti vandeniu. Vietoj to ėminį galima įpilti į BDS butelį (3 priedėlio 2 pav.) su magnetiniu maišikliu. Tada reikėtų į kolbos kaklelį įstatyti deguonies zondą su adapteriu (mova) ir įjungti magnetinį maišiklį. Abiem atvejais ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti nuolat matuojama ir registruojama tam tikrą laiką tarpą, paprastai 5–10 minučių arba iki tol, kol deguonies koncentracija sumažės iki mažiau nei 2 mg/l. Tada, jeigu reikia atlikti matavimus po ilgesnių veikimo laikotarpių, reikėtų išimti elektrodą, mišinį grąžinti į aeracijos rezervuarą ir toliau aeruoti bei maišyti.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos patikrinimas

44. Dėl tam tikrų priežasčių gali reikėti išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo induose. Pažymėtina, kad jeigu naudojami pradiniai tirpalai, paruošti iš:

- vandenyje mažai tirpių medžiagų,
- mišinių, kurių sudedamosios dalys nevienodai tirpios vandenyje, arba
- vandenyje labai tirpių medžiagų, kurių pradinio tirpalo koncentracija yra artima tirpumo vandenyje ribai,

tokiu atveju vandenyje ištirpusi dalis ir faktinė į bandymo indus perkeliama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra nežinomos. Siekiant apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį, reikia analitiškai įvertinti jos koncentracijas bandymo induose. Kad būtų paprasčiau, šį analitinį vertinimą reikėtų atlikti prieš dedant pasėlį. Kadangi į bandymo indus pateks tik ištirpusios bandomosios medžiagos dalys, išmatuotos jos koncentracijos gali būti labai mažos.

45. Kad nereikėtų atlikti ilgai trunkančios ir brangiai kainuojančios analizės, patartina paprasčiausiai dėti bandomąją cheminę medžiagą tiesiai į bandymo indus ir juose pasverti, o tada šia iš pradžių pasvėrus nustatyta vardine koncentracija remtis atliekant vėlesnius skaičiavimus. Ištirpusių, neištirpusių ar išgėrusių (adsorbuotų) bandomosios cheminės medžiagos dalių skirti nebūtina, nes visos šios dalys taip pat susidaro nuotekų valymo įrenginyje natūraliomis sąlygomis ir gali skirtis priklausomai nuo nuotekų sudėties. Šiuo bandymo metodu siekiama pagrįstai įvertinti neslopinančią bandomosios medžiagos koncentraciją, tačiau jis netinka, kai reikia išsamiai ištirti, kurios tos medžiagos dalys prisideda prie slopinamojo poveikio aktyviojo dumblo organizmams. Galiausiai pažymėtina, kad lengvai išigeriančias (adsorbuojamas) medžiagas taip pat reikėtų pasverti tiesiai bandymo induose, kurie turėtų būti silanizuoti, kad dėl įgerties būtų prarasta kuo mažiau medžiagos.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Degūnės sugerties greičio apskaičiavimas

46. Degūnės sugerties greitis turėtų būti apskaičiuojamas naudojant išmatuotų verčių vidurkį, pvz., pagal degūnės koncentracijos kaip laiko funkcijos grafiko tiesinę dalį, atliekant skaičiavimus tik 2,0–7,0 mg/l degūnės koncentracijų intervale, nes nuo didesnių arba mažesnių koncentracijų savaime gali priklausyti degūnės vartojimo greitis. Kartais neišvengiamai būtina rinktis už šias vertes mažesnių arba didesnių koncentracijų intervalus, pavyzdžiui, kai kvėpavimas yra stipriai slopinamas, todėl labai lėtas, arba kai tam tikras aktyvusis dumbblas kvėpuoja labai intensyviai. Tai yra priimtina, jeigu degūnės sugerties grafike nubrėžtos papildomos atkarpos yra tiesės, kurių nuolydis nesikeičia ir už O_2 2,0 arba 7,0 mg/l ribos. Bet kokių kreivių atsiradimas grafike reiškia, kad matavimo sistema stabilizuojasi arba kad degūnės sugerties greitis kinta ir jo nereikėtų naudoti apskaičiuojant kvėpavimo intensyvumą. Degūnės sugerties greitį reikėtų išreikšti miligramais vienam litrui per valandą (mg/l/val.) arba miligramais vienam dumblo sausosios medžiagos masės gramui per valandą (mg/g/val.). Degūnės suvartojimo greitis R (mg/l/val.) gali būti apskaičiuojamas arba interpoliuojamas iš nustatyto degūnės kiekio mažėjimo grafiko tiesinės dalies pagal 1 lygtį:

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

kurioje:

Q_1 yra degūnės koncentracija (mg/l) grafiko tiesinės dalies pasirinktos atkarpos pradžioje;

Q_2 – degūnės koncentracija (mg/l) grafiko tiesinės dalies pasirinktos atkarpos pabaigoje;

Δt – laiko intervalas (min.) tarp abiejų matavimų.

47. Konkretus kvėpavimo intensyvumas (R_s) išreiškiamas kaip suvartoto degūnės kiekis vienam dumblo sausosios medžiagos masės gramui per valandą (mg/g/val.) pagal 2 lygtį:

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

kurioje SS yra bandymo mišinyje suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracija (g/l).

48. Įvairūs R rodikliai, kuriuos galima taikyti kartu, yra:

S savitasis degūnės vartojimo greitis

T bendrojo kvėpavimo intensyvumas

N nitrifikacinio kvėpavimo intensyvumas

H heterotrofinio kvėpavimo intensyvumas

A degūnės sugerties dėl abiotinių procesų greitis

B iš tuščių bandinių nustatytas (vidutinis) greitis

Nitrifikacinės degūnės sugerties greičio apskaičiavimas

49. Bendrojo kvėpavimo (R_T), nitrifikacinio kvėpavimo (R_N) ir heterotrofinio kvėpavimo (R_H) santykis gaunamas pagal 3 lygtį:

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

kurioje:

R_N yra nitrifikacinės deguonies sugerties greitis (mg/l/val.);

R_T – tuščiame kontroliniame bandinyje išmatuotas deguonies sugerties greitis (nenaudojant ATU; F_B) (mg/l/val.);

R_H – tuščiame kontroliniame bandinyje išmatuotas deguonies sugerties greitis naudojant ATU (F_N) (mg/l/val.).

50. Šis santykis tinka matuojant tuščiųjų bandinių vertes (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), abiotinius kontrolinius bandinius (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) ir bandinius su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/g/val.). Savitasis kvėpavimo intensyvumas apskaičiuojamas pagal:

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

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

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

51. Jeigu per išankstinį bandymą R_N yra nereikšmingas (pvz., $< 5\%$ R_T tuščiuose kontroliniuose bandiniuose), galima daryti prielaidą, kad heterotrofinė deguonies sugertis prilygsta bendrajai sugerčiai ir nitrifikacijos procesas nevyksta. Iš kito šaltinio paimtą aktyvųjų dumblių reikėtų naudoti tuo atveju, jeigu atliekant bandymus reikia atsižvelgti į poveikį heterotrofiniams ir nitrifikuojantiems mikroorganizmams. Jeigu yra įrodymų, kad deguonies sugerties greitis slopinamas esant įvairioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms, atliekamas nustatomasis bandymas.

Slopinimo procentinio lygio apskaičiavimas

52. Bendrojo deguonies vartojimo slopinimo, esant kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, procentinis lygis (I_T) nustatomas pagal 7 lygtį:

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

53. Heterotrofinės deguonies sugerties slopinimo, esant kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, procentinis lygis (I_H) panašiai gaunamas pagal 8 lygtį:

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

54. Galiausiai deguonies sugerties dėl nitrifikacijos slopinimas (I_N), esant kiekvienai koncentracijai, gaunamas pagal 9 lygtį:

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

55. Deguonies sugerties slopinimo procentinį lygį reikėtų pavaizduoti grafike kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmo funkciją (slopinimo kreivė, žr. 4 priedėlio 3 pav.). Slopinimo kreivės brėžiamos po kiekvieno aeravimo periodo (3 val.) arba po papildomų 30 min. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant deguonies sugertis nuslopinama 50 % (EC_{50}), turėtų būti apskaičiuojama arba interpoliuojama pagal grafiką. Jeigu yra tinkamų duomenų, galima apskaičiuoti arba interpoliuoti EC_{50} 95 % pasiklivimo ribas, kreivės nuolydį ir atitinkamas vertes slopinimo pradžioje (pvz., EC_{10} arba EC_{20}) ir slopinimo intervalo pabaigoje (pvz., EC_{80} arba EC_{90}).

56. Pažymėtina, kad dėl dažnai pastebimo rezultatų kintamumo daugeliu atvejų gali pakakti papildomai išdėstyti rezultatus didėjimo tvarka, pvz.:

$EC_{50} < 1$ mg/l

EC_{50} nuo 1 mg/l iki 10 mg/l

EC_{50} nuo 10 mg/l iki 100 mg/l

$EC_{50} > 100$ mg/l

Rezultatų aiškinimas EC_x

57. EC_x vertės, įskaitant susijusias atitinkamo parametro žemutinę ir viršutinę 95 % pasiklivimo ribas, apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Kärber metodą arba paprastąją interpoliaciją (11)). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC_{50} ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių (x) regresinė analizė.

NOEC įvertinimas

58. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC, reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Turėtų būti taikomi tinkami statistiniai metodai pagal EBPO „Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“ (dokumentas, kuriame rašoma apie dabartinius ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės metodus – jų taikymo gairės) (11). Apskritai bandomosios cheminės medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienvių (trumpesnį) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$.

Bandymo ataskaita

59. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- Bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, grynumas.
- Bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., $\log K_{ow}$, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsno konstanta (H) ir galima informacija apie bandomosios cheminės medžiagos išlikimą aplinkoje, pvz., įgertį į aktyvųjį dumblą).

Bandymo sistema

- Aktyviojo dumblo šaltinis, atitinkamo nuotekų valymo įrenginio veikimo sąlygos ir į jį patenkančios nuotekos, aktyviojo dumblo koncentracija, išankstinis apdorojimas ir priežiūra.

Bandymo sąlygos

- Bandymo temperatūra, pH lygis bandymo metu ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio (-ių) trukmė.

Rezultatai

- Savitasis kontrolinių bandinių deguonies vartojimas ($\text{mg O}_2/(\text{g dumblo} \times \text{val.})$).
- Visi matavimų duomenys, slopinimo kreivė (-ės) ir EC_{50} apskaičiavimo metodas.
- EC_{50} ir, jeigu įmanoma, 95 % pasiklivimo ribos, galbūt EC_{20} , EC_{80} ; galbūt NOEC ir taikyti statistiniai metodai, jeigu EC_{50} nustatyti neįmanoma.
- Bendrojo ir, kai tinka, heterotrofinio kvėpavimo bei nitrifikacijos slopinimo nustatymo rezultatai.
- Abiotinė deguonies sugertis kontroliniame fizikinių ir cheminių savybių tyrimo bandinyje (jeigu naudojamas).
- Etaloninės cheminės medžiagos pavadinimas ir ją naudojant gauti rezultatai.
- Bet kokie pastebėjimai ir nukrypimai nuo standartinės procedūros, galėję turėti įtakos bandymo rezultatui.

NUORODOS

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

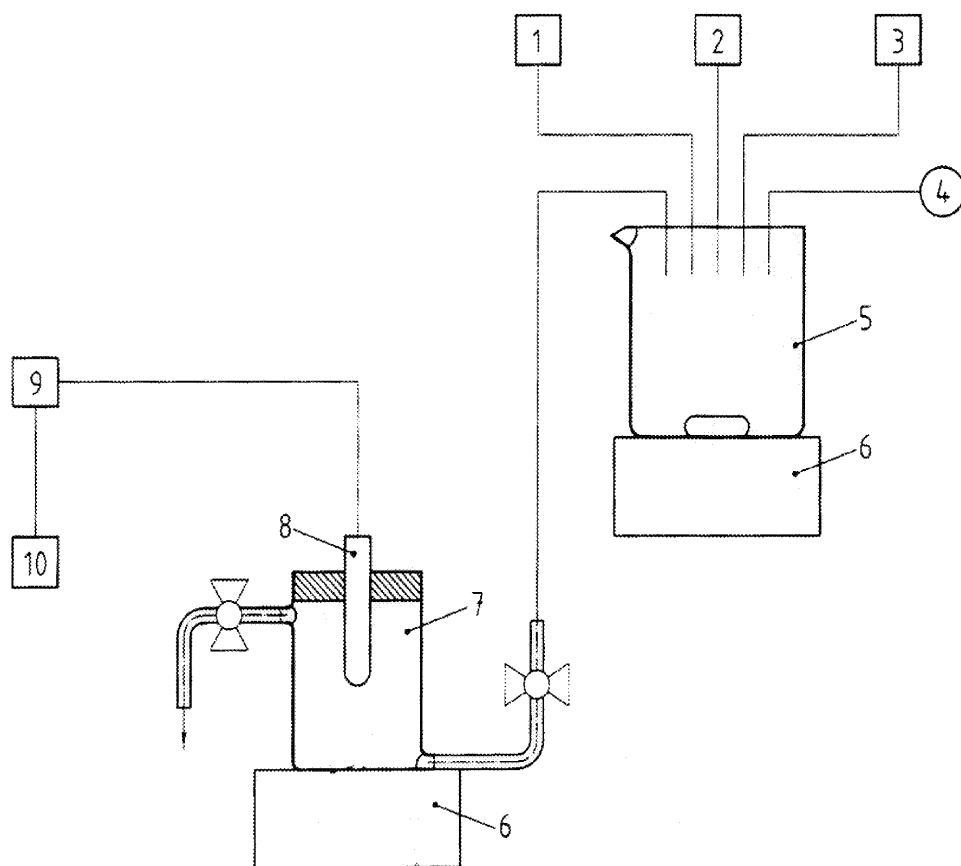
EC_x (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadarо statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

1 pav. Matavimo prietaiso pavyzdys

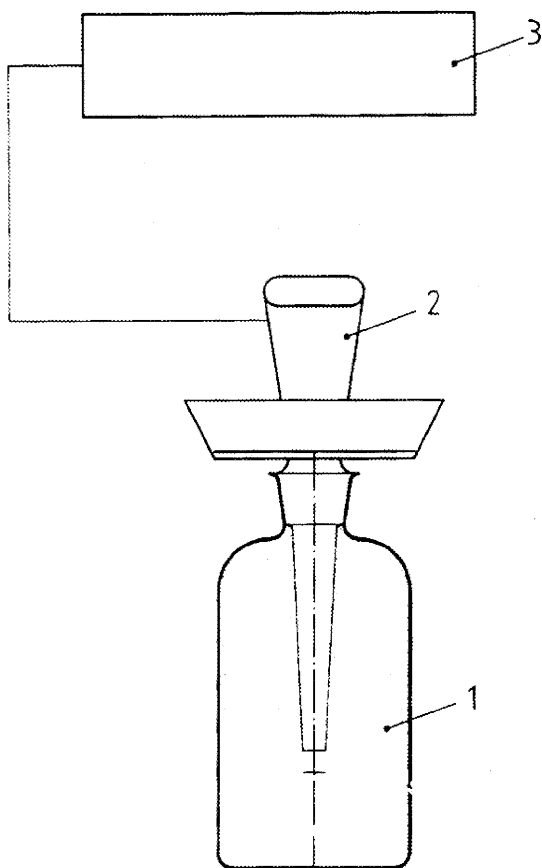


Paaiškinimas

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1 aktyvusis dumblas | 6 magnetinis maišiklis |
| 2 sintetinė terpė | 7 deguonies matavimo kamera |
| 3 bandomoji cheminė medžiaga | 8 deguonies elektrodas |
| 4 oras | 9 deguonies matuoklis |
| 5 maišymo indas | 10 savirašis |

3 priedėlis

2 pav. Su BDS buteliu naudojamą matavimo prietaisą pavyzdys

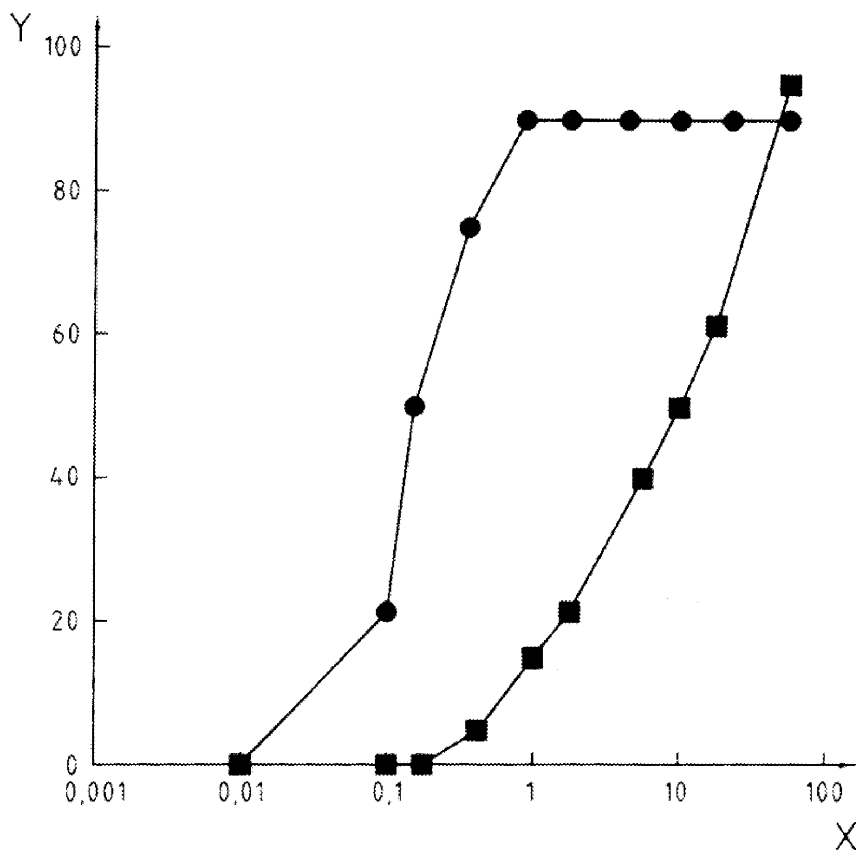


Paaiškinimas

- 1 bandymo indas
- 2 deguonies elektrodas
- 3 deguonies matuoklis

4 priedėlis

3 pav. Slopavimo kreivių pavyzdys



Paaiškinimas

X 3,5-dichlorfenolio koncentracija (mg/l)

Y slopinimo lygis (%)

■ heterotrofinio kvėpavimo slopinimas naudojant nitrifikuojantį dumblą

● nitrifikacijos slopinimas naudojant nitrifikuojantį dumblą.

5) C.26 skyrius pakeičiamas taip:

„C.26 LEMNA RŪŠIŲ AUGALŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 221 (2006). Jis skirtas cheminių medžiagų toksiškumui *Lemna* (plūdenų) genties gėlo vandens augalams vertinti. Jis pagrįstas esamais metodais (1), (2), (3), (4), (5), (6), tačiau į jį įtraukti tų metodų pakeitimai, atsižvelgiant į naujus mokslinius tyrimus ir konsultacijas keliais svarbiais klausimais. Šio bandymo metodo tinkamumas patvirtintas tarptautiniu tarplaboratoriniu bandymu (7).

2. Pagal šį bandymo metodą atliekami toksiškumo bandymai naudojant *Lemna gibba* ir *Lemna minor* rūšių augalus; abi rūšys yra plačiai iširtos ir joms taikomi minėti standartai. *Lemna* spp. klasifikacija yra sudėtinga dėl didelės fenotipų įvairovės. Nors *Lemna* atsakas į nuodingųjų medžiagų poveikį gali priklausyti nuo genetinio kintamumo, kol kas nepakanka duomenų apie šio kintamumo pobūdį, kad bandymams pagal šį metodą būtų galima rekomenduoti konkretų kloną. Pažymėtina, kad nors šie bandymai nėra atliekami steriliai, įvairiuose bandymo proceso etapuose imamasi priemonių užkėtimui kitais organizmais, kiek įmanoma, sumažinti.
3. Išsamiai aprašyta šio bandymo atlikimo atnaujinant bandymo tirpalą (pusiau stacionarusis ir pratekamojo srauto bandymas) ir jo neatnaujinant (stacionarusis bandymas) tvarka. Atsižvelgiant į bandymo tikslus ir norminius reikalavimus, rekomenduojama apsvarstyti galimybę taikyti pusiau stacionarųjį ir pratekamojo srauto metodus, jeigu, pvz., cheminės medžiagos greitai dingsta iš tirpalo dėl garavimo, fotocheminio skilimo, nuosėdų susidarymo ar biologinio skaidymo. Papildomų gairių pateikta literatūroje (8).
4. Taikant šį metodą vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

5. Eksponentiškai augančios *Lemna* genties augalų monokultūros septynias paras auginamos veikiant įvairių koncentracijų bandomajai cheminei medžiagai. Šio bandymo tikslas – kiekybiškai įvertinti cheminės medžiagos poveikį augalų vegetatyviniam augimui per tą laikotarpį remiantis pasirinktų matuojamų kintamųjų vertinimais. Pagrindinis matuojamas kintamasis yra augalų gniūžulų skaičius. Kartu su juo matuojamas dar bent vienas kintamasis (bendras gniūžulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė), nes kai kurios cheminės medžiagos gali paveikti kitus matuojamus kintamuosius kur kas labiau nei gniūžulų skaičių. Siekiant kiekybiškai išreikšti cheminės medžiagos poveikį, augalų augimas bandymo tirpaluose palyginamas su kontrolinės grupės augimu ir nustatoma konkretų $x\%$ (pvz., 50 %) augimo slopinimą sukelianti tos cheminės medžiagos koncentracija, kuri išreiškiama EC_x (pvz., EC_{50}).
6. Bandymo vertinamoji baigtis yra augalų augimo slopinimas, išreiškiamas kaip logaritminis matuojamo kintamojo didėjimas (vidutinis savitasis augimo greitis) bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu. Pagal vidutinius savituosius augimo greičius, išmatuotus naudojant bandymo tirpalų seriją, nustatoma konkretų augimo greičio sumažėjimą $x\%$ (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_rC_x (pvz., E_rC_{50}).
7. Taikant šį bandymo metodą naudojamas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kurią gali reikėti nustatyti pagal kai kurių valstybių konkrečius norminius reikalavimus. Išeiga apibrėžiama kaip matuojamų kintamųjų skirtumas, atsiradęs nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios iki pabaigos. Pagal išeigą, nustatytą naudojant bandymo tirpalų seriją, apskaičiuojama konkretų procentinį išeigos sumažėjimą $x\%$ (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).
8. Be to, galima statistiškai nustatyti mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

9. Turėtų būti taikomas pakankamo jautrio analizės metodas cheminės medžiagos kiekiui bandymo terpėje nustatyti.
10. Nustatant bandymo sąlygas gali būti naudinga žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą: jos struktūrinę formulę, grynumą, tirpumą vandenyje, stabilumą veikiant vandeniui ir šviesai, disociacijos konstantą, oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą, garų slėgį ir biologinį skaidumą. Tirpumo vandenyje ir garų slėgio duomenis galima panaudoti apskaičiuojant Henrio dėsnio konstantą, iš kurios būtų aišku, ar yra tikimybė per bandymo laikotarpį netekti didelio bandomosios cheminės medžiagos kiekio. Tai padėtų nustatyti, ar reikia imtis konkrečių priemonių tokiems nuostoliams mažinti. Jeigu turima informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tirpumą ir stabilumą kelia abejonų, patartina įvertinti šias savybes bandymo sąlygomis, t. y. bandymui naudojamoje auginimo terpėje, esant bandymo temperatūrai ir apšvietimo režimui.

11. Jeigu itin svarbu kontroliuoti bandymo terpės pH lygį, pvz., atliekant metalų arba vandenyje nepatvarių cheminių medžiagų bandymus, į auginimo terpę rekomenduojama įpilti buferinio tirpalo (žr. 21 skirsnį). Daugiau gairių, kaip atlikti bandymus su cheminėmis medžiagomis, kurias tirti yra sunkiau dėl jų fizikinių ir cheminių savybių, pateikta literatūroje (8).

BANDYMO TINKAMUMAS

12. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu augalų gniužulų skaičius kontroliniuose bandiniuose padvigubėja greičiau nei per 2,5 paros (60 val.), taigi per septynias paras padidėja maždaug septynis kartus, o vidutinis savitasis augimo greitis yra $0,275 \text{ para}^{-1}$. Šio bandymo metodo aprašyme nurodytų terpių ir bandymo sąlygomis šį kriterijų gali atitikti stacionarusis bandymas (5). Taip pat numatoma, kad šį kriterijų gali atitikti ir pusiau stacionariosiomis bei pratekamojo srauto sąlygomis atliekami bandymai. Kaip apskaičiuojama gniužulų dvigubėjimo trukmė, parodyta 49 skirsnyje.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

13. Bandymo procedūrai patikrinti galima atlikti bandymą su etalonine chemine medžiaga arba medžiagomis, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, kuris naudotas per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (7). Etaloniškos cheminės medžiagos bandymą patartina atlikti bent dukart per metus arba, jeigu rečiau, – tuo pačiu metu, kai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

14. Visa įranga, kuri liečiasi su bandymo terpėmis, turėtų būti pagaminta tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Augalų kultūroms auginti ir bandymams naudojami stikliniai indai turėtų būti išvalyti, kad juose neliktų cheminių medžiagų priemaišų, kurios galėtų būti išplautos į bandymo terpę, ir sterilūs. Bandymui turėtų būti naudojami pakankamai platūs indai, kad atskirų kolonijų gniužulai kontrolinės grupės induose iki bandymo pabaigos augtų nesudarydami sanklotos. Nesvarbu, ar augalų šaknys siekia bandymo indo dugną, ar ne, tačiau patartina naudoti ne mažiau kaip 20 mm gylio ir 100 ml tūrio indus. Galima rinktis bet kokius bandymo indus, kurie atitinka šiuos reikalavimus. Iš praktikos žinoma, kad tinka reikiamų matmenų cheminės stiklinės, kristalizatoriai arba stiklinės Petri lėkštelės. Bandymo indai turi būti uždengti, siekiant kuo labiau sumažinti garavimą ir apsaugoti nuo atsitiktinio užteršimo, tačiau juose turi pakankamai cirkuliuoti oras. Tinkami bandymo indai ir ypač jų dangčiai neturi mesti šešėlių ar keisti šviesos spektrinių savybių.
15. Kultūrų auginimo ir bandymo indų nereikėtų laikyti kartu; geriausia naudoti atskiras klimatinės auginimo kameras, inkubatorius arba patalpas. Apšvietimas ir temperatūra turi būti reguliuojami ir pastovūs (žr. 35–36 skirsnius).

Bandomieji organizmai

16. Šiam bandymui naudojami *Lemna gibba* arba *Lemna minor* rūšies organizmai. Toksiškumo bandymams naudojamos plūdenų rūšys glaustai aprašytos 2 priedėlyje. Augalų medžiaga gali būti gauta iš kultūrų rinkinio, kitos laboratorijos arba iš lauko. Jei augalai surinkti lauke, jų kultūrą reikėtų bent aštuonias savaites iki naudojimo laikyti tokioje pačioje terpėje, kokia bus naudojama bandymui. Lauko vietose, iš kurių renkamos pradinės kultūros, neturi būti jokių pastebimų taršos šaltinių. Iš kitos laboratorijos arba kultūrų rinkinio gautas kultūras reikėtų tokia pačia tvarka laikyti mažiausiai tris savaites. Bandymo ataskaitoje reikėtų visuomet nurodyti bandymui naudotas augalų medžiagos šaltinį, rūšį ir kloną (jei žinomas).
17. Turėtų būti naudojamos monokultūros be pastebimų užkrėtimo kitais organizmais, kaip antai dumbliais ir pirmuonimis, požymių. Sveiki *L. minor* rūšies augalai sudaro 2–5 gniužulų kolonijas, o sveikose *L. gibba* kolonijose gali būti iki 7 gniužulų.
18. Bandymo rezultatas labai priklauso nuo bandymui naudojamų augalų kokybės ir vienodumo, todėl reikėtų kruopščiai atrinkti augalus. Turėtų būti naudojami jauni, sparčiai augantys augalai be matomų pažeidimų ar spalvos pakitimų (chlorozės). Aukštos kokybės kultūrų požymis – daug kolonijų, kuriose yra bent po du gniužulus. Vieno gniužulo kolonijų gausa yra aplinkos sukeltos streso, pvz., mitybinių medžiagų trūkumo, požymis, todėl tokių kultūrų augalų medžiagos bandymams naudoti nereikėtų.

Auginimas

19. Kad augalų kultūroms reikėtų mažiau priežiūros (pvz., jei kurį laiką neketinama atlikti bandymų su *Lemna*), jas galima laikyti prietemoje ir žemesnėje (4–10 °C) temperatūroje. Kultūrų auginimas išsamiai aprašytas 3 priedėlyje. Kai yra akivaizdžių užkrėtimo dumbliais ar kitais organizmais požymių, gali reikėti paimti dalinę *Lemna* gniužulų ėminį, atlikti paviršinių sterilizavimą ir perkelti jį į šviežią terpę (žr. 3 priedėlį). Tokiu atveju likusią užkrėstą kultūrą reikėtų pašalinti.
20. Iki bandymo likus bent septynioms paroms, pakankamai kolonijų steriliu būdu perkeliama į šviežią sterilią terpę, kurioje kultūra 7–10 parų auginama bandymo sąlygomis.

Bandymo terpė

21. *Lemna minor* ir *Lemna gibba* rekomenduojama naudoti skirtingas terpes, kaip aprašyta toliau. Reikėtų kruopščiai apsvarstyti pH reguliuoti skirtą buferinio tirpalo (MOPS (4-morfolinpropansulfonrūgšties, CAS Nr. 1132-61-2) – *L. minor* terpėje, NaHCO₃ – *L. gibba* terpėje) naudojimą bandymo terpėje, jeigu įtariama, kad jis gali reaguoti su bandomąja chemine medžiaga ir paveikti jos toksiškumo savybes. Be to, galima naudoti Steinbergo terpę (9), jei ji atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.
22. *L. minor* rūšies kultūrų auginimui ir bandymams rekomenduojama naudoti modifikuotą *Lemna* auginimo terpę pagal Švedijos standartą (SIS). Šios terpės sudėtis aprašyta 4 priedėlyje.
23. *L. gibba* rūšies kultūrų auginimui ir bandymams rekomenduojama naudoti 20X-AAP auginimo terpę, kaip aprašyta 4 priedėlyje.
24. 4 priedėlyje aprašyta Steinbergo terpė taip pat tinka *L. minor*, tačiau ją galima naudoti ir *L. gibba* auginti, jei tai atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Bandymo tirpalai

25. Bandymo tirpalai paprastai ruošiami atskiedžiant pradinį tirpalą. Bandomosios cheminės medžiagos pradiniai tirpalai paprastai ruošiami ištirpinant cheminę medžiagą augalų auginimo terpėje.
26. Didžiausia bandymui pasirinkta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija paprastai neturėtų viršyti tos cheminės medžiagos tirpumo vandenyje ribos bandymo sąlygomis, tačiau pažymėtina, kad *Lemna* spp. genties augalai plūduriuoja vandens paviršiuje ir gali būti veikiami cheminių medžiagų, besikaupiančių ties vandens ir oro riba (tai, pvz., vandenyje mažai tirpios, hidrofobinės arba paviršinio aktyvumo cheminės medžiagos). Tokiomis sąlygomis augalai patirtų ne tirpale esančių, o kitų medžiagų poveikį, ir bandymo koncentracijos, priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos savybių, gali viršyti tos medžiagos tirpumo vandenyje lygį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mažai tirpi vandenyje, gali reikėti paruošti koncentruotą jos pradinį tirpalą arba dispersinę terpę naudojant organinį tirpiklį arba dispergentą, kad būtų lengviau į bandymo terpę įdėti tikslūs bandomosios cheminės medžiagos kiekius, ir siekiant palengvinti jos dispergavimą bei tirpimą. Kiek įmanoma, tokių medžiagų reikėtų vengti – bandomieji augalai neturėtų patirti fitotoksinio poveikio dėl naudojamų pagalbinių tirpiklių ar dispergentų. Įprastų tirpiklių, kurie nėra fitotoksiški, kol jų koncentracija neviršija 100 µl/l, pavyzdžiai yra acetonas ir dimetilformamidas. Jeigu naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir kuo mažesnė (≤ 100 µl/l), be to, tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų būti vienoda visuose bandomosios ir kontrolinės grupių bandiniuose. Daugiau gairių, kaip naudoti dispergentus, pateikta literatūroje (8).

Bandomosios ir kontrolinės grupės

27. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą *Lemna*, pvz., atlikus intervalo nustatymo bandymą, bus lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Nustatomajam toksiškumo bandymui paprastai reikėtų pasirinkti bent penkias bandomosios medžiagos koncentracijos vertes geometrinės progresijos seka. Patartina, kad gretimos bandymui pasirinktos koncentracijos vertės skirtųsi ne daugiau nei 3,2 karto, tačiau skirtumas gali būti ir didesnis, jei koncentracijos ir atsako kreivė yra gulsčia. Mažiau nei penkių koncentracijų naudojimą reikėtų pagrįsti. Reikėtų paruošti bent po tris kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius.

28. Nustatant bandymo koncentracijos verčių intervalą (atliekant intervalo nustatymo ir (arba) toksiškumo nustatomąjį bandymą) reikėtų atsižvelgti į šiuos dalykus:
- siekiant užtikrinti tinkamą pasikliautinąjį lygmenį, nustatoma EC_x vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą; pavyzdžiui, vertinant EC_{50} , didžiausia bandymo koncentracijos vertė turėtų viršyti EC_{50} vertę. Jeigu EC_{50} vertė nepateks į bandymo koncentracijos verčių intervalą, atitinkami pasikliautininieji intervalai bus dideli ir gali būti neįmanoma tinkamai įvertinti statistinės taikomo modelio atitikties;
 - jeigu siekiama įvertinti LOEC (NOEC), mažiausia pasirinkta bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti pakankamai maža, kad jos veikiamų augalų augimas nebūtų pastebimai lėtesnis negu kontrolinės grupės augalų, o didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti pakankamai didelė, kad jos veikiami augalai augtų kur kas lėčiau negu kontrolinės grupės augalai. Jei taip nėra, bandymą teks pakartoti nustatant kitokių koncentracijų intervalą (nebent didžiausia koncentracija atitiktų tirpumo vandenyje ribą arba būtų didžiausia privaloma ribinė koncentracija, pvz., 100 mg/l).
29. Per kiekvieną bandymą turėtų būti naudojami kontroliniai bandiniai su ta pačia mitybine terpe, gniužulų bei kolonijų skaičius juose turi būti toks pats ir aplinkos sąlygos bei procedūros tokios pačios, kaip ir bandymo induose, į juos tik nededama bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu naudojamas pagalbinis tirpiklis arba dispergentas, reikėtų paruošti papildomą kontrolinę grupę su tuo tirpikliu ar dispergentu, kurio koncentracija būtų tokia pati, kaip ir induose, į kuriuos dėta bandomosios cheminės medžiagos. Kontrolinės grupės kartotinių bandinių indų (ir, kai tinka, indų su tirpikliu) turėtų būti bent tiek pat, kiek ir kiekvienos bandymo koncentracijos indų; geriausia, kad jų būtų du kartus daugiau.
30. Jeigu nereikia nustatyti NOEC, galima pakeisti bandymo planą, padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių, tačiau turi būti ne mažiau kaip trys kartotiniai kontroliniai bandiniai.

Poveikis

31. Iš 2–4 matomų gniužulų sudarytos kolonijos paimamos iš sėjamos kultūros indo ir steriliomis sąlygomis atsitiktine tvarka paskirstomos bandymo induose. Kiekviename inde turėtų būti 9–12 gniužulų. Gniužulų ir kolonijų skaičius kiekviename bandymo inde turėtų būti vienodas. Iš šio metodo taikymo patirties ir tarplaboratorinio bandymo duomenų žinoma, kad trijų kartotinių kiekvienos bandomosios grupės bandinių, kurių kiekviename iš pradžių yra po 9–12 gniužulų, pakanka nustatyti augalų augimo bandomosiose grupėse skirtumams esant maždaug 4–7 % slopinimui, apskaičiuotam pagal augimo greitį (10–15 %, apskaičiuotas pagal išėgą) (7).
32. Siekiant, kiek įmanoma, sumažinti bandymo indų padėties erdvėje, šviesos stiprio ar temperatūros skirtumų įtaką, reikia atsitiktine tvarka išdėstyti bandymo indus inkubatoriuje. Be to, stebėjimus reikia atlikti „blokinės schemos“ tvarka arba atsitiktine tvarka sukeičiant indus vietomis (arba dažniau juos perkeltiant į kitą vietą).
33. Jeigu atlikus išankstinį stabilumo bandymą nustatyta, kad pastovios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos per visą bandymo trukmę (7 paras) palaikyti neįmanoma (t. y. matuojamoji koncentracija nesiekia 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), rekomenduojama taikyti pusiau stacionariojo bandymo režimą. Šiuo atveju bandomosios ir kontrolinės grupių tirpalai, kuriuose laikomos augalų kolonijos, turėtų būti keičiami šviežiais bent dukart per bandymą (pvz., 3 ir 5 dienomis). Terpės keitimo dažnis priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos stabilumo; labai nestabilių arba lakių cheminių medžiagų tirpalus gali reikėti keisti dažniau, siekiant palaikyti beveik vienodas jų koncentracijas. Tam tikromis aplinkybėmis bandymą gali reikėti atlikti pagal pratekamojo srauto procedūrą (8), (10).
34. Bandomosios medžiagos poveikio per augalų lapus (purškiant) scenarijus pagal šį bandymo metodą netaikomas; vietoj to žr. (11).

Inkubavimo sąlygos

35. Turėtų būti užtikrintas nuolatinis apšvietimas šiltai arba šaltai balta liuminescencinių lempų šviesa, kurios stipris būtų $85\text{--}135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intervale, matuojant fotosintezės optimalaus spektro (400–700 nm) spinduliuotę tokiu pačiu atstumu nuo šviesos šaltinio, koku nuo jo yra *Lemna* gniužulai (atitinkmuo liuksais yra 6 500–10 000 lx). Šviesos stipris virš bandymo vietos neturi kisti daugiau kaip $\pm 15\%$ pasirinkto šviesos stiprio intervalo. Išmatuota vertė priklausys nuo šviesos aptikimo ir matavimo metodo, ypač naudojamo jutiklio rūšies. Sferiniai jutikliai (reaguojantys į šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) ir „kosinusiniai“ jutikliai (reaguojantys į šviesą, krintančią visais kampais virš matavimo plokštumos) yra tinkamesni nei vienkrypčiai jutikliai, ir jais bus gauti didesni rodmenys naudojant čia aprašyto tipo daugiašakį šviesos šaltinį.

36. Temperatūra bandymo induose turėtų būti 24 ± 2 °C. Kontrolinių bandinių terpės pH per bandymą neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto, tačiau net jeigu nuokrypis būtų didesnis kaip 1,5 vieneto, bandymas vis vien būtų pripažintas tinkamu, jei tik būtų galima įrodyti atitiktį tinkamumo kriterijams. Reikia imtis papildomų atsargumo priemonių dėl pH kitimo konkrečiais atvejais, pvz., atliekant nestabilių cheminių medžiagų arba metalų bandymus. Papildomų gairių dėl to pateikta literatūroje (8).

Trukmė

37. Bandymas baigiamas po 7 parų nuo augalų perkėlimo į bandymo indus.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

38. Pradedant bandymą nustatomas ir užrašomas gniužulų skaičius bandymo induose, stengiantis išskaityti atsikišusius, aiškiai matomus gniužulus. Įprastos ir neįprastos išvaizdos gniužulų skaičių būtina nustatyti bandymo pradžioje, bent kas 3 paras bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu (t. y. bent du kartus per 7 paras) ir baigiant bandymą. Reikėtų aprašyti augalų vystymosi, pvz., gniužulų dydžio arba išvaizdos, pokyčius, nurodyti nekrozės požymius, chlorozę arba gumbuotumą, kolonijų smulkėjimą arba plūdumo netekimą, šaknų ilgį ir išvaizdą. Taip pat reikėtų nurodyti svarbias bandymo terpės savybes (pvz., jeigu bandymo inde yra neištirpusios medžiagos arba auga dumbliai).
39. Per bandymą skaičiuojant gniužulus, taip pat vertinamas bandomosios cheminės medžiagos poveikis vienam (arba daugiau) iš šių matuojamų kintamųjų:
- i) bendram gniužulų plotui;
 - ii) sausos medžiagos masė;
 - iii) šviežios medžiagos masė.
40. Bendras gniužulų plotas yra pranašesnis už kitus kintamuosius tuo, kad jį galima nustatyti kiekviename bandomosios ir kontrolinės grupių inde bandymo pradžioje, eigoje ir pabaigoje. Sausos arba šviežios medžiagos masė turėtų būti nustatoma bandymo pradžioje paimant sėjamos kultūros, naudojamos pradedant bandymą, pavyzdį ir bandymo pabaigoje paimant augalų medžiagos pavyzdžius iš kiekvieno bandomosios ir kontrolinės grupių indo. Jei gniužulų plotas nematuojamas, geriau matuoti ne šviežios, o sausos medžiagos masę.
41. Bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę ir šviežios medžiagos masę galima nustatyti toliau aprašyta tvarka.
- i) *Bendras gniužulų plotas.* Visų kolonijų gniužulų bendras plotas gali būti nustatomas išanalizuojant jų vaizdą. Galima užfiksuoti bandymo indo ir jame esančių augalų siluetą vaizdo kamera (t. y. pastačius indą ant šviesdėžės) ir gautą vaizdą apdoroti skaitmeniniu būdu, o tada kalibruojant pagal plokščius žinomo ploto vaizdus galima nustatyti bendrą gniužulų plotą. Dėl indo krašto atsiradusius trukdžius reikėtų pašalinti. Pagal kitą metodą (kurį taikant reikia įdėti daugiau darbo) padaroma bandymo indų ir juose esančių augalų fotokopija, gautas kolonijų siluetas iškerpamas ir jų plotas nustatomas naudojant lapų ploto analizatorių arba milimetrinį popierių. Gali tikti ir kiti metodai (pvz., kolonijų silueto ploto ir vienetinio ploto popieriaus masės santykio nustatymas).
 - ii) *Sausos medžiagos masė.* Visos kolonijos surenkamos iš kiekvieno bandymo indo ir nuplaunamos distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu. Pašalinus vandens perteklių sugeriamuoju popieriumi, kolonijos, įskaitant visus šaknų likučius, išdžiovinamos 60 °C temperatūroje iki pastovios masės. Sausos medžiagos masė turėtų būti nustatoma bent 0,1 mg tikslumu.
 - iii) *Šviežios medžiagos masė.* Visos kolonijos surenkamos į iš anksto pasvertus polistireno (arba kitos inertinės medžiagos) mėgintuvėlius su išgaubtais dugnais, kuriuose yra mažų (1 mm skersmens) skylių. Tada mėgintuvėliai 10 min. centrifuguojami 3 000 sūkių/min. greičiu, palaikant kambario temperatūrą. Mėgintuvėliai su nusausintomis kolonijomis pasveriami iš naujo ir šviežios medžiagos masė apskaičiuojama atimant tuščio mėgintuvėlio masę.

Matavimų ir analizinių nustatymų dažnis

42. Pagal stacionariojo bandymo planą kiekvieno bandomosios grupės indo pH vertė turėtų būti išmatuota pradedant ir baigiant bandymą. Pagal pusiau stacionariojo bandymo planą reikėtų išmatuoti kiekvienos šviežio bandymo tirpalo partijos pH vertę kaskart prieš atnaujinant tirpalą ir panaudotų keičiamų tirpalų pH vertę.

43. Šviesos stipris turėtų būti matuojamas tose auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos vietose, kurios nuo šviesos šaltinio yra nutolusios tokiu pačiu atstumu, kaip ir *Lemna* gniužulai. Matavimai bandymo metu turėtų būti atliekami bent kartą. Reikėtų bent kartą per dieną užrašyti terpės temperatūrą pakaitiniame inde, kuris tokioms pačiomis sąlygomis laikomas auginimo kameroje, inkubatoriuje arba atitinkamoje patalpoje.
44. Per bandymą tinkamais laiko intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos. Atliekant stacionariusius bandymus, būtina nustatyti koncentracijas pradedant ir baigiant bandymą.
45. Atliekant pusiau stacionariusius bandymus, kai nesitikima, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija išliks vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ intervalo ribose, būtina išanalizuoti visus naujai paruoštus bandymo tirpalus ir tuos pačius tirpalus kaskart, kai jie atnaujinami (žr. 33 skirsnį). Tačiau kai per bandymą išmatuota pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nepatenka į vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ intervalą, bet galima pakankamai įrodymais pagrįsti, kad pradinės koncentracijos yra pakartojamos ir pastovios (t. y. patenka į 80–120 % pradinės koncentracijos intervalą), galima atlikti tik didžiausios ir mažiausios bandymo koncentracijų cheminę analizę. Visais atvejais bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas iki tirpalo atnaujinimo tereikia nustatyti viename kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinio bandinio inde (arba analizuojant sujungiamas kartotinių indų turinys).
46. Atliekant pratekamojo srauto bandymą tinka analizuoti ėminius tokia pačia tvarka, kaip ir per pirmiau aprašytus pusiau stacionarius bandymus, įskaitant analizę bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje, tačiau šiuo atveju nereikia atlikti panaudotų tirpalų matavimų. Per šio pobūdžio bandymus skiediklio ir bandomosios cheminės medžiagos arba bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo srautas turėtų būti tikrinamas kasdien.
47. Jeigu įrodyta, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją per visą bandymą pavyko išlaikyti nepakitusią daugiau kaip $\pm 20\%$ vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatus galima analizuoti remiantis vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Tačiau jeigu nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos nukrypta daugiau kaip $\pm 20\%$, rezultatus reikėtų analizuoti remiantis bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio geometrinio vidurkio koncentracija arba taikant modelius bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimui apibūdinti (8).

Ribų nustatymo bandymas

48. Tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jeigu išankstinis bandymas parodo, kad bandomoji cheminė medžiaga neturi toksinio poveikio, kol jos koncentracija nesiekia 100 mg/l arba tirpumo bandymo terpėje ribos (mažesnės iš šių verčių), galima atlikti ribų nustatymo bandymą, palyginant kontrolinės grupės ir vienos bandomosios (100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos) grupės atsaką į poveikį. Taip gautus rezultatus labai patartina patvirtinti atliekant efektyviosios koncentracijos analizę. Ribų nustatymo bandymas turi atitikti visas pirmiau aprašytas bandymo sąlygas ir tinkamumo kriterijus, tačiau kartotinių bandinių su bandomąja medžiaga turėtų būti dukart daugiau. Kontrolinės ir bandomosios grupių augalų augimą galima analizuoti taikant statistinį kriterijų vidurkiams palyginti, pvz., Studento t kriterijų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Dvigubėjimo trukmė

49. Siekiant nustatyti gniužulų skaičiaus dvigubėjimo trukmę (T_d) ir ar tyrimas atitinka šį tinkamumo kriterijų (12 skirsnis), gautiems kontrolinių indų duomenims taikoma ši formulė:

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

kurioje μ yra vidutinis savitasis augimo greitis, nustatytas 54–55 skirsniuose aprašyta tvarka.

Atsako kintamieji

50. Šio bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį *Lemna* genties augalų vegetatyviniam augimui. Pagal šį bandymo metodą apibūdinami du atsako kintamieji, nes įvairiose jurisdikcijose skiriasi prioritetai ir norminiai reikalavimai. Siekiant, kad bandymo rezultatai būtų priimtini visose jurisdikcijose, poveikį reikėtų vertinti taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius *a* ir *b*:
- vidutinis savitasis augimo greitis. Šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal kontrolinių bandinių ir kiekvienos bandomosios grupės gniužulų skaičiaus logaritmų pokyčius ir, papildomai, kito matuojamo parametro (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) logaritmų pokyčius per laiko tarpą (išreiškiamą para). Jis kartais vadinamas santykinio augimo greičiu (12);
 - išeiga – šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal kontrolinių bandinių ir kiekvienos bandomosios grupės gniužulų skaičiaus pokyčius ir, papildomai, kito matuojamo parametro (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) pokyčius iki bandymo pabaigos.
51. Pažymėtina, kad taikant šiuos du atsako kintamuosius apskaičiuotos toksiškumo vertės nėra lygintinos tarpusavyje ir jų skirtumą būtina pripažinti naudojant bandymo rezultatus. Turint omenyje atitinkamų metodų matematinį pagrindą, jei laikomasi bandymo pagal šį metodą sąlygų, pagal vidutinį savitąjį augimo greitį nustatytos EC_x vertės (E_xC_x) paprastai yra didesnės negu išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x). To nereikėtų suprasti kaip abiejų atsako kintamųjų jautrio skirtumo – tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka apibrėžiama remiantis bendrąja eksponentinio plūdenų augimo nevaržomose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas vertinamas pagal poveikį augimo greičiui, nepriklausomai nuo kontrolinės kultūros absoliučiojo savitojo augimo greičio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento ar bandymo trukmės. Kitu atsako kintamuoju – išeiga – pagrįsti rezultatai, priešingai, priklauso nuo visų šių kitų kintamųjų. E_yC_x vertė priklauso nuo kiekvienam bandymui naudojamos plūdenų rūšies savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris įvairių rūšių ar net atskirų klonų gali būti skirtingas. Šio atsako kintamojo nereikėtų naudoti lyginant kelių plūdenų rūšių ar net atskirų klonų jautrį nuodingosioms medžiagoms. Nors toksiškumui vertinti moksliniu požiūriu labiau tinka vidutinis savitasis augimo greitis, pagal šį bandymo metodą numatyta naudoti ir išeiga pagrįstus toksiškumo įverčius, kurie yra privalomi pagal kai kuriose jurisdikcijose galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.
52. Toksiškumo įverčiai turėtų būti nustatomi pagal gniužulų skaičių ir vieną papildomą matuojamą kintamąjį (bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę), nes kai kurios cheminės medžiagos gali paveikti kitus matuojamus kintamuosius kur kas labiau nei gniužulų skaičių, o skaičiuojant tik gniužulus šis poveikis nebūtų nustatytas.
53. Gniužulų skaičius ir visi kiti užrašyti matuojami kintamieji, t. y. bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė, surašomi į lenteles kartu su per kiekvieną matavimą nustatytomis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėmis. Vėliau analizuojant duomenis, pvz., siekiant nustatyti LOEC, NOEC arba EC_x įvertį, reikėtų remtis atskirų kartotinių bandinių vertėmis, o ne apskaičiuotais kiekvienos bandomosios grupės vidurkiais.

Vidutinis savitasis augimo greitis

54. Vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu kiekviename kontrolinės grupės ir bandomųjų grupių kartotiniame bandinyje apskaičiuojamas kaip augimo kintamųjų – gniužulų skaičiaus ir vieno kito matuojamo kintamojo (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) – logaritminis didėjimas pagal formulę

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

kurioje:

- μ_{i-j} vidutinis savitasis augimo greitis per laiko tarpą $i-j$;
- N_i bandymo arba kontroliniame inde i laiku išmatuotas kintamasis;

- N_j bandymo arba kontroliniame inde j laiku išmatuotas kintamasis;
- t laiko tarpas nuo i iki j .

Apskaičiuojama kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

55. Reikėtų apskaičiuoti viso bandymo laikotarpio (pateiktoje formulėje i laikas yra bandymo pradžia, j laikas – bandymo pabaiga) vidutinį savitąjį augimo greitį. Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės vidutinio savitojo augimo greičio vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Be to, reikėtų įvertinti augimo greitį atskirais laiko tarpais, siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį jos veikimo laikotarpiu (pvz., nagrinėjant logaritmuotas augimo kreives). Jeigu tokie nustatyti augimo greičiai atskirais laiko tarpais reikšmingai skiriasi nuo vidutinio augimo greičio, tai rodo nuokrypį nuo tolygaus eksponentinio augimo ir reikia nuodugniai ištirti augimo kreives. Šiuo atveju taikytinas konservatyvus metodas būtų bandomųjų kultūrų savitojo augimo greičio didžiausio slopinimo laikotarpiu ir kontrolinių bandinių savitojo augimo greičio tuo pačiu laikotarpiu palyginimas.
56. Tada galima apskaičiuoti kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos (bandomosios grupės) augimo greičio slopinimo lygį procentais (I_r) pagal formulę

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

kurioje:

- $\% I_r$ – vidutinio savitojo augimo greičio slopinimo procentinis lygis;
- μ_C – kontrolinės grupės vidutinė μ vertė;
- μ_T – bandomosios grupės vidutinė μ vertė.

Išėiga

57. Poveikis išėigai nustatomas pagal du matuojamus kintamuosius – gniūžulų skaičių ir vieną kitą matuojamą kintamąjį (bendrą gniūžulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę) – kiekviename bandymo inde pradedant ir baigiant bandymą. Matuojant sausos arba šviežios medžiagos masę, pradinė biomasė nustatoma paėmus gniūžulų ėminį iš tos pačios paruoštos kultūros, kuri pasėta į bandymo indus, partijos (žr. 20 skirsnį). Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės išėigos vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Kiekvienos bandomosios grupės išėigos vidutinį sumažėjimą procentais ($\% I_y$) galima apskaičiuoti pagal formulę

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

kurioje:

- $\% I_y$ – išėigos sumažėjimas procentais;
- b_c – kontrolinės grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas;
- b_T – bandomosios grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas.

Koncentracijos ir atsako kreivių braižymas

58. Reikėtų nubrėžti koncentracijos ir atsako kreives, susiejant pasirinkto atsako kintamojo slopinimo vidutinį lygį procentais (apskaičiuotą I_r arba I_y , kaip parodyta 56 arba 57 skirsnyje) su bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmu.

EC_x vertinimas

59. EC_x įverčiai (pvz., EC₅₀) turėtų būti nustatomi tiek pagal vidutinį savitąjį augimo greitį (E_rC_x), tiek pagal išėigą (E_yC_x), nustatytus pagal gniužulų skaičių ir vieną papildomą matuojamą kintamąjį (bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę). Tai daroma dėl tos priežasties, kad kai kurios bandomosios cheminės medžiagos nevienodai veikia gniužulų skaičių ir kitus matuojamus kintamuosius. Todėl reikiami toksiškumo parametrai yra pagal kiekvieną slopinimo lygį x apskaičiuojamos keturios EC_x vertės: E_rC_x (gniužulų skaičius), E_rC_x (bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė), E_yC_x (gniužulų skaičius) ir E_yC_x (bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė).

Statistinės procedūros

60. Tikslas yra nustatyti kiekybinę koncentracijos ir atsako santykį atliekant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba Weibull vienetus (13), tačiau geriau atlikti procedūras netiesinės regresijos metodais, per kurias geriau apdorojami neišvengiami duomenų neatitikimai ir nukrypimai nuo glodžiuųjų skirstinių. Artėjant prie nulinio arba visiško augimo slopinimo, tokie neatitikimai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (13). Pažymėtina, kad standartiniai analizės metodai taikant probito, logito arba Weibull transformuotus dydžius yra skirti dvireikšmiams (pvz., mirtingumo arba išgyvenimo) kintamiesiems, todėl norint juos naudoti augimo greičio ar išėigos duomenims, būtina juos atitinkamai pritaikyti. Konkrečios EC_x verčių nustatymo iš tolydžiuųjų duomenų procedūros aprašytos literatūroje (14), (15), (16).
61. Analizuodami kiekvieną atsako kintamąjį, remdamiesi koncentracijos ir atsako santykiu, apskaičiuokite EC_x verčių taškinis įverčius. Kai įmanoma, reikėtų nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasiklovimo ribas. Reikėtų pagal grafiką arba statistiškai įvertinti atsako duomenų atitiktį regresijos modeliui. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirų kartotinių bandinių atsakus, o ne visos bandomosios grupės vidutines vertes.
62. Be to, jeigu esami regresijos modeliai ir (arba) metodai netinka turimiems duomenims, EC₅₀ įverčius ir pasiklovimo ribas taip pat galima gauti atliekant tiesinę interpoliaciją su saviranka (angl. *bootstrapping*) (17).
63. Siekiant įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, būtina palyginti bandomosios grupės vidutines vertes taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Taip gautą kiekvienos koncentracijos grupės vidurkį reikia palyginti su kontrolinės grupės vidurkiu taikant tinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudinga taikyti Dunnett arba Williams kriterijų (18), (19), (20), (21). Būtina įvertinti, ar tinka ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį vertinimą galima atlikti naudojant grafiką arba taikant formalųjį kriterijų (22). Tinka taikyti Levene arba Bartlett kriterijus. Jeigu netinka dispersijų vienalytiškumo prielaida, kartais galima tai pataisyti logaritmine duomenų transformacija. Jei dispersija yra itin nevienalytė ir to neįmanoma pataisyti transformuojant duomenis, reikėtų apsvarstyti galimybę atlikti analizę kitais metodais, pvz., taikant žingsnio žemyn Jonkheere trendo kriterijus. Papildomų gairių, kaip nustatyti NOEC, pateikta literatūroje (16).
64. Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus, rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir vietoj jos naudoti regresiją pagrįstus EC_x taškinis įverčius. Pagal šį Lemna bandymo metodą tinkama x vertė nenustatyta, tačiau atrodo, kad tinka į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (kuri priklauso nuo pasirinkto atsako kintamojo). Ataskaitoje geriausia nurodyti abi (EC₁₀ ir EC₂₀) vertes.

Ataskaitos rengimas

65. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- Medžiagos fizikinė prigimtis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant tirpumo vandenyje ribą.
- Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (pvz., CAS numeris), įskaitant grynumą (priemaišas).

Bandomosios rūšys

- Mokslinis pavadinimas, klonas (jei žinomas) ir šaltinis.

Bandymo sąlygos

- Pasirinkta bandymo procedūra (stacionarusis, pusiau stacionarusis ar pratekamojo srauto bandymas).
- Bandymo pradžios data ir trukmė.
- Bandymo terpė.
- Bandymo plano aprašymas: naudoti bandymo indai ir dangčiai, tirpalų tūris, bandymo pradžioje kiekviename bandymo inde buvusių kolonijų ir gniužulų skaičius.
- Bandymui pasirinktos koncentracijos vertės (vardinės ir, kai tinka, išmatuotos) ir kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičius.
- Pradinių ir bandymo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant bet kokių tirpiklių ar dispergentų naudojimą.
- Bandymo temperatūra.
- Apšvietimo šaltinis, šviesos stipris ir vienalytiškumas.
- Bandymo ir kontrolinės grupės terpių pH vertės.
- Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės, analizės metodas ir atitinkami kokybės vertinimo duomenys (tinkamumo patvirtinimo tyrimai, analizės rezultatų standartiniai nuokrypiai arba pasiklivimo ribos).
- Gniužulų skaičiaus ir kitų matuojamų kintamųjų, pvz., sausos medžiagos masės, šviežios medžiagos masės arba gniužulų ploto, nustatymo metodai.
- Bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo.

Rezultatai

- Neapdoroti duomenys: gniužulų skaičius ir kiti kiekviename bandymo bei kontroliniame inde matuoti kintamieji per kiekvieną stebėjimą ir atliktą analizę.
- Kiekvieno matuojamo kintamojo vidurkis ir standartinis nuokrypis.
- Kiekvieną bandomosios medžiagos koncentraciją atitinkančios augimo kreivės (matuojamą kintamąjį patartina logaritmuoti, žr. 55 skirsnį).
- Kontrolinės grupės dvigubėjimo trukmė (augimo greitis) pagal gniužulų skaičių.
- Apskaičiuoti kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių bandinių variacijos koeficientas.
- Koncentracijos ir poveikio santykio grafikas.
- Toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , ir atitinkami pasikliautiniai intervalai. LOEC ir (arba) NOEC vertės (jeigu apskaičiuotos) ir statistiniai metodai, pagal kuriuos jos nustatytos.
- Jei taikytas ANOVA metodas – mažiausio aptinkamo poveikio dydis (pvz., mažiausias reikšminis skirtumas).
- Bet koks bandomosiose grupėse nustatytas augimo skatinimas.
- Visi pastebėti fitotoksiškumo požymiai ir bandymo tirpalų stebėjimų duomenys.
- Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

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

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys ir santrumpos.

Biomasė – gyvų organizmų populiacijoje esančios sausosios medžiagos masė. Per šį bandymą vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, kaip antai gniužulų skaičius arba gniužulų plotas, taigi biomasės sąvoka apima ir šiuos pakaitinius matavimo vienetus.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chlorozė – augalo gniužulo audinio pageltimas.

Klonas – organizmas arba ląstelė, gauta iš vieno individo nelytinio dauginimosi būdu, todėl to iš paties klonu išsivystę individai yra genetiškai tapatūs.

Kolonija – sujungtų motininių ir dukterinių gniužulų (paprastai 2–4) sankaupa, kartais vadinama augalu.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant *Lemna* augimas per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį (kuris, jeigu skiriasi nuo visos arba įprastos bandymo trukmės, turi būti tiksliai nurodytas) sumažėja x % (pvz., 50 %). Pagal augimo greitį arba išėigą nustatytai EC vertei vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_tC“ (augimo greičio) ir „E_yC“ (išėigos), kartu nurodant naudotą matuojamą kintamąjį, pvz., E_tC (gniužulų skaičius).

Pratekamojo srauto bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalai nuolat keičiami.

Gniužulas – atskira (pavienė) plūdenos augalo „lapo formos“ struktūra. Tai mažiausiais gebantis dauginintis vienetas, t. y. individas.

Gumbuotumas reiškia gumbuotų arba išsipūtusių gniužulų išvaizdą.

Augimas – matuojamo kintamojo, pvz., gniužulų skaičiaus, sausos medžiagos masės, šviežios medžiagos masės arba gniužulų ploto, didėjimas bandymo laikotarpiu.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – logaritminis biomasės didėjimas bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymui pasirinkta koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas cheminės medžiagos slopinamasis poveikis bandomųjų organizmų augimui (kai $p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijų verčių kenksmingas poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Matuojami kintamieji – visų rūšių kintamieji, matuojami bandymo vertinamajai baigčiai išreikšti naudojant vieną arba daugiau skirtingų atsako kintamųjų. Pagal šį metodą matuojami kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė ir sausos medžiagos masė.

Monokultūra – vienos rūšies augalų kultūra.

Nekrozė – žuvęs (t. y. pabalęs arba vandens prisisunkęs) gniužulo audinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandymui pasirinkta koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC koncentracija.

Fenotipas – pastebimos organizmo savybės, kurias lemia jo genų sąveika su aplinka.

Atsako kintamieji – toksiškumui vertinti naudojami kintamieji, gauti pagal bet kurį iš matuojamų kintamųjų, kuriais apibūdinama biomasė taikant skirtingus apskaičiavimo metodus. Pagal šį bandymo metodą iš matuojamų kintamųjų gaunami atsako kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė arba sausos medžiagos masė.

Pusiau stacionarusis (atnaujinamasis) bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas kas kiek laiko reguliariai keičiamas.

Stacionarusis bandymas – bandymo metodas, pagal kurį bandymo tirpalas per bandymą neatnaujinamas.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Bandymo vertinamąja baigtimi vadinamas bendrasis parametras, kurio pokytį siekiama nustatyti per bandymą veikiant bandomajai cheminei medžiagai, palyginti su kontroline grupe. Bandymo vertinamoji baigtis pagal šį bandymo metodą yra bandomųjų augalų augimo slopinimas, kurį galima išreikšti įvairiais atsako kintamaisiais, nustatytais pagal vieną arba daugiau matuojamųjų kintamųjų.

Bandymo terpė – visiškai paruošta sintetinė auginimo terpė, kurioje per bandymą auginami bandomosios cheminės medžiagos veikiami augalai. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai ištirpinama bandymo terpėje.

Išreiga – matuojamo kintamojo verčių bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas, kuriuo išreiškiamas biomasės pokytis.

2 priedėlis

Lemna spp. apibūdinimas

Lemna spp., vandens augalas, įprastai vadinamas plūdena, priklauso *Lemnaceae* šeimai, kurioje yra kelios visame pasaulyje paplitusios rūšys, priskiriamos keturioms gentims. Skirtinga jų išvaizda ir sistematika išsamiai aprašytos literatūroje (1), (2). Rūšys *Lemna gibba* ir *L. minor* yra būdingos vidutinio klimato zonoms ir dažnai naudojamos toksiškumo bandymams. Abiejų rūšių augalai turi plūduriuojantį arba panirusį disko formos kamieną (gniužulą) ir iš kiekvieno gniužulo apatinės dalies vidurio auga labai plona šaknis. *Lemna* spp. žydi retai, augalai dauginasi vegetatyviniu būdu sudarydami naujus gniužulus (3). Jaunesni augalai yra šviesesni nei seni augalai, turi trumpesnes šaknis ir susideda iš dviejų arba trijų skirtingo dydžio gniužulų. Smulkūs, nesudėtingos sandaros, nelytiniu būdu besidauginantys ir trumpos generacijos *Lemna* augalai labai tinka laboratoriniams bandymams (4), (5).

Kadangi įvairių rūšių jautris gali skirtis, lyginti galima tik vienos rūšies augalų jautrį.

Toliau pateikti bandymams naudojamų *Lemna* rūšių pavyzdžiai (rūšys ir nuorodos):

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

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

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

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. (p. 15; švedų k.).

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

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

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., 10:1959-1969.

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

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

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

Lemna rūšių šaltiniai:

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel. +1-416-978-3641
Faks.+1-416-978-5878
El. paštas: jacreman@botany.utoronto.ca

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
Tel. 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Tel. +46 8 674 7240
Faks. +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
El. paštas: lemna@uba.de

NUORODOS

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

3 priedėlis

Pradinės kultūros priežiūra

Pradinės kultūras galima ilgesnį laiką laikyti žemesnėje (4–10 °C) temperatūroje, tokiu atveju jų nereikia rekultivuoti. *Lemna* auginimo terpė gali būti tokia pati, kokia naudojama bandymui, tačiau pradinėms kultūroms galima naudoti ir kitokias pakankamai mitybinių medžiagų turinčias terpes.

Tam tikras jaunų, šviesiai žalių augalų skaičius reguliariai steriliomis sąlygomis perkeliamas į naujai kultūrai skirtus indus su nauja terpe. Jeigu, kaip pasiūlyta, augalai laikomi vėsesnėmis sąlygomis, persėti galima rečiausiai kas tris mėnesius.

Kultūroms auginti turėtų būti naudojami chemiškai švarūs (rūgštimi išplauti) ir sterilūs stikliniai indai ir taikomi sterilaus tvarkymo metodai. Jei pradinė kultūra užkrečiama, pvz., dumbliais arba grybeliais, būtina imtis priemonių užkrato organizmams pašalinti. Jei tai dumbliai ar dauguma kitų užkrečiamųjų organizmų, galima atlikti paviršinių sterilizavimą: paimamas užkrėstos augalų medžiagos ėminys ir nupjaunamos šaknys, tada augalų medžiaga įdedama į indą su švariu vandeniu ir stipriai sukratoma, po to kurį laiką (nuo 30 sekundžių iki 5 min.) laikoma įmerkta į 0,5 % (tūrinių procentų) natrio hipochlorito tirpalą. Tada augalų medžiaga praskalaujama steriliu vandeniu, išskirstoma į kelias dalis ir įdedama į kultūrai auginti skirtus indus su šviežia auginimo terpe. Po tokio apdorojimo, ypač apdorojant ilgesnį laiką, daug gniužulų žūsta, tačiau tam tikra likusių augalų dalis paprastai nebeturi užkrato ir juos galima naudoti naujoms kultūroms sėti.

4 priedėlis

Terpės

L. minor ir *L. gibba* auginti rekomenduojamos skirtingos terpės. *L. minor* rekomenduojama naudoti modifikuotą terpę pagal Švedijos standartą (SIS), o *L. gibba* – 20X AAP terpę. Abiejų terpių sudėtis aprašyta toliau. Šioms terpėms ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

Lemna auginimo terpė pagal Švedijos standartą (SIS):

- I–V pradiniai tirpalai sterilizuojami autoklave (120 °C, 15 min.) arba membraninio filtravimo būdu (akučių dydis turėtų būti maždaug 0,2 µm);
- VI (ir, jei pasirinktas, VII) pradinis tirpalas sterilizuojamas tik membraninio filtravimo būdu; šių tirpalų autoklave apdoroti nereikėtų;
- sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi vėsiai ir tamsoje. Nepanaudotus I–V pradinius tirpalus reikėtų pašalinti po šešių mėnesių, o VI (ir, jei pasirinktas, VII) tirpalo laikymo trukmė – vienas mėnuo.

Pradinio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiniam tirpale (g/l)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/l)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg/l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	-	-
VII	MOPS (buferinis tirpalas)	490	490	-	-

Vienam SIS terpės litrai paruošti į 900 ml dejonizuoto vandens įpilama:

- 10 ml I pradinio tirpalo;
- 5 ml II pradinio tirpalo;
- 5 ml III pradinio tirpalo;
- 5 ml IV pradinio tirpalo;
- 1 ml V pradinio tirpalo;
- 5 ml VI pradinio tirpalo;
- 1 ml VII pradinio tirpalo (nebūtinai).

Pastaba. Papildomo VII pradinio tirpalo (MOPS buferinio tirpalo) gali reikėti atliekant kai kurių cheminių medžiagų bandymus (žr. 11 skirsnį).

Naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l HCl arba NaOH, pH lygis patikslinamas iki $6,5 \pm 0,1$, ir atskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 litro tūrio.

20X AAP auginimo terpė

Pradiniams tirpalams ruošti naudojamas sterilus distiliuotas arba dejonizuotas vanduo.

Sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi vėsiai ir tamsoje. Tokiomis sąlygomis pradinis tirpalus galima laikyti bent 6–8 savaites.

20X-AAP terpei paruošiami penki pradiniai mitybinių medžiagų tirpalai (A1, A2, A3, B ir C) iš analiziškai grynų cheminių medžiagų. Ruošiant auginimo terpę, po 20 ml kiekvieno pradinio mitybinių medžiagų tirpalo įpilama į maždaug 850 ml dejonizuoto vandens. Naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l HCl arba NaOH, pH lygis patikslinamas iki $7,5 \pm 0,1$, ir atskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 litro tūrio. Tada terpė perfiltruojama į sterilų indą per (maždaug) 0,2 μm dydžio akučių membraninį filtrą.

Bandymui skirtą auginimo terpę reikėtų paruošti prieš 1–2 paras iki naudojimo, kad nusistovėtų pH lygis. Prieš naudojant auginimo terpę, jos pH reikėtų patikrinti ir, jei reikia, patikslinti naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l NaOH arba HCl, kaip aprašyta pirmiau.

Pradinio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiniam tirpalui (g/l) (*)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/l) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg/l) (*)
A1	NaNO_3	26	510	Na; N	190; 84
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	240	Mg	58,08
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	290	S	38,22
A3	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7

Pradinio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiname tirpale (g/l) (*)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/l) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg/l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jei nenurodyta kitaip.

Pastaba. Teoriškai tinkama galutinė hidrokarbonato koncentracija (kad būtų išvengta didesnio pH reguliavimo) yra 15 mg/l, o ne 300 mg/l. Tačiau anksčiau 20X-AAP terpei ruošti, taip pat per tarplaboratorinį bandymą pagal šias gaires, naudota 300 mg/l koncentracija. (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.)

Steinbergo (STEINBERG) terpė (pagal ISO 20079)

Koncentracijos ir pradiniai tirpalai

Modifikuota Steinbergo terpė pagal standartą ISO 20079 naudojama tik *Lemna minor* (nes pagal šį standartą ją galima naudoti tik *Lemna minor*), tačiau atlikti bandymai parodė, kad gerų rezultatų galima gauti ir su *Lemna gibba*.

Terpei ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

Mitybinė terpė ruošama iš pradinių tirpalų arba iš 10 kartų didesnės koncentracijos terpės – tai didžiausia terpės koncentracija, kuriai esant dar nesusidaro nuosėdų.

1 lentelė.

Pastovios pH vertės STEINBERG terpė (modifikuota pagal Altenburger)

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

Sudedamoji dalis		Mitybinė terpė	
Mikroelementai	Molinė masė	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA dinatrio dihidratas	372,24	1 500,00	4,03

2 lentelė.

Pradiniai (makroelementų) tirpalai

1. Makroelementai (50 kartų didesnės koncentracijos)	g/l
1 pradinis tirpalas:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
2 pradinis tirpalas:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
3 pradinis tirpalas:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

3 lentelė.

Pradiniai (mikroelementų) tirpalai

2. Mikroelementai (1 000 kartų didesnės koncentracijos)	mg/l
4 pradinis tirpalas:	
H ₃ BO ₃	120,0
5 pradinis tirpalas:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
6 pradinis tirpalas:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Mikroelementai (1 000 kartų didesnės koncentracijos)	mg/l
7 pradinis tirpalas:	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180,0
8 pradinis tirpalas:	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	760,00
EDTA dinatrio dihidratas	1 500,00

- 2 ir 3 pradinius tirpalus ir, atskirai, 4–7 pradinius tirpalus galima supilti kartu (atsižvelgiant į reikiamas koncentracijas).
- Kad pradinius tirpalus būtų galima laikyti ilgesnį laiką, apdorokite juos autoklave 20 min. 121 °C temperatūroje arba steriliai perfiltruokite (per 0,2 µm dydžio akučių filtrą). Ypač patartina steriliai filtruoti (per 0,2 µm akučių filtrą) 8 pradinį tirpalą.

Galutinės koncentracijos STEINBERG (modifikuotos) terpės ruošimas:

- po 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto vandens, kad nesusidarytų nuosėdų;
- įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę);
- pH turėtų būti 5,5 +/- 0,2 (reguliuojama įpilant minimalų NaOH tirpalo arba HCl kiekį);
- atskiedžiama vandeniu iki 1 000 ml tūrio;
- jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir paruošti naudojant tinkamą vandenį, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė paruošta terpė, 8 pradinį tirpalą reikėtų įpilti po terpės apdorojimo autoklave (20 min., 121 °C temperatūroje).

10 kartų didesnės koncentracijos (modifikuotos) STEINBERG terpės, skirtos laikyti ilgesnį laiką, ruošimas:

- po 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 30 ml vandens, kad nesusidarytų nuosėdų;
- įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę). Atskiedžiama vandeniu iki 100 ml tūrio;
- jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir paruošti naudojant tinkamą vandenį, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė paruošta terpė, 8 pradinį tirpalą reikėtų įpilti po terpės apdorojimo autoklave (20 min., 121 °C temperatūroje).
- Terpės (galutinės koncentracijos) pH vertė turėtų būti 5,5 ± 0,2.“

(6) Įtraukiami šie C.31–C.46 skyriai:

„C.31. BANDYMAS SU SAUSUMOS AUGALAIS. DAIGŲ PASIRODYMO IR DAIGŲ AUGIMO BANDYMAS

ĮVADAS

- Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 208 (2006). Bandymų metodai reguliariai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą ir į jų tinkamumą reglamentavimo reikmėms. Šis atnaujintas bandymo metodas skirtas galimam cheminių medžiagų poveikiui augalų daigų pasirodymui ir augimui vertinti. Pagal šį metodą neatsižvelgiama į lėtinį poveikį ar poveikį reprodukcijai (t. y. sėklų užmezgimui, žiedų formavimuisi, vaisių brendimui). Siekiant užtikrinti, kad būtų taikomi tinkami bandymo metodai, būtina atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos poveikio sąlygas ir savybes (pvz., atliekant metalų ir metalų junginių bandymus, reikėtų atsižvelgti į pH ir susijusių priešjonių poveikį) (1). Pagal šį bandymo metodą netiriamas cheminių medžiagų garų poveikis augalams. Pagal jį atliekami bendrosios paskirties cheminių medžiagų, biocidų ir augalų apsaugos produktų (taip pat vadinamų pesticidais) bandymai. Šis metodas parengtas remiantis esamais metodais (2), (3), (4), (5), (6), (7), atsižvelgiant ir į kitus augalų bandymams svarbius šaltinius (8), (9), (10). Taikant šį metodą vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

2. Atliekant šį bandymą vertinamas dirvožemyje (ar kitoje tinkamoje dirvožemio terpėje) esančios bandomosios cheminės medžiagos poveikis aukštesniųjų augalų daigų pasirodymui ir pradiniam augimui. Sėklos įterpiamos į bandomąją cheminę medžiagą apdorotą dirvožemį ir poveikis paprastai vertinamas praėjus 14–21 dienai po 50 % kontrolinės grupės daigų pasirodymo. Vertinamoji baigtis – pasirodžiusių daigų išvaizdos vertinimas, sausos daigų medžiagos masės (arba šviežios daigų medžiagos masės) masės ir, kai kuriais atvejais, daigų aukščio nustatymas, taip pat pastebimo kenksmingo poveikio įvairioms augalo dalims vertinimas. Šių vertinimų ir stebėjimų duomenys palyginami su atitinkamais kontrolinės neapdorotos grupės augalų duomenimis.
3. Priklausomai nuo numatomo poveikio būdo, bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į dirvožemį (arba galbūt į dirbtinio dirvožemio terpę) arba ja padengiamas dirvožemio paviršius (jei tai atitinka galimą tos cheminės medžiagos poveikio būdą). Į dirvožemį bandomoji medžiaga įterpiama bendrai apdorojant visą bandymui naudojamo dirvožemio kiekį, taip apdorotas dirvožemis paskirstomas į augalams auginti skirtus indus ir jame pasėjamos atitinkamos rūšies augalų sėklos. Kai bandomąją medžiagą reikia padengti dirvožemio paviršių, tai daroma jau pasėjus sėklas į indus su dirvožemiu. Po to bandymo vienetai (kontroliniai ir apdoroto dirvožemio bandiniai su pasėtomis sėklomis) laikomi sėklų dygimui ir augalų augimui palankiomis sąlygomis.
4. Priklausomai nuo tyrimo tikslo, šis bandymas gali būti atliekamas siekiant nubrėžti bandomosios medžiagos dozės ir atsako kreivę arba, pasirinkus vieną koncentracijos vertę (normą), kaip ribų nustatymo bandymas. Jeigu vienos koncentracijos (normos) bandymo rezultatas viršija tam tikrą toksiškumo lygį (pvz., jeigu pastebimas didesnis negu x % poveikis), atliekamas intervalo nustatymo bandymas, siekiant nustatyti viršutinę ir žemutinę toksiškumo ribas, o tada – kelių koncentracijų (normų) bandymas siekiant nubrėžti dozės ir atsako kreivę. Siekiant nustatyti efektyviąją koncentraciją EC_x arba efektyviąją naudojimo normą ER_x (pvz., EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) tiriamam didžiausio jautrio parametrai arba parametrui, atliekama tinkama statistinė analizė. Be to, atliekant šį bandymą galima apskaičiuoti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Nustatant tikėtiną cheminės medžiagos poveikio būdą ir planuojant bandymą naudinga žinoti šią informaciją: cheminės medžiagos struktūrinę formulę, grynumą, tirpumą vandenyje, tirpumą organiniuose tirpikliuose, 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą, gerties į dirvožemį savybes, garų slėgį, cheminį stabilumą veikiant vandeniui bei šviesai ir biologinį skaidumą.

BANDYMO TINKAMUMAS

6. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos veiksmingumo kriterijus:
 - daigų pasirodymas siekia bent 70 %;
 - daigai nėra patyrę pastebimo fitotoksinio poveikio (pvz., chlorozės, nekrozės, vytimo, lapų ir stiebų deformacijos) ir augalams yra būdingas tik tai konkrečiai rūšiai įprastas augimo ir sandaros (morfologinis) kintamumas;
 - per visą tyrimo trukmę išgyvena vidutiniškai bent 90 % pasirodžiusių kontrolinės grupės daigų;
 - konkrečios rūšies augalai laikomi vienodomis aplinkos sąlygomis ir jų auginimo terpių sudėtyje yra vienodi iš to paties šaltinio gautos dirvožemio terpės, atraminių medžiagų arba substrato kiekiai.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laikui bėgant per daug nesikeičia bandymo eiga, konkrečių bandomųjų augalų atsakas į poveikį ir bandymo sąlygos, galima reguliariai atlikti bandymus su etalonine chemine medžiaga. Kita vertus, kai kuriose laboratorijose bandymo sistemos veikimui vertinti gali būti naudojami ankstesnių kontrolinių augalų biomasės ar augimo matavimų duomenys; tai galėtų būti ir tarplaboratorinės kokybės kontrolės priemonė.

METODO APRAŠYMAS

Natūralus dirvožemis arba dirbtinis substratas

8. Augalai gali būti auginami induose, pripildytuose priesmėlio arba smėlingo priemolio, kurio sudėtyje turi būti iki 1,5 % organinės anglies (apie 3 % organinės medžiagos). Taip pat galima naudoti rinkoje parduodamą vazoniniams augalams skirtą dirvožemį arba sintetinį dirvožemio mišinį, kurio sudėtyje yra iki 1,5 % organinės anglies. Molingo dirvožemio naudoti nepatartina, jeigu yra žinoma, kad bandomajai cheminei medžiagai būdingas didelis junglumas su moliu. Iš lauko paimtą dirvožemį reikėtų išsijoti, kad jame liktų ne didesnės kaip 2 mm dalelės, taip jį suvienodinant ir pašalinant stambias daleles. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti galutinio paruošto dirvožemio rūšį ir struktūrą, organinės anglies kiekį (%), pH ir druskų kiekį, nuo kurio priklauso elektroninis laidumas. Turėtų būti nurodyta dirvožemio kategorija pagal standartinę klasifikavimo schemą (11). Dirvožemį galima pasterizuoti arba iškaitinti, kad sumažėtų jame esančių patogeninių mikroorganizmų poveikis.
9. Naudojant natūralų dirvožemį gali būti sudėtingiau aiškinti bandymo rezultatus ir jų kintamumas gali būti didesnis dėl dirvožemio fizikinių ar cheminių savybių ir mikroorganizmų populiacijų skirtumų, o šie kintamieji savo ruožtu gali pakeisti dirvožemio drėgmės imlumą, cheminių medžiagų surišimo gebą, aeraciją ir mitybinių medžiagų bei mikroelementų sudėtį. Kinta ne tik šie fiziniai parametrai, bet ir cheminės dirvožemio savybės, kaip antai pH ir oksidacijos-redukcijos potencialas, ir nuo to gali priklausyti bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinamumas (12), (13), (14).
10. Dirbtiniai substratai paprastai nenaudojami augalų apsaugos produktų bandymams, tačiau galima juos naudoti bandant bendrosios paskirties chemines medžiagas arba siekiant kuo labiau sumažinti natūraliam dirvožemiui būdingą kintamumą ir padidinti bandymų rezultatų palyginamumą. Naudojami substratai turėtų būti sudaryti iš inertinių medžiagų, kurios kuo mažiau sąveikautų su bandomąja chemine medžiaga, jos nešikliu-tirpikliu arba abiem šiomis medžiagomis. Nustatyta, kad rūgštimi išplautas kvarcinis smėlis, mineralinė vata ir stikliniai (pvz., 0,35–0,85 mm skersmens) rutuliukai yra tinkamos inertinės medžiagos, beveik nesugėriamos bandomosios cheminės medžiagos (15), taip užtikrinant, kad kuo didesnis jos kiekis per šaknis pasiektų daigus. Vermikulitas, perlitas ar kitos medžiagos, kurioms būdinga didelė sugerties geba, yra netinkami substratai. Turėtų pakakti augalams augti reikalingų mitybinių medžiagų, kad augalai nepatirtų streso dėl mitybinių medžiagų trūkumo; kai įmanoma, šių medžiagų pakankamumą reikėtų įvertinti atliekant cheminę analizę arba apžiūrint kontrolinius augalus.

Bandomųjų rūšių atrankos kriterijai

11. Siekiant tirti įvairius augalų atsakus į poveikį, reikėtų bandymui rinktis pakankamai įvairias rūšis, pvz., atsižvelgiant į jų taksonominę įvairovę augalų karalystėje, paplitimą, gausą, rūšiai būdingus gyvenimo ciklo ypatumus ir paplitimo gamtoje teritoriją (8), (10), (16), (17), (18), (19), (20). Renkantis iš bandymams galimų naudoti rūšių, reikėtų atsižvelgti į šiuos aspektus:
 - ar tos rūšies augalai subrandina vienodas sėklas, kurias lengva gauti iš patikimo standartinių sėklų šaltinio arba šaltinių ir kurios vienodai, patikimai ir tolygiai dygsta, o daigai tolygiai auga;
 - ar tie augalai yra tinkami laboratoriniams bandymams ir ar juos naudojant galima gauti patikimus ir atkuriamus rezultatus tiek toje pačioje bandymo vietoje, tiek įvairiose laboratorijose;
 - bandymui naudojamos rūšies jautris turėtų atitikti natūralioje aplinkoje augančių augalų reakcijas į atitinkamos cheminės medžiagos poveikį;
 - ar tos rūšys jau pirmiau kiek nors naudotos toksiškumo bandymams ir jas naudojant, pvz., herbicidų bioanalizei, sunkiųjų metalų tyrimams, druskingumo ar mineralinių medžiagų sukkelto streso bandymams arba alelopatiniams tyrimams, nustatyta, kad jos yra jautrios labai įvairiems stresą sukeliantiems veiksniams;
 - ar joms tinka auginimo sąlygos pagal šį bandymo metodą;
 - ar jos atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Kai kurios bandymams iki šiol daugiausia naudotos rūšys išvardytos 2 priedėlyje, o galimos naudoti nekultūrinių augalų rūšys – 3 priedėlyje.

12. Kiek augalų rūšių reikia naudoti per bandymą, priklauso nuo galiojančių norminių reikalavimų, todėl šio bandymo metodo aprašyme tai nenurodyta.

Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas

13. Cheminę medžiagą reikėtų naudoti įterptą į tinkamą nešiklį (pvz., vandenį, acetoną, etanolį, polietilenglikolį, gumiarabiką, smėlį). Galima atlikti ir mišinių (apibrėžtos sudėties produktų arba preparatų), susidedančių iš veikliųjų medžiagų ir įvairių priedų, bandymus.

Įterpimas į dirvožemį arba dirbtinį substratą

14. Vandenyje tirpias arba vandenyje suspenduojamas chemines medžiagas galima įmaišyti į vandenį ir gautą tirpalą sumaišyti su dirvožemiu naudojant tinkamą maišytuvą. Bandymą šiuo būdu gali būti tinkama atlikti tada, kai cheminės medžiagos poveikis patiriamas per dirvožemį arba dirvožemio porų vandenį ir reikia tirti jos įsisavinimą per augalų šaknis. Dedant bandomąją cheminę medžiagą į dirvožemį, neturėtų būti viršytas jo drėgmės imlumas. Į kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos indą įpilamo vandens turis turėtų būti vienodas, tačiau vandens kiekį reikėtų riboti, kad dirvožemis nesukibtų į gumulėlius.
15. Vandenyje mažai tirpias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti tinkamame lakiam tirpiklyje (pvz., acetone, etanolyje) ir sumaišyti su smėliu, tada tirpiklį iš smėlio galima pašalinti leidžiant oro srautą ir smėlį nepaliaujamai maišant. Taip apdorotas smėlis sumaišomas su bandymui naudojamu dirvožemiu. Paruošiamas antras kontrolinis bandinys, į kurį dedama tik smėlio ir tirpiklio. Į visų koncentracijų bandinius ir antrąjį kontrolinį bandinį dedama po vienodą smėlio, į kurį įmaišyta tirpiklio (kuris vėliau pašalintas), kiekį. Atliekant kietų, netirpių cheminių medžiagų bandymus, cheminė medžiaga sumaišoma su sausu dirvožemiu naudojant tinkamą maišytuvą, tada dirvožemis sudedamas į augalams auginti skirtus indus, į kuriuos iškart pasėjamos sėklos.
16. Kai vietoj dirvožemio naudojamas dirbtinis substratas, vandenyje tirpias chemines medžiagas galima ištirpinti mitybinių medžiagų tirpale prieš pat pradedant bandymą. Vandenyje netirpias chemines medžiagas, kurias galima suspenduoti vandenyje naudojant tirpiklį-nešiklį, reikėtų kartu su nešikliu įmaišyti į mitybinių medžiagų tirpalą. Vandenyje netirpias chemines medžiagas, kurioms tinkamų netoksiškų vandenyje tirpių nešiklių nėra, reikėtų ištirpinti tinkamame lakiajame tirpiklyje. Gautas tirpalas sumaišomas su smėliu arba stikliniais rutuliukais, mišinys įdedamas į būgninį vakuuminį aparatą ir išgarinamas. Lieka chemine medžiaga tolygiai padengtos smėlio dalelės arba stikliniai rutuliukai. Tam tikrą pasvertą rutuliukų dalį reikėtų paveikti tuo pačiu organiniu tirpikliu, ekstrahuojant bandomąją cheminę medžiagą ir ją išanalizuojant; tai reikėtų padaryti prieš pripildant indus, kuriuose bus auginami augalai.

Dirvožemio paviršiaus apdorojimas bandomąja medžiaga

17. Atliekant augalų apsaugos produktų bandymus, bandomoji cheminė medžiaga dažnai naudojama apipurškiant bandomuoju tirpalu dirvožemio paviršių. Visa bandymams naudojama įranga, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos ruošimo ir dozavimo įrangą, turėtų būti tokio modelio ir gebos, kad, naudojant tą įrangą, bandymus būtų galima atlikti tiksliai ir prireikus pakartoti. Bandomąja medžiaga turėtų būti vienodai padengiamas visų bandinių dirvožemio paviršius. Reikėtų stengtis apsisaugoti nuo galimos cheminės medžiagos įgerties į naudojamą įrangą ar reakcijų su šia įranga (pvz., plastikiniais vamzdeliais ir lipofilinėmis medžiagomis arba plieninėmis dalimis ir elementais). Bandomoji cheminė medžiaga užpurškiama ant dirvožemio paviršiaus imituojant įprastą purškimą žemės ūkyje naudojamais purkštuvais. Paprastai užpurškiamas toks medžiagos kiekis, koks naudojamas pagal įprastą žemės ūkio praktiką; atitinkami (vandens ir kt.) kiekiai turėtų būti nurodyti ataskaitoje. Reikėtų rinktis tokį purkštuvo antgalį, kad būtų tolygiai padengiamas visas dirvožemio paviršius. Jeigu naudojami tirpikliai ir nešikliai, reikėtų paruošti antrą kontrolinių augalų, į kurių indus bus dedama tik tirpiklio arba nešiklio, grupę. To daryti nereikia, kai augalų apsaugos produktai bandomi kaip preparatai.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (normos) patikrinimas

18. Bandymui pasirinktas cheminės medžiagos koncentracijas (naudojimo normas) būtina patikrinti atliekant tinkamą patvirtinamąją analizę. Visas tirpių cheminių medžiagų bandymo koncentracijas (normas) galima patvirtinti išanalizuojant bandymui naudojamą didžiausios koncentracijos bandomąjį tirpalą, jo vėlesnį skiedimą aprašant bandymo dokumentuose ir naudojant tinkamą kalibruotą įrangą (pvz., kalibruotus analizei skirtus stiklinius indus, kalibruotą purškimo įrangą). Atliekant netirpių cheminių medžiagų bandymus, gautą sudėtinę medžiagą būtina patikrinti pagal bandomosios cheminės medžiagos, dedamos į dirvožemį, masę. Jei būtina įrodyti dirvožemio vienalytiškumą, gali reikėti jį išanalizuoti.

PROCEDŪRA

Bandymo planas

19. Į indus pasėjamos tos pačios rūšies augalų sėklos. Į vieną indą sėjamų sėklų kiekis priklauso nuo augalų rūšies, indo dydžio ir bandymo trukmės. Viename inde turėtų būti tiek augalų, kad jie per visą bandymo trukmę galėtų augti tinkamomis sąlygomis ir jiems nebūtų per ankšta. Augalai turėtų būti sėjami ne tankiau kaip maždaug 3–10 sėklų 100 cm² plote (priklausomai nuo sėklų dydžio). Pavyzdžiui, 15 cm skersmens inde patartina auginti 1–2 kukurūzų, sojų, pomidorų, agurkų ar cukrinių runkelių daigus, tris rapsų ar žirnių daigus arba 5–10 svogūnų, kviečių ar kitų smulkiasėklių augalų daigų. Sėklų ir kartotinių indų (kartotiniais bandiniais laikomi indai, todėl atskiri tame pačiame inde augantys augalai nėra kartotiniai bandiniai) skaičius turėtų būti tinkamas statistinei analizei efektyviai atlikti (21). Pažymėtina, kad rezultatų kintamumas yra didesnis tada, kai į vieną (kartotinį) indą pasėjama mažiau, tačiau didesnių bandomosios rūšies augalų sėklų, negu tada, kai į indą galima pasėti daugiau smulkių sėklų. Šį kintamumą galima sumažinti į kiekvieną indą sėjant po vienodą augalų skaičių.
20. Siekiant užtikrinti, kad per bandymą būtų stebimas tik bandomosios cheminės medžiagos sukeltas ar su ja susijęs poveikis, naudojamos kontrolinės grupės. Tinkama kontrolinė grupė turėtų būti visais atžvilgiais tapati bandomajai grupei, išskyrus tai, kad ji nepatiria bandomosios cheminės medžiagos poveikio. Visi per vieną bandymą naudojami augalai, įskaitant kontrolinius augalus, turėtų būti gauti iš to paties šaltinio. Kad būtų išvengta vertinimo klaidų, būtina atsitiktine tvarka paskirstyti bandymo ir kontrolinius indus.
21. Reikėtų stengtis nenaudoti insekticidais ar fungicidais padengtų (t. y. beicuotų) sėklų, tačiau kai kurios reguliavimo institucijos leidžia naudoti tam tikrus nesisteminius kontaktinius fungicidus (pvz., kaptaną, tiramą) (22). Jeigu esama susirūpinimo dėl per sėklas platinamų patogeninių organizmų, galima trumpai pamirkyti sėklas silpname 5 % hipochlorito tirpale, tada kruopščiai perplauti tekančiu vandeniu ir išdžiovinti. Sėklų negalima papildomai apdoroti kitu augalų apsaugos produktu.

Bandymo sąlygos

22. Bandymo sąlygos turėtų būti artimos normaliam bandomųjų rūšių ir veislių augalų augimui reikalingoms sąlygoms (tinkamų bandymo sąlygų pavyzdžių pateikta 4 priedėlyje). Sudygę augalai turėtų būti pagal gerąją daržininkystės praktiką prižiūrimi reguliuojamo klimato kameroje, fitotronuose arba šiltnamiuose. Naudojant specialias augalams auginti skirtas patalpas, jose paprastai turėtų būti kontroliuojama ir pakankamai dažnai (pvz., kartą per dieną) užrašoma temperatūra, drėgnis, anglies dioksido koncentracija, šviesos (stiprio, bangų ilgio, fotosintezės tinkamos apšvietos) ir apšvietimo trukmės duomenys, laistymo būdas ir t. t., siekiant užtikrinti, kad augalai gerai augtų, palyginti su kontroliniais tos rūšies augalais. Temperatūra šiltnamyje turėtų būti reguliuojama vėdinimo, šildymo ir (arba) vėsinimo sistemomis. Apskritai bandymus šiltnamyje rekomenduojama atlikti tokiomis sąlygomis:

— 22 ± 10 °C temperatūra;

— 70 ± 25 % drėgnis;

— apšvietimo trukmė – ne mažiau kaip 16 šviesos valandų per parą;

— 350 ± 50 μ E/m²/s šviesos stipris. Jeigu šviesos stipris yra mažesnis nei 200 μ E/m²/s, o bangų ilgis nesiekia 400–700 nm intervalo, gali reikėti papildomo apšvietimo, išskyrus tuos atvejus, kai naudojamoms rūšims reikia mažiau šviesos.

Aplinkos sąlygos turėtų būti stebimos ir užrašomos per visą tyrimo trukmę. Augalai turėtų būti auginami neaktyuose plastikiniuose ar glazūruotuose induose, po kuriais padėti padėklai arba lėkštelės. Indus galima reguliariai perstatyti siekiant, kad augalai augtų vienodai (taip sumažinant kintamumą dėl auginimo patalpose esamų nevienodų bandymo sąlygų). Indai turi būti pakankamai dideli, kad augalai juose galėtų normaliai augti.

23. Dirvožemio mitybines medžiagas galima papildyti, kai to reikia augalų gyvybingumui palaikyti. Ar reikia papildomų mitybinių medžiagų, ir kada jų dėti, galima sužinoti stebint kontrolinius augalus. Bandymo indus patartina drėkinti iš apačios (pvz., naudojant stiklo pluošto vamzdelius), tačiau iš pradžių galima laistyti iš viršaus, nes taip skatinamas sėklų dygimas ir, jeigu bandomąja medžiaga padengtas dirvožemio paviršius, palengvinama jos skverbis į dirvožemį.

24. Konkrečios auginimo sąlygos turėtų būti tinkamos bandomajai augalų rūšiai ir tiriamai cheminei medžiagai. Kontrolinių ir bandomųjų grupių augalai turi būti laikomi vienodomis aplinkos sąlygomis, tačiau reikėtų imtis tinkamų priemonių, kad (pvz., lakiosios) bandomosios cheminės medžiagos neprasiskverbtų iš vienos bandomosios grupės į kitą ir nepaveiktų kontrolinės grupės augalų.

Vienos koncentracijos (normos) bandymas

25. Siekiant nustatyti tinkamą cheminės medžiagos koncentraciją arba normą, kad būtų galima atlikti vienos (poveikio / ribinės) koncentracijos arba normos bandymą, būtina atsižvelgti į kelis veiksnius. Per bendrosios paskirties cheminių medžiagų bandymus tie veiksniai yra cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės. Per augalų apsaugos produktų bandymus būtina atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, naudojimo pobūdį, jos didžiausią koncentraciją arba naudojimo normą, kiek kartų ji naudojama per sezoną, ir (arba) jos patvarumą. Siekiant nustatyti, ar bendrosios paskirties cheminė medžiaga turi fitotoksinių savybių, gali reikėti bandymui naudoti didžiausią jos kiekį – 1 000 mg vienam sausos dirvožemio masės kilogramui.

Intervalo nustatymo bandymas

26. Kai reikia, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą siekiant sužinoti, kokias bandomosios medžiagos koncentracijas ar normas tinka naudoti per nustatomąją dozės ir atsako tyrimą. Atliekant intervalo nustatymo bandymą, bandymui turėtų būti pasirinktas pakankamai platus koncentracijų (normų) intervalas (pvz., 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg medžiagos vienam sausos dirvožemio masės kilogramui). Per augalų apsaugos produktų bandymus reikiamas koncentracijas (normas) galima pasirinkti pagal rekomenduojamą arba didžiausią koncentraciją ar naudojimo normą, pvz., 1/100, 1/10 ar 1/1 rekomenduojamos arba didžiausios koncentracijos ar naudojimo normos.

Kelių koncentracijų (normų) bandymai

27. Bandymo, kuriam pasirenkamos kelios bandomosios medžiagos koncentracijos (normos), tikslas yra nustatyti jos dozės ir atsako santykį, taip pat nustatyti poveikio daigų pasirodymui, biomasei ir (arba) išvaizdai, palyginti su tos medžiagos poveikio nepatiriančiais kontroliniais bandiniais, EC_x arba ER_x vertę pagal reguliavimo institucijų reikalavimus.
28. Pasirinktų koncentracijos verčių arba normų skaičius ir intervalas turėtų būti pakankami, kad būtų galima gauti patikimą dozės ir atsako santykį bei regresijos lygtį ir EC_x arba ER_x įvertį. Pasirinktų koncentracijų (normų) intervalas turėtų apimti nustatomas EC_x arba ER_x vertes. Pavyzdžiui, jeigu reikia nustatyti EC_{50} vertę, bandymui patartina rinktis tokias bandomosios medžiagos normas, kad poveikis būtų 20–80 %. Šiuo tikslu rekomenduojama rinktis ne mažiau kaip penkias bandymo koncentracijos vertes (normas), išdėstytas geometrine progresija, kurios daugiklis neviršytų 3, kartu su kontroline neapdorota grupe. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti mažiausiai 4 kartotiniai bandiniai, o sėklų iš viso turi būti ne mažiau kaip 20. Bandymui naudojant kai kuriuos augalus, kuriems būdingas mažas daigumas arba netolygus augimas, siekiant atlikti statistiškai patikimesnį bandymą, gali reikėti naudoti daugiau kartotinių bandinių. Jeigu bandymui pasirenkama daugiau koncentracijos verčių (normų), kartotinių bandinių gali būti mažiau. Jeigu reikia įvertinti NOEC, siekiant reikiamo statistinio patikimumo, gali reikėti naudoti daugiau kartotinių bandinių (23).

Stebėjimai

29. Stebėjimo laikotarpiu, t. y. 14–21 dieną po 50 % kontrolinių augalų (ir, kai tinka, tirpiklio kontrolinių bandinių augalų) sudygimo, augalai dažnai apžiūrimi (bent kartą per savaitę, jeigu įmanoma – kasdien) ir įvertinamas daigų pasirodymas, pastebimi fitotoksiškumo požymiai bei mirtingumas. Baigiant bandymą reikėtų užrašyti išmatuotą likusių gyvų augalų daigų pasirodymo procentinį lygį ir biomasę ir aprašyti pastebėtą kenksmingą poveikį įvairioms augalo dalims. Tai gali būti pakitusi pasirodžiusių daigų išvaizda, sulėtėjęs augimas, chlorozė, spalvos pakitimas, žūstamumas ir poveikis augalo vystymuisi. Galutinę biomasę galima išmatuoti pagal galutinę vidutinę likusių gyvų daigų sausosios medžiagos masę, nupjovus daigus ties dirvožemio paviršiumi ir išdžiovinus 60° C temperatūroje iki pastovios masės. Galutinę biomasę galima išmatuoti ir kitu būdu pagal šviežios daigų medžiagos masę. Dar viena vertinamoji baigtis gali būti daigo aukštis, jei to reikalauja reguliavimo institucijos. Vertinant pastebimą toksinį atsaką, pastebėtiems pažeidimams apibūdinti reikėtų naudoti vienodą vertinimo balais sistemą. Pavyzdžiui, kaip galima atlikti kokybinius ir kiekybinius augalų vertinimus juos apžiūrint, pateikta nurodytoje literatūroje (23), (24).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Statistinė analizė*Vienos koncentracijos (normos) bandymas*

30. Kiekvienos rūšies augalų duomenis reikėtų išanalizuoti taikant tinkamą statistinį metodą (21). Ataskaitoje reikėtų nurodyti pasirinktos bandomosios medžiagos koncentracijos (normos) poveikio lygį arba nurodyti, kad esant tai koncentracijai (normai), tokio poveikio nepatirta (pvz., esant y koncentracijai arba normai, pastebėtas $< x$ % poveikis).

Kelių koncentracijų (normų) bandymas

31. Dozės ir atsako santykis nustatomas pagal regresijos lygtį. Galima naudoti įvairius modelius: pvz., vertinant EC_x arba ER_x (kaip antai EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) ir šių verčių pasiklivimo ribas, daigų pasirodymą išreiškiant dvireikšmiais kintamaisiais, gali būti tinkama naudoti logito, probito, Weibull, Spearman-Kärber, sutrumpintą Spearman-Kärber ar kitus metodus. Nustatant daigų augimą (masę ir aukštį) kaip tolydžias vertinamąsias baigtis, EC_x arba ER_x ir šių verčių pasiklivimo ribas galima įvertinti atliekant tinkamą regresinę analizę (pvz., netiesinės regresijos analizę pagal Bruce ir Versteeg (25)). Kai įmanoma, jautriausių rūšių R^2 vertė turėtų būti 0,7 arba didesnė, o bandymui pasirinktos koncentracijos (normos) turėtų apimti 20–80 % poveikį. Jei reikia įvertinti NOEC, patartina taikyti patikimus statistinius kriterijus, kuriuos reikėtų pasirinkti remiantis duomenų paskirstymu (21), (26).

Bandymo ataskaita

32. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikti atliktų tyrimų rezultatai ir išsamiai aprašytos bandymo sąlygos, pateiktas išsamus rezultatų aptarimas, duomenų analizė ir šios analizės išvados. Reikėtų pateikti suvestinę rezultatų lentelę ir santrauką. Ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

- Cheminės medžiagos atpažinties duomenys, svarbios bandomosios cheminės medžiagos savybės (pvz., $\log P_{ow}$, tirpumas vandenyje, garų slėgis, jei žinoma – informacija apie išliekamumą ir elgseną aplinkoje).
- Išsami informacija apie bandymo tirpalo ruošimą ir bandymui pasirinktų koncentracijų patikrinimą, kaip nurodyta 18 skirsnyje.

Bandomosios rūšys

- Informacija apie bandomuosius organizmus: rūšis (veislė), augalų šeimos, moksliniai ir bendriniai pavadinimai, gavimo šaltinis; kuo išsamiau aprašyta sėklų kilmė (t. y. tiekėjo pavadinimas, procentinis daigumas, sėklų dydžio kategorija, siuntos arba partijos numeris, kuriais metais arba per kurį augimo sezoną surinktos sėklos, daigumo nustatymo data), gyvybingumas ir t. t.
- Bandymui naudotų vienaskilčių ir dviskilčių augalų rūšių skaičius.
- Naudotų rūšių pasirinkimo priežastys.
- Sėklų laikymo, tvarkymo ir priežiūros aprašymas.

Bandymo sąlygos

- Bandymo patalpa (pvz., auginimo kamera, fitotronas ir šiltnamiai).
- Bandymo sistemos aprašymas (pvz., augalams auginti skirtų indų matmenys, iš kokios medžiagos pagaminti tie indai, naudojami dirvožemio kiekiai).
- Dirvožemio savybės (dirvožemio struktūra arba rūšis: dirvožemio granulometrinė sudėtis ir klasifikacija, fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant organinės medžiagos kiekį (%), organinės anglies kiekį (%) ir pH vertę).
- Dirvožemio arba substrato (pvz., dirvožemio, dirbtinio dirvožemio, smėlio ar kt.) paruošimas prieš bandymą.
- Mitybinės terpės (jei naudojama) aprašymas.

- Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas: naudojimo būdo aprašymas, naudojamos įrangos aprašymas, tos medžiagos poveikio lygiai ir kiekiai, be kita ko, patikrinti cheminės analizės būdu, taikyto kalibravimo metodo aprašymas ir aplinkos sąlygų, buvusių naudojant bandomąją medžiagą, aprašymas.
- Augalų auginimo sąlygos: šviesos stipris (pvz., fotosintezai tinkama apšvieta), apšvietimo trukmė, aukščiausia ir žemiausia temperatūros, laistymo grafikas ir būdas, tręšimas.
- Sėklų skaičius viename inde, vieną bandomosios medžiagos dozę gavusių augalų skaičius, kiekvieno poveikio lygio kartotinių bandinių (indų) skaičius.
- Kontrolinių bandinių (neigiamų ir (arba) teigiamų kontrolinių bandinių, tirpiklio, jei naudojamas, kontrolinių bandinių) rūšis ir skaičius.
- Bandymo trukmė.

Rezultatai

- Visų kiekvieno kartotinio bandinio, bandymui pasirinktos koncentracijos (normos) ir bandomosios rūšies vertinamųjų baigčių lentelė.
- Bandomosios grupės sėklų daigumas (išreikštas skaičiumi ir procentais), palygintas su kontrolinės grupės sėklų daigumu.
- Biomasės (sausos arba šviežios daigų medžiagos masės) matavimai, išreikšti kontrolinės grupės biomasės procentine dalimi.
- Augalų daigų aukštis, išreikštas kontrolinės grupės daigų aukščio procentine dalimi (jeigu matuojamas).
- Pastebėti dėl bandomosios cheminės medžiagos poveikio atsiradę daigų pažeidimai, išreikšti procentiniu dydžiu, ir tų pastebėtų pažeidimų (chlorozės, nekrozės, vytimo, lapų ir stiebų deformacijos arba jokio poveikio, jei jo nepastebėta) kokybinis bei kiekybinis apibūdinimas, palyginant su kontroliniais augalais.
- Jei pastebėti pažeidimai vertinami balais – naudojamos balų sistemos aprašymas.
- Jei tyrimui pasirinkta tik viena bandomosios medžiagos norma, reikėtų nurodyti pažeidimų dydį, išreikštą procentais.
- EC_x arba ER_x (pvz., EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) vertės ir atitinkamos pasiklivimo ribos. Jei atliekama regresinė analizė, pateikite regresinės lygties standartinę paklaidą ir atskirų parametrų įverčio (pvz., nuolydžio, atkarpos) standartinę paklaidą.
- Jeigu apskaičiuotos – NOEC (ir LOEC) vertės.
- Taikytų statistinių procedūrų ir padarytų prielaidų aprašymas.
- Šių duomenų grafinė schema ir bandomosios rūšies dozės bei atsako santykis.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti neįprasti reiškiniai.

NUORODOS

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

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

-
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25:386-389.
- (24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
- (26) Šio priedo C.33 skyrius. Sliekų (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*) reprodukcijos bandymas.
-

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Veiklioji medžiaga (arba aktyvioji medžiaga) – medžiaga, naudojama siekiant sukelti tam tikrą biologinį poveikį (pvz., skirta vabzdžių kontrolei, augalų ligų kontrolei, piktžolių kontrolei ta medžiaga apdorojamame plote), taip pat vadinama techniškai gryna veikliąja medžiaga ar aktyviąja medžiaga.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Augalų apsaugos produktai (AAP) arba pesticidai – specifinio biologinio aktyvumo medžiagos, tikslingai naudojamos kultūriniais augalams nuo kenkėjų (pvz., grybelinių ligų, vabzdžių ir kitų konkuruojančių augalų) apsaugoti.

$EC_x \cdot x$ % poveikio koncentracija arba $ER_x \cdot x$ % poveikio lygis – bandomosios medžiagos koncentracija arba lygis, kuriam esant pasireiškia x % nepageidaujamas pokytis arba nuokrypis nuo bandymo vertinamosios baigties, palyginti su kontroline grupe (pvz., 25 arba 50 % mažesnis pasirodžiusių daigų skaičius, daigų aukštis, galutinis gyvų augalų skaičius arba pastebėtų pažeidimų dydis reikštų atitinkamai EC_{25} / ER_{25} arba EC_{50} / ER_{50}).

Daigo pasirodymas – augalo diegamakštės arba sėklaskiltės pasirodymas virš dirvožemio paviršiaus.

Preparatas – apibrėžtos sudėties komercinis produktas, kurio sudėtyje yra veikliosios medžiagos (aktyviosios medžiagos), taip pat vadinamas galutiniu preparatu ⁽¹⁾ arba įprastu galutinio naudojimo produktu (angl. *typical end-use product*, TEP).

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas jos poveikis. Atliekant šį bandymą, LOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį padaro statistškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe, ir yra didesnė nei NOEC vertė.

Netiksliniai augalai – augalai, augantys už tikslinių augalų ploto ribų. Naudojant augalų apsaugos produktus, netiksliniais augalais paprastai vadinami už tais produktais apdorojamo ploto ribų esantys augalai.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Fitotoksiškumas – neigiami įprastos augalų išvaizdos ir augimo pakitimai (nustatomi atliekant matavimus ir apžiūrint augalus) dėl atsako į konkrečios cheminės medžiagos poveikį.

Kartotinis bandinys – kontrolinėje grupėje ir (arba) bandomojoje grupėje esantis reprezentatyvus bandymo vienetas. Per šiuos tyrimus kartotinis bandinys yra indas, kuriame auginami augalai.

Išvaizdos vertinimas – pastebimos augalams padarytos žalos vertinimas balais apžiūrint sudygusius augalus, jų gyvybingumą, deformacijas, chlorozę, nekrozę ir bendrą išvaizdą, palyginti su kontroline grupe.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

⁽¹⁾ Galutinis preparatas – apibrėžtos sudėties komercinis produktas, kurio sudėtyje yra veikliosios medžiagos (aktyviosios medžiagos).

2 priedėlis

Bandymams iki šiol naudotų augalų rūšių sąrašas

Šeima	Rūšis	Bendriniai pavadinimai
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Paprastoji morka
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Paprastoji saulėgrąža
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Sėjamoji salota
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Baltoji garstyčia
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kininis kopūstas
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Sėjamasis rapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Gūžinis kopūstas
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Ropė
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Sėjamoji pipirnė
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Valgomasis ridikas
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Paprastasis runkelis
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Paprastasis agurkas
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Gauruotoji soja
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Spindulinė pupuolė
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Daržinė pupelė, šparaginė pupelė
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Sėjamasis žirnis
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Vaistinė ožragė
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Paprastasis garždenis
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Raudonasis dobilas
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Sėjamasis vikis
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Sėjamasis linas
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Sėjamasis grikis
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Pomidoras

Šeima	Rūšis	Bendriniai pavadinimai
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Valgomasis svogūnas
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Sėjamoji aviža
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Paprastasis miežis
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Daugiametė svidrė
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Sėjamasis ryžis
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Sėjamasis rugys
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgas
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Paprastasis kvietys
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Paprastasis kukurūzas

Galimų naudoti nekultūrinių augalų rūšių sąrašas

Toksiškumo augalams bandymams galimos naudoti rūšys pagal EBPO

Pastaba. Tolesnėje lentelėje pateikiama informacija apie 52 nekultūrinių augalų rūšis (skliausteliuose pateiktos kiekvienai rūšiai svarbios literatūros nuorodos). Lentelėje pateikiami daigų pasirodymo duomenys yra paimti iš publikuotos literatūros ir skirti tik susipažinti; reali padėtis gali priklausyti nuo to, iš kokio šaltinio gautos sėklos, ir nuo kitų veiksnių.

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Builinė dygūnė)	V arba Dv Auga žmogaus veiklos palietose vietose, gyvatvorėse, ganyklose (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	Š = T (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje (7, 14, 18, 19), sėklas gali reikėti subrandinti (19), tamsa stabdo dygimą (1, 19), nereikia specialaus paruošimo (5)	PO (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Daugiametė saulutė)	D Auga pievose, arimuose laukuose, vejose (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	Š = T (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), nereikia specialaus paruošimo (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (Rugiagėlė)	V Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16)	4,1–4,9 (4, 14)	Š = T (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	nereikia specialaus paruošimo (2, 4)	PO (2, 4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (Juodoji bajorė)	D Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	sėklas gali reikėti subrandinti (18, 19), tamsa stabdo dygimą (19), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (Didysis debesylas)	D Auga drėgnose, žmogaus veiklos palietose vietose (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		nereikia specialaus paruošimo (4)	PO (4)	A, F	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (Vienagraižė snaudalė)	D Auga laukuose, pakelėse, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (17, 18, 19), nereikia specialaus paruošimo (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Plaukuotoji rudbekija)	D, Dv Auga žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	0,3 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	nereikia specialaus paruošimo (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (Kanadinė rykštenė)	D Auga ganyklose, atvirose vietose (16)	0,06–0,08 (4, 14)	Š = T (11)	0 (4)	14–21 (11)	sumaišyti su tokiu pačiu smėlio kiekiu ir 24 val. mirkyti 500 ppm gibberelino (GA) tirpale (11), nereikia specialaus paruošimo (4)	PO (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (Pensilvaninis dagišius)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		tamsa gali stabdyti dygimą (1), 12 val. mirkyti šiltame vandenyje (29)	PRIEŠ IR PO (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (Dygliuotasis dagišius)	V Auga atvirose augimvietėse (16)	200 (14)	Š = T (14) Š > T (6)	10 (6)		skarifikavimas (14), nereikia specialaus paruošimo (6)	PRIEŠ IR PO (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (Paprastasis dagišius)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	67,4 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 21)		nereikia specialaus paruošimo (6, 14, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 21, 28, 31)	A	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Pievinė kartenė)	D Auga laukuose, pakelėse, vejose (16, 19)	0,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Šilkažiedė gaisrena)	D (16)	0,21 (14)	Š = T (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	sėklas gali reikėti subrandinti (18), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 15, 22–26)	PO (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (Baltoji balanda)	V Auga laukų pakraščiuose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	Š = T (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	apdorojimas priklauso nuo sėklų spalvos (19), per ramybės periodą sėklos laikomos sausai (19), tamsa stabdo dygimą (1, 18, 19), stratifikavimas šaltyje (18), nereikia specialaus apdorojimo (14, 34)	PRIEŠ IR PO (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Paprastoji jonažolė)	D Auga laukuose, ariamose dirvose, atvirose augimvietėse (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	Š = T (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (1, 18, 19) nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Gebenlapis sukutis)	V Auga pakelėse, atvirose augimvietėse, javų laukuose (16)	28,2 (14)	Š > T (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1) nereikia specialaus apdorojimo (6, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Riešutinė viksvuolė)	D Auga ariamose dirvose, ganyklose, pakelėse (16, 30)	0,2 (14)	Š = T (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	tamsa stabdo dygimą (1) nereikia specialaus apdorojimo (6, 10, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 28, 31)	B	7

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Paprastasis garždenis)	D Auga pievose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	skarifikavimas (14, 19) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), nereikia specialaus apdorojimo (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (Bukalapė velniapupė)	V Auga drėgnuose miškuose (16)	23–28 (9)	Š = T (14) Š > T (9)	10–20 (6, 9)		sėklas 24 val. mirkyti vandenyje (9) skarifikavimas (14), sėklų gyvybingumas priklauso nuo spalvos (1), nereikia specialaus apdorojimo (6)	PO (6, 9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (Agatpupė)	V Auga aliuviniuose dirvožemiuose (16)	11–13 (9, 14)	Š > T (9)	10–20 (9, 21)		sėklas 24 val. mirkyti vandenyje (9) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (21)	PRIEŠ IR PO (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (Raudonasis dobilas)	D Auga laukuose, pakelėse, ariamose dirvose (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	skarifikavimas (14, 18) sėklas gali reikėti subrandinti (19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1, 19), nereikia specialaus apdorojimo (5)	PO (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (Paprastoji sukatžolė)	D Atvirose vietose (16)	0,75–1,0 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (4, 14)	PO (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (Šaltmėtė)	D Auga drėgnose vietose (16)	2,21 (4)		0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (4)	PO (4)	F	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (Paprastoji katžolė)	D Auga žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	0,54 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (Paprastoji juodgalvė)	D Auga ariamose dirvose, pievose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	Š = T (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19) didesnės sėklos geriau sudygsta (1), nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (Vaistinė notra)	D Auga pievose, laukų pakraščiuose (19)	14–18 (14, 19)	Š = T (14)		7 (50 %) (19)	nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilón theophrasti</i> (Pluoštinis galenis)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	8,8 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikavimas (14) nereikia specialaus apdorojimo (5, 10, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (Dygioji sida)	V Auga laukuose, pakelėse (16)	3,8 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 21)		skarifikavimas (14) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (6, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Aguona birulė)	V Auga laukuose, ariamose dirvose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	Š = T (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje ir skarifikavimas (1, 19, 32) nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Paprastoji smilga)	Auga vejose, ganyklose (16)	0,07 (14)	Š > T (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	tamsa stabdo dygimą (1, 17–19), nereikia specialaus apdorojimo (10)	PO (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (Pelinis pašiaušėlis)	V Auga pievose, atvirose augimvietėse (16)	0,9-1,6 (29, 34)	Š = T (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikavimas (14), apdorojimas 101 mg/L KNO ₃ (14), stratifikavimas šiltai (1), tamsa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (34)	PRIEŠ IR PO (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (Tuščioji aviža)	V Auga dirbamoje žemėje, atvirose augimvietėse (16)	7–37,5 (14, 30)	Š = T (14) Š > T (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikavimas (7, 32), tamsa stabdo dygimą (1) stratifikavimas šaltyje (1, 18), nereikia specialaus apdorojimo (6, 10, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (Smiltyninė diršė)	V Auga laukuose, pakelėse, ariamose dirvose (16)	0,45–2,28 (14, 29)	Š = T (14)	3 (29)		brandinimo periodas (1, 7, 32), šviesa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (14)	PRIEŠ IR PO (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (Paprastoji kietavarpė)	D Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	Š = T (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (19), nereikia specialaus apdorojimo (14, 29)	PO (5)	A	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (Raudonoji pirštuotė)	V Auga laukuose, vejose, atvirose augimvietėse (16)	0,52–0,6 (14, 30)	Š = T (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikavimas, stratifikavimas šaltyje ir brandinimas (1, 7, 14, 32), apdorojimas 101 mg/L KNO ₃ (14), tamsa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (21)	PRIEŠ IR PO (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (Paprastoji rietmenė)	V (16)	1,5 (14)	Š = T (14) Š > T (3)	10–20 (7, 21)		skarifikavimas (7, 32), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (3, 14, 21)	PRIEŠ IR PO (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (Kanadinis elimas)	D Auga pakrantėse, žmogaus veiklos palietose vietose (16)	4–5 (14, 30)	Š = T (11)	1 (11)	14–28 (11)	nereikia specialaus apdorojimo (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (Tikrasis eraičinas)	D Auga laukuose, drėgnose vietose (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	Š = T (14) Š > T (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	nereikia specialaus apdorojimo (10, 19)	PO (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (Žemasis miežis)	V Auga ganyklose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16)	3,28 (14)				stratifikavimas šiltai (1), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1)	PRIEŠ (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (Pašarinis motiejukas)	D Auga ganyklose, ariamuose laukuose, žmogaus veiklos palietose vietose (16, 19)	0,45 (14, 19)	Š > T (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	tamsa stabdo dygimą (19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (17), nereikia specialaus apdorojimo (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (Vijoklinis rūgtis)	V Auga atvirose augimvietėse, pakelėse (16)	5–8 (4, 14, 29)	Š = T (20)	0–2 (4, 29)		stratifikavimas šaltyje 4–8 savaites (1, 2, 4, 20, 29), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1)	PRIEŠ IR PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (Trumpamakštis rūgtis)	V Auga drėgnuose dirvožemiuose (16)	1,8–2,5 (14)	Š > T (6)		5 (94 %) (18)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), tamsa stabdo dygimą (18), stratifikavimas šaltyje (1), nereikia specialaus apdorojimo (5)	PRIEŠ IR PO (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (Pensilvaninis rūgtis)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratifikavimas šaltyje 4 savaites, esant 0–5 °C temperatūrai (1, 29), tamsa stabdo dygimą (1)	PRIEŠ (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (Dėmėtasis rūgtis)	V Auga žmogaus veiklos paliestose vietose, ariamose dirvose (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	Š > T (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikavimas, stratifikavimas šaltyje, apdorojimas giberelinu (14), stratifikavimas šaltyje, brandinimas (17–19), tamsa stabdo dygimą (19), nereikia specialaus apdorojimo (13)	PO (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (Rauktalapė rūgštytė)	D Auga ariamuose laukuose, pakelėse, atvirose vietose (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	Š = T (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), sėklas gali reikėti subrandinti (18), nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsa sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Raudonžiedis progailis)	V Auga ariamuose laukuose, atvirose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje, apdorojimas giberelinu (1,14, 18, 19, 32), dygimui reikia šviesos (1), nereikia specialaus apdorojimo (2, 4)	PO (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Aitrusis vėdrynas)	D Auga ariamuose laukuose, pakelėse, atvirose vietose (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	Š = T (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 24–26)	PO (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Geltonoji žiogė)	D Auga gyvatvorėse, drėgnose vietose (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), stratifikavimas šiltai (1), nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Kibusis lipikas)	V Auga ariamuose laukuose, drėgnose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	7–9 (14, 19)	Š = T (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratifikavimas šaltyje (1, 18, 19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), šviesa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (6, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (Paprastasis lipikas)	D Auga gyvatvorėse, atvirose vietose (8)	7 (29)	Š = T (14)	2 (29)		nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Paprastoji rusmenė)	Dv, D Auga gyvatvorėse, atvirose vietose (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	Š = T (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (1, 17–19), nereikia specialaus apdorojimo (4, 22–26)	PO (4, 22–26)	D, G, F	

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė ⁽¹⁾	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė ⁽²⁾	Sėjimo gylis (mm) ⁽³⁾	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos ⁽⁴⁾	Specialus paruošimas ⁽⁵⁾	Toksiškumo bandymas ⁽⁶⁾	Sėklų tiekėjai ⁽⁷⁾	Kitos nuorodos ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (Persinė veronika)	V Auga ariamuose laukuose, atvirose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), stratifikavimas šaltyje (18), nereikia specialaus apdorojimo (14)	PRIEŠ IR PO (28)	A	32

⁽¹⁾ V – vienamečiai, Dv – dvimečiai, D – daugiamečiai augalai.

⁽²⁾ 11,14 ir 33 literatūros šaltiniuose nurodytas sėklų dygimui reikalingas šviesos (Š) ir tamsos (T) santykis. 3, 6, 9, 10, 13 ir 20 literatūros šaltiniuose nurodytos auginimo šiltnamiuose sąlygos.

⁽³⁾ 0 mm reiškia, kad sėklos pasėtos dirvožemio paviršiuje arba kad sėkloms sudygti reikia šviesos.

⁽⁴⁾ Nurodyti skaičiai reiškia, per kiek dienų sudygo atitinkama procentinė sėklų dalis, pagal nurodytą literatūros šaltinį, pvz., per 3 dienas sudygo 50 % sėklų (žr. 19 literatūros šaltinį).

⁽⁵⁾ Sėklų brandinimo ir (arba) stratifikavimo trukmė ne visada nurodyta. Temperatūros sąlygos nenurodytos, išskyrus atvejus, kai sėklas reikia apdoroti šaltai, nes atliekant bandymus šiltnamiuose, galimybės reguliuoti temperatūrą yra ribotos. Dauguma sėklų sudygsta ir esant šiltnamiuose įprastam temperatūrų svyravimui.

⁽⁶⁾ Nurodyta, ar atitinkamos rūšies augalai per herbicidų toksiškumo augalams bandymą tirti PRIEŠ pasirodant daigams, ar PO daigų pasirodymo virš dirvožemio paviršiaus.

⁽⁷⁾ Pateikta sėklas tiekiančių prekybininkų pavyzdžių.

⁽⁸⁾ Nurodyti du papildomi literatūros šaltiniai, kuriais remtasi.

Nurodyti sėklų tiekėjai

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

CITUOTOS NUORODOS

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

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

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

4 priedėlis

Kai kurių rūšių kultūriniais augalams tinkamų auginimo sąlygų pavyzdžiai

Toliau aprašytos sąlygos, kaip nustatyta, tinkamos dešimties rūšių kultūriniais augalams auginti; šiomis gairėmis galima remtis auginimo kameroje bandymams naudojant ir kai kurių kitų rūšių augalus:

anglies dioksido koncentracija: 350 ± 50 ppm;

santykinis drėgnis: 70 ± 5 % šviesos periodais, 90 ± 5 % tamsos periodais;

temperatūra: 25 ± 3 °C dienomis, 20 ± 3 °C naktimis;

apšvietimo trukmė: 16 šviesos ir 8 tamsos valandos, kai vidutinis šviesos bangų ilgis 400–700 nm;

apšvietimas: 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ skaisčio šviesa, matuojant augalinės dangos paviršiuje.

Šios kultūrinių augalų rūšys yra:

- pomidoras (*Solanum lycopersicon*);
 - paprastasis agurkas (*Cucumis sativus*);
 - sėjamoji salota (*Lactuca sativa*);
 - gauruotoji soja (*Glycine max*);
 - gūžinis kopūstas (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
 - paprastoji morka (*Daucus carota*);
 - sėjamoji aviža (*Avena sativa*);
 - daugiametė svidrė (*Lolium perenne*);
 - paprastasis kukurūzas (*Zea mays*);
 - valgomasis svogūnas (*Allium cepa*).
-

C.32. ENCHITRĖJŲ REPRODUKCIJOS BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 220 (2004). Jis skirtas cheminių medžiagų poveikiui kirmėlių enchitrėjų *Enchytraeus albidus* (Henle, 1873) reprodukcijos našumui dirvožemyje vertinti. Jis daugiausia pagrįstas Vokietijos aplinkos apsaugos agentūros *Umweltbundesamt* sukurtu metodu (1), kuriam patikrinti atliktas tarplaboratorinis bandymas (2). Svarstomos galimybės cheminių medžiagų toksiškumą *Enchytraeidae* šeimos kirmėlėms ir sliekams tikrinti ir kitais metodais (3), (4), (5), (6), (7), (8).

IŽANGINĖS PASTABOS

2. Dirvožemyje gyvenančios *Enchytraeus* genties žieduotosios kirmėlės yra ekotoksikologiniams bandymams ekologiškai svarbios rūšys. Nors enchitrėjai dažnai aptinkami tuose pačiuose dirvožemiuose, kuriuose gyvena sliekai, jų taip pat dažnai gausu ir tokių rūšių dirvožemyje, kuriame sliekų nėra. Enchitrėjus galima naudoti tiek bandymams laboratorijoje, tiek bandymams pusiau lauko arba lauko sąlygomis. Daugelio *Enchytraeus* rūšių kirmėlės praktiškai nesunku prižiūrėti ir veisti, o jų generacijos laikas kur kas trumpesnis negu sliekų. Todėl reprodukcijos bandymas naudojant enchitrėjus trunka tik 4–6 savaites, o naudojant sliekus (*Eisenia fetida*) – 8 savaites.
3. Svarbiausia informacija apie sausumos enchitrėjų ekologiją ir ekotoksikologiją pateikta literatūroje (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

4. Suaugę enchitrėjai patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos, kurios įmaišyta į dirbtinį dirvožemį, koncentracijų poveikį. Galima skirti du šio bandymo etapus: a) intervalo nustatymo bandymą, atliekamą tada, kai trūksta informacijos – tokiu atveju po dviejų bandomosios medžiagos poveikio savaitių pagrindinė vertinamoji baigtis yra organizmų gaištamumas; ir b) nustatomąjį reprodukcijos bandymą, per kurį vertinamas bendras vieno motininio gyvūno atsivestų jauniklių skaičius ir motininio gyvūnų išgyvenamumas. Nustatomasis bandymas trunka šešias savaites. Po pirmųjų trijų savaitių suaugusių kirmėlių išimamos ir aprašomi jų sandaros (morfologiniai) pakitimai. Dar po trijų savaitių suskaičiuojami iš suaugusių kirmėlių padėtų kokonų išsiritę palikuonys. Bandomosios cheminės medžiagos paveiktų gyvūnų reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės arba grupių gyvūnų reprodukcijos našumu siekiant nustatyti: i) nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir (arba) ii) EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}), pagal regresijos modelį vertinant koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x %. EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}) vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktą koncentracijos verčių intervalą, kad EC_x būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Pageidautina žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje, $\log K_{ow}$, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą (žr. šio priedo C.18 arba C.19 skyrių) ir garų slėgį. Patartina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje, kaip antai jos fotolizės ir hidrolizės lygius.
6. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, tačiau nuo tirpumo vandenyje priklauso bandomosios cheminės medžiagos naudojimo būdas. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, pvz., tokioms, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.

BANDYMO TINKAMUMAS

7. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos veiksmingumo kriterijus:
 - suaugusių gyvūnų gaištamumas, nustatytas baigus intervalo nustatymo bandymą ir po pirmų trijų reprodukcijos bandymo savaitių, neturėtų viršyti 20 %;
 - jeigu, pradedant bandymą, į kiekvieną indą įleista po 10 suaugusių kirmėlių, bandymo pabaigoje kiekviename inde turėtų būti vidutiniškai bent 25 jaunikliai;
 - vidutinio jauniklių skaičiaus variacijos koeficientas reprodukcijos bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 50 %.

Jeigu bandymas neatitinka šių tinkamumo kriterijų, jį reikėtų nutraukti, nebent įmanoma pagrįstai įrodyti, kodėl verta jį tęsti. Šį pagrindimą reikėtų pateikti bandymo ataskaitoje.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

8. Bandymai su etalonine chemine medžiaga turėtų būti atliekami reguliariais intervalais arba galbūt per kiekvieną bandymą, siekiant įsitikinti, kad bandomųjų organizmų atsakas laikui bėgant reikšmingai nesikeičia. Tinkama etaloninė cheminė medžiaga yra karbendazimas, kurio poveikis enchitrėjų išgyvenimui ir reprodukcijai įrodytas (13), (14); galima naudoti ir kitas chemines medžiagas, kurių toksiškumo duomenys yra gerai žinomi. Per tarplaboratorinį bandymą naudotas karbendazimo preparatas (prekės pavadinimas – *Derosal*TM), kurį tiekia Frankfurte (Vokietija) įsikūrusi įmonė „AgrEvo“ ir kuriame yra 360 g/l (32,18 %) veikliosios medžiagos (2). Per tarplaboratorinį bandymą nustatyta šios medžiagos poveikio reprodukcijai EC₅₀ vertė yra 1,2 ± 0,8 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui (2). Jei per bandymų seriją naudojamas teigiamas toksiškumo etalonas, pasirenkama viena koncentracija, o kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse. Kaip etaloninę medžiagą pasirinkus karbendazimą, patartina bandymui naudoti 1,2 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui (kai bandymas atliekamas su skystu preparatu).

BANDYMO APRAŠYMAS

Įranga

9. Bandymui naudojami indai turėtų būti pagaminti iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Tinka stiklainiai (pvz., 0,20–0,25 l tūrio ir ≈ 6 cm skersmens). Indų dangčiai turėtų būti perregimi (pvz., iš stiklo ar polietileno) ir tokie, kad per juos kuo mažiau garuotų vanduo, tačiau vyktų pakankama dujų apykaita tarp dirvožemio ir atmosferos oro. Dangčiai turėtų būti skaidrūs ir praleisti šviesą.
10. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:
 - džiovavimo spinta;
 - stereomikroskopas;
 - pH matuoklis ir fotometras;
 - tinkamos tikslios svarstyklės;
 - tinkama temperatūros kontrolės įranga;
 - tinkama drėgmės kontrolės įranga (nebūtinai, jeigu bandomosios medžiagos poveikis tiriamas induose su dangčiais);
 - inkubatorius arba maža patalpa su oro kondicionieriumi;
 - pincetai, vąšeliai arba instrumentai su kilpelėmis gale;
 - fotografijų ryškinimo vonelė.

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

11. Šiam bandymui naudojamas dirbtinis dirvožemis (5), (7), kurio sudėtis yra tokia (nurodyta sausosios medžiagos, išdžiovintos iki pastovios masės 105 °C temperatūroje, mase):
 - 10 % kiminių durpių, ore išdžiovintų ir smulkiai sumaltų (tinkamas dalelių dydis yra 2 ± 1 mm); prieš naudojant bandymui dirvožemį, į kurį dėta durpių iš naujo paketo, patartina įsitikinti, kad jis tinka kirmėlėms auginti;
 - 20 % kaolino molio (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

- apie 0,3–1,0 % kalcio karbonato (analiziškai grynų CaCO_3 miltelių), kad būtų gautas $6,0 \pm 0,5$ pH; dedamo kalcio karbonato kiekis gali daugiausia priklausyti nuo durpių kokybės ir (arba) rūšies;
- apie 70 % ore išdžiovinto kvarcinio smėlio (priklausomai nuo reikiamo CaCO_3 kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio.

Prieš naudojant dirvožemį nustatomajam bandymui, patartina įsitikinti, kad dirbtinis dirvožemis yra tinkamas kirmėlėms auginti ir atitinka bandymo tinkamumo kriterijus. Ypač patartina įsitikinti, kad bandymo eiga nebūtų sutrikdyta sumažinus organinės anglies kiekį dirbtiniame dirvožemyje, pvz., iki 4–5 % sumažinus durpių kiekį ir atitinkamai padidinus smėlio kiekį. Taip mažinant organinės anglies kiekį, galima sumažinti tikimybę, kad bandomoji cheminė medžiaga įsigers į dirvožemį (dėl jame esančios organinės anglies), ir padidinti kirmėlėms prieinamą bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Įrodyta, kad *Enchytraeus albidus* gali atitikti reprodukcijai taikomus bandymo tinkamumo kriterijus, bandymui naudojant iš lauko paimtą dirvožemį su mažesniu, negu nurodyta, organinės anglies kiekiu, pvz., 2,7 % (15), taip pat yra (nors ir ribotos) patirties, kad tai įmanoma pasiekti ir naudojant dirbtinį dirvožemį su 5 % durpių.

Pastaba. Naudojant natūralų dirvožemį papildomiems (pvz., aukštesnės pakopos) bandymams, taip pat reikėtų įrodyti tokio dirvožemio tinkamumą ir atitiktį bandymo tinkamumo kriterijams.

12. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., dideliame laboratoriniame maišytuve). Reikėtų tai padaryti likus bent savaitei iki bandymo pradžios. Sumaišytą dirvožemį reikėtų palaikyti dvi dienas, kad nusistovėtų (stabilizuotųsi) rūgštingumas; tinkamai pH vertei nustatyti naudojamas dirvožemio ir 1 M kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalas (santykiu 1:5), žr. (16) ir 3 priedėlį. Jeigu dirvožemio rūgštumas viršija tinkamą intervalą (žr. 11 skirsnį), jį galima pakoreguoti įdedant reikiamą CaCO_3 kiekį. Jeigu dirvožemis yra pernelyg kalkingas, jį galima pataisyti įdedant daugiau 11 skirsnyje nurodyto mišinio, tačiau nededant CaCO_3 .
13. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras. Iki bandymo pradžios likus vienai ar dviem dienoms, sausas dirbtinis dirvožemis iš pradžių sudrėkinamas įpilant pakankamai dejonizuoto vandens, kad jame būtų maždaug pusė galutinio vandens kiekio (40–60 % didžiausio vandens įmirkio). Taip iš anksto sudrėkintas dirvožemis pradedant bandymą išskirstomas į tiek dalių, kiek koncentracijų pasirinkta (įskaitant, kai tinka, etaloninę cheminę medžiagą) ir kiek kontrolinių bandinių naudojama bandymui. Dirvožemio drėgnis patikslinamas iki 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo ir (arba) papildomai įpilant distiliuoto ar dejonizuoto vandens (žr. 19–21 skirsnius). Drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant bandymą (išdžiovinant dirvožemį iki pastovios masės 105 °C temperatūroje) ir turėtų būti optimalus, kad jame išgyventų kirmėlės. Dirvožemio drėgnį galima apytikriai nustatyti nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio – jei drėgnis yra tinkamas, tarp pirštų turėtų pasirodyti smulkių vandens lašelių.

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

14. Bandymams rekomenduojama naudoti rūšis yra *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) – baltasis enchitrėjas, priklausantis *Enchytraeidae* šeimai (*Oligochaeta* būrys, *Annelida* tipas). *E. albidus* rūšies enchitrėjai yra vieni stambiausių – yra rašytinių duomenų apie iki 35 mm ilgio užaugančius egzempliorius (17), (18). *E. albidus* yra paplitę visame pasaulyje, gyvena jūrų, gėlo vandens ir sausumos buveinėse, daugiausia pūvančiose organinėse medžiagose (jūrų dumbliuose, komposte), taip pat (retai) pievose (9). Šios kirmėlės pakenčia labai įvairias ekologines sąlygas ir iš tam tikrų jų sandaros (morfologinių) pakitimų galima spręsti, kad esama kelių šios rūšies porūšių.
15. *E. albidus* kirmėlėmis prekiaujama rinkoje kaip žuvų pašaru. Reikėtų patikrinti, ar jų kultūra nėra užkrėsta kitų, paprastai smulkesnių, rūšių organizmais (1), (19). Aptikus užkratą, visas kirmėles reikėtų nuplauti vandeniu Petri lėkštelėje. Tada (naudojant stereomikroskopą) reikėtų išrinkti didelius suaugusius *E. albidus* individus, kurie bus naudojami naujai kultūrai pradėti, o visas likusias kirmėles pašalinti. *E. albidus* galima lengvai veisti naudojant labai įvairias organines medžiagas (žr. 4 priedėlį). *E. albidus* gyvenimo ciklas yra trumpas, nes šios kirmėlės subręsta per laiko tarpą nuo 33 dienų (18 °C temperatūroje) iki 74 dienų (12 °C temperatūroje) (1). Bandymui naudojamos tik tokios kultūros, kurios be jokių problemų laikytos laboratorijoje bent 5 savaites (vieną generacijos ciklą).

16. Tinka ir kitos *Enchytraeus* genties rūšys, pvz., *E. buchholzi* (Vejdovsky, 1879) arba *E. crypticus* (Westheide ir Graefe, 1992) (žr. 5 priedėlį). Jeigu naudojamos kitos *Enchytraeus* rūšys, būtina aiškiai jas identifikuoti ir ataskaitoje nurodyti jų pasirinkimo priežastį.
17. Bandymams naudojamos suaugusios kirmėlės. Jų kliteliumo vietoje turėtų būti kiaušinėlių (baltų taškų) ir jos visos turėtų būti maždaug vienodo dydžio (apie 1 cm ilgio). Jų veisimo kultūros sinchronizuoti nebūtina.
18. Jeigu enchitrėjai nėra auginami tos pačios rūšies dirvožemyje ir tokiais pačiomis (be kita ko, šėrimo) sąlygomis, kokiomis jie bus naudojami galutiniam bandymui, juos būtina aklimatizuoti bent 24 valandas, o ilgiausiai iki trijų dienų. Iš pradžių reikėtų aklimatizuoti daugiau suaugusių kirmėlių, negu reikia bandymui atlikti, kad būtų galima pašalinti pažeistus ar dėl kitų priežasčių bandymui netinkamus individus. Po aklimatizacijos periodo bandymui atrenkamos tik tos kirmėlės, kurios turi kiaušinėlių ir elgiasi įprastai (pvz., nebando išlįsti iš dirvožemio). Kirmėlės atsargiai išimamos naudojant juvelyrinį pincetą, vąšėlį arba instrumentą su kilpelėmis gale ir įdedamos į Petri lėkštelę, kurioje yra įpilta truputį gėlo vandens. Geriausia naudoti regeneruotą gėlą vandenį, kaip pasiūlyta šio priedo C.20 skyriuje (*Daphnia magna* reprodukcijos bandymas), nes kirmėlės gali pakenkti dejonizuotas, demineralizuotas ar vandentiekio vandeniu. Kirmėlės patikrinamos apžiūrint per stereomikroskopą, neturinčios kiaušinėlių pašalinamos. Kruopščiai išimamos ir pašalinamos bet kokios erkės ar kolembolos, kuriomis gali būti užkrėstos auginamos kultūros. Sveikos kirmėlės, kurios nebus naudojamos bandymui, grąžinamos į pradinę kultūrą.

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

19. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalo dejonizuotame vandenyje paruošiama tiek, kad jo pakaktų visiems vienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Patartina naudoti tinkamą vandens kiekį reikiamam drėgniui, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, pasiekti (žr. 13 skirsnį). Kiekvienas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas prieš dedant į bandymo indą gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio porcija.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Bandomąsias chemines medžiagas, kurios yra netirpios vandenyje, tačiau tirpios organiniuose tirpikliuose, galima ištirpinti minimaliame tinkamo nešiklio (pvz., acetono) kiekyje. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Nešiklis užpurškiamas ant nedidelio smulkaus kvarcinio smėlio kiekio, pvz., 2,5 g, arba su juo sumaišomas, tada pašalinamas bent vieną valandą garinant po traukos gaubtu. Taip gautas kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys sudedamas į bandymo indus.
21. Kai cheminės medžiagos yra mažai tirpios vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, kiekvienam bandymo indui imama po 2,5 g smulkiai sumalto kvarcinio smėlio, kuris sumaišomas su tinkamu bandomosios cheminės medžiagos kiekiu, kad būtų gauta bandymui reikiama jos koncentracija. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys išskirstomas į bandymo indus. Ta pati procedūra kartojama ruošiant kiekvienos koncentracijos bandinius, taip pat paruošiama tinkama kontrolinių bandinių grupė.
22. Bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos paprastai neturėtų viršyti 1 000 mg vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui, tačiau konkretaus bandymo tikslais gali reikėti rinktis ir didesnes koncentracijos vertes.

BANDYMŲ EIGA

Bandomosios ir kontrolinės grupės

23. Į kiekvienos bandomosios koncentracijos indus dedamas bandymui paruošto dirvožemio kiekis, atitinkantis 20 g sausosios medžiagos masės (žr. 19–21 skirsnius). Taip pat paruošiami kontroliniai bandiniai be bandomosios cheminės medžiagos. Į kiekvieną indą įdedama pašaro 29 skirsnyje aprašyta tvarka. Tada į

kiekvieną bandymo indą įdedama po dešimt atsitiktine tvarka atrinktų kirmėlių. Kirmėlės atsargiai perkeliama į kiekvieną bandymo indą ir padedamos dirvožemio paviršiuje naudojant, pvz., juvelyrinį pincetą, vąšėlį arba instrumentą su kilpelėmis gale. Kartotinių kiekvienos bandymo koncentracijos ir kontrolinės grupės bandinių kiekis priklauso nuo pasirinkto bandymo plano (žr. 34 skirsnį). Bandymo indai atsitiktine tvarka sustatomi į bandymui skirtą inkubatorių ir kas savaitę, taip pat atsitiktine tvarka, sukeičiami vietomis.

24. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga dedama į bandinius naudojant nešiklį, kartu su bandymo indų serija reikėtų paruošti vieną kontrolinių bandinių seriją su kvarciniu smėliu, kuris būtų apipurkštas tirpikliu arba su juo sumaišytas. Naudojamo tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų būti tokia pati, kaip ir bandymo induose, į kuriuos dėta bandomosios cheminės medžiagos. Kontrolinių bandinių, į kuriuos papildomai dedama kvarcinio smėlio (po 2,5 g į kiekvieną indą), seriją reikėtų paruošti tais atvejais, kai bandomosios cheminės medžiagos turi būti naudojamos 21 skirsnyje aprašyta tvarka.

Bandymo sąlygos

25. Bandymas atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Kad kirmėlės nebandytų iššliaužti iš dirvožemio, atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir palaikomas bandymo indų apšvietimas 400–800 lx šviesa.
26. Siekiant patikrinti dirvožemio drėgnį, indai pasveriami bandymo pradžioje ir vėliau sveriami kartą per savaitę. Trūkstama masė papildoma įpilant reikiamą dejonizuoto vandens kiekį. Pažymėtina, kad vandens netekimą galima sulėtinti palaikant didelį oro drėgnį (> 80 %) bandymo inkubatoriuje.
27. Drėgnį ir pH reikėtų išmatuoti pradedant ir baigiant tiek intervalo nustatymo bandymą, tiek nustatomąjį bandymą. Matavimus reikėtų atlikti kontroliniuose ir apdorotuose bandomąja medžiaga (visų koncentracijų) dirvožemio ėminiuose, paruoštuose ir prižiūrimuose taip pat, kaip ir bandomųjų kultūrų indai, tik be kirmėlių. Į šiuos dirvožemio ėminus pašaro reikėtų dėti tik bandymo pradžioje, siekiant paskatinti mikroorganizmų aktyvumą. Pašaro turėtų būti dedama tiek pat, kiek jo reikia bandomųjų kultūrų kirmėlėms šerti, tačiau per bandymą papildomo pašaro į šiuos indus dėti nereikia.

Šėrimas

28. Galima naudoti enchitrėjų populiacijai palaikyti tinkamą pašarą. Nustatyta, kad pašarui tinka avižiniai dribsniai; prieš naudojant patartina juos apdoroti autoklave, kad būtų išvengta užkrėtimo mikroorganizmais (taip pat galima juos pakaitinti).
29. Pašaro dedant pirmą kartą, 50 mg sumaltų avižinių dribsnių sumaišoma su dirvožemiu kiekviename inde, prieš įleidžiant kirmėles. Vėliau pašaro papildomai dedama kas savaitę iki 21 bandymo dienos. 28 bandymo dieną pašaro nededama, nes tuo metu reikia išimti suaugusius individus, o jauniklėms kirmėlėms papildomo pašaro vėliau reikia gana nedaug. Šeriant kirmėles bandymo metu, po 25 mg sumaltų avižinių dribsnių įdedama į kiekvieną indą ir atsargiai paberama dirvožemio paviršiuje, stengiantis nesužeisti kirmėlių. Kad mažiau augtų grybeliai, avižinius dribsnius reikėtų įmaišyti į dirvožemį, ant jų užberiant nedidelį dirvožemio kiekį. Jei lieka nesuvartoto pašaro, jo davinį reikėtų sumažinti.

Intervalo nustatymo bandymo planas

30. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas – 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje pakanka paruošti po vieną kartotinį bandinį.
31. Intervalo nustatymo bandymas trunka dvi savaites. Baigiant bandymą įvertinamas kirmėlių gaištamumas. Kirmėlė registruojama kaip negyva, jeigu nereaguoja į mechaninį dirgiklį priekinėje kūno dalyje. Sprendžiant, koks turėtų būti nustatomojo bandymo koncentracijos verčių intervalas, gali būti naudinga remtis ir papildoma informacija apie gaištamumą. Todėl taip pat reikėtų aprašyti suaugusių kirmėlių elgsenos pokyčius (pvz., jeigu kirmėlės nesugeba įsirausti į dirvožemį arba nejudėdamos guli prisiliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., ar nėra atvirų žaizdų) ir ar yra jauniklių. Jauniklių buvimą galima nustatyti taikant 6 priedėlyje aprašytą dažymo metodą.

32. LC_{50} galima apytikriai nustatyti apskaičiuojant gaištamumo duomenų geometrinį vidurkį. Parenkant koncentracijos verčių intervalą nustatomajam bandymui, poveikis reprodukcijai laikomas iki 10 kartų mažesniu negu LC_{50} . Tačiau tai empirinis santykis, kuris kiekvienu konkrečiu atveju gali būti skirtingas. Per intervalo nustatymo bandymą užrašytos papildomos pastabos, kaip antai dėl jauniklių buvimo, gali padėti patikslinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų intervalą, kuris bus naudojamas per nustatomąjį bandymą.
33. Siekiant tiksliai nustatyti LC_{50} , rekomenduojama atliekant bandymą naudoti bent po keturis kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinius bandinius ir parinkti tinkamą koncentracijų skaičių, kad būtų gauti mažiausiai keturi statistškai pakankamai skirtingi vidutiniai atsakai į tų koncentracijų poveikį. Kai tinka, tiek pat koncentracijos verčių ir kartotinių bandinių naudojama kontrolinėse grupėse.

Nustatomojo reprodukcijos bandymo planas

34. Remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus tarplaboratorinį bandymą, siūlomi trys bandymo planai (2):
- nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8;
 - nustatant EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}), reikėtų bandymui rinktis mažiausiai penkias koncentracijas ir EC_x turėtų patekti į tų koncentracijų intervalą, kad EC_x vertę būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu. Rekomenduojama paruošti bent po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir keturis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;
 - NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal kombinuotą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8.
35. Kiekviename bandymo inde turėtų būti dešimt suaugusių kirmėlių (žr. 23 skirsnį). Į bandymo indus dedama pašaro pradedant bandymą ir vėliau kartą per savaitę (žr. 29 skirsnį) iki 21 bandymo dienos imtinai. 21 dieną dirvožemio ėminiai kruopščiai apieskomi rankomis, gyvos suaugusios kirmėlės apžiūrimos ir suskaičiuojamos, aprašomi jų elgsenos pokyčiai (pvz., kirmėlės neįstengia įsirausti į dirvožemį ar nejudėdamos guli prisišliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos) ir morfologiniai pokyčiai (pvz., ar yra atvirų žaizdų). Tada visos suaugusios kirmėlės išimamos iš bandymo indų ir bandymui naudoto dirvožemio. Bandymui naudotas dirvožemis su visais kirmėlių padėtais kokonais dar tris savaites inkubuojamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, tačiau pašaro dedama tik 35 bandymo dieną (t. y. į kiekvieną indą įdedama po 25 mg maltų avižinių dribsnių).
36. Po šešių savaičių suskaičiuojamos iš kiaušinėlių naujai išsirusios kirmėlės. Rekomenduojama rinktis dažymo Bengalijos rožiniu (žr. 6 priedėlį) dažikliu pagrįstą metodą, nors įrodyta, kad tinka ir kiti surinkimo šlapiuoju būdu (bet nekaitinant) ir flotacijos (išplukdymo) metodai (4), (10), (11), (20). Dažymo Bengalijos rožiniu dažikliu metodą patartina rinktis todėl, kad kirmėlių surinkimą iš dirvožemio substrato šlapiuoju būdu gali apsunkinti drumstumas dėl suspenduotų molio dalelių.

Ribų nustatymo bandymas

37. Jeigu per intervalo nustatymo bandymą nenustatoma jokie bandomosios medžiagos poveikio esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg), reprodukcijos bandymą galima atlikti kaip ribinį (ribų nustatymo bandymą, naudojant 1 000 mg/kg koncentraciją, siekiant įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC viršija šią vertę).

Bandymo santrauka ir tvarkaraštis

38. Bandymo etapus galima apibendrinti taip:

Laikas	Intervalo nustatymo bandymas	Nustatomasis bandymas
Likus 7 ar daugiau dienų iki bandymo	— Paruoškite dirbtinį dirvožemį (sumaišykite sausas sudedamąsias dalis)	— Paruoškite dirbtinį dirvožemį (sumaišykite sausas sudedamąsias dalis)
Likus 5 dienoms iki bandymo	— Patikrinkite dirbtinio dirvožemio pH — Išmatuokite didžiausią dirvožemio vandens įmirkį	— Patikrinkite dirbtinio dirvožemio pH — Išmatuokite didžiausią dirvožemio vandens įmirkį
Likus 5–3 dienoms iki bandymo	— Atrinkite kirmėles aklimatizacijos periodui	— Atrinkite kirmėles aklimatizacijos periodui
3–0 dienos iki bandymo	— Aklimatizuokite kirmėles bent 24 valandas	— Aklimatizuokite kirmėles bent 24 valandas
1 diena iki bandymo	— Dirbtinį dirvožemį iš anksto sudrėkinkite ir padalykite į porcijas	— Dirbtinį dirvožemį iš anksto sudrėkinkite ir padalykite į porcijas
0 diena	— Paruoškite pradinį tirpalą — Apdorokite bandomąją chemine medžiaga — Sudėkite bandymo substratą į bandymo indus ir juose pasverkite — Įmaišykite pašaro — Įleiskite kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį	— Paruoškite pradinį tirpalą — Apdorokite bandomąją chemine medžiaga — Sudėkite bandymo substratą į bandymo indus ir juose pasverkite — Įmaišykite pašaro — Įleiskite kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį
7 diena	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
14 diena	— Nustatykite suaugusių kirmėlių gaištamumą — Įvertinkite jauniklių skaičių — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
21 diena		— Stebėkite suaugusių kirmėlių elgesį — Išimkite suaugusias kirmėles — Nustatykite suaugusių kirmėlių gaištamumą — Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
28 diena		— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Pašaro nedėkite

Laikas	Intervalo nustatymo bandymas	Nustatomasis bandymas
35 diena		— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
42 diena		— Suskaičiuokite jaunikles kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

39. Neskaitant 7 priedėlyje pateiktos apžvalgos, pagal šį bandymo metodą konkrečiai nenurodoma, kaip reikėtų atlikti statistinę bandymo rezultatų analizę.
40. Intervalo nustatymo bandymo pagrindinė vertinamoji baigtis yra bandomųjų gyvūnų gaištamumas. Tačiau taip pat reikėtų aprašyti suaugusių kirmėlių elgesio pokyčius (pvz., kirmėlės neįstengia iširausti į dirvožemį arba nejudėdamos guli prisišliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., atviras žaizdas) ir ar yra jauniklių. Nustatant LC_{50} paprastai reikėtų atlikti probito analizę (21) arba logistinę regresinę analizę. Tačiau tais atvejais, kai šis analizės metodas netinka (pvz., jeigu yra mažiau nei trys koncentracijos, kurioms esant dalis gyvūnų žūsta), galima taikyti alternatyvius metodus: tai gali būti slankiųjų vidurkių metodas (22), sutrumpintas Spearman-Kärber metodas (23) arba paprastoji interpoliacija (pvz., LC_0 ir LC_{100} geometrinis vidurkis apskaičiuojamas LC_0 kvadratinę šaknį dauginant iš LC_{100}).
41. Nustatomojo bandymo vertinamoji baigtis yra kirmėlių vislumas (t. y. atvestų jauniklių skaičius), tačiau šio bandymo, kaip ir intervalo nustatymo bandymo, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio kirmėlėms požymius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės reprodukcijos aritmetinį vidurkį ir standartinį nuokrypį.
42. Atlikus dispersinę analizę, standartinį nuokrypį s ir laisvės laipsnius df galima pakeisti suminiu dispersijos įverčiu, gautu taikant ANOVA metodą, ir, atitinkamai, jo laisvės laipsnius, jeigu dispersija nepriklauso nuo koncentracijos. Tokiu atveju naudokite bendras kontrolinių ir bandomųjų grupių dispersijos vertes. Šios vertės paprastai apskaičiuojamos naudojant komercinę statistikos programinę įrangą, kiekvieno indo rezultatus naudojant kaip kartotinio bandinio rezultatus. Jeigu atrodo, kad galima pagrįstai sujungti neigiamų ir tirpiklio kontrolinių bandinių duomenis, užuot testams naudojus tik kuriuos nors iš jų, reikėtų testais nustatyti, kad tarp jų nėra reikšmingo skirtumo (dėl tinkamų testų žr. 45 skirsnį ir 7 priedėlį).
43. Tolesni statistiniai testai ir išvados priklauso nuo to, ar kartotinių bandinių vertės sudaro normalųjį skirstinį ir ar jų dispersija yra vienalytė.

NOEC vertinimas

44. Turėtų būti taikomi patikimi statistiniai kriterijai. Reikėtų naudoti, pvz., iš ankstesnės tarplaboratorinių bandymų patirties arba kitų ankstesnių duomenų gautą informaciją apie tai, ar duomenys maždaug sudaro normalųjį skirstinį. Labiau lemiamą reikšmę turi dispersijos vienalytiškumas (homoskedastija). Iš patirties žinoma, kad dispersija dažnai didėja, didėjant vidurkiui. Šiais atvejais duomenų transformavimas gali lemti homoskedastiją. Tačiau toks transformavimas turėtų būti pagrįstas ankstesnių duomenų tvarkymo patirtimi, o ne tiriamais duomenimis. Turint vienalyčius duomenis, reikėtų taikyti kelis t kriterijus, kaip antai Williams kriterijų ($\alpha = 0,05$, vienpusis) (24), (25) arba, kai kuriais atvejais, Dunnett kriterijų (26), (27). Pažymėtina, kad netolygios replikacijos atveju lentelėje nurodytas t vertes būtina pataisyti, kaip tai siūlo Dunnett ir Williams. Kartais dėl didelės variacijos atsakai didėja arba mažėja netolygiai. Šiuo atveju, jeigu labai nukrypa nuo monotoniškumo, labiau tinka taikyti Dunnett kriterijų. Jeigu nukrypsta nuo homoskedastijos, gali būti pagrįsta atidžiau ištirti galimą poveikį dispersijoms siekiant nuspręsti, ar taikant t kriterijus per daug nesumažėtų patikimumas (28). Kitu atveju galima taikyti daugybinį U kriterijų, pvz., Bonferroni U kriterijų

pagal Holm (29), arba, kai šiems duomenims būdinga heteroskedastija, tačiau kitais atžvilgiais jie atitinka esamą monotonišką dozės ir atsako santykį, – bet kokią kitą neparametrinį kriterijų [pvz., Jonckheere-Terpstra (30), (31) arba Shirley (32), (33)], ir apskritai jam teiktina pirmenybė prieš nelygios dispersijos t kriterijus (taip pat žr. 7 priedėlyje pateiktą schemą).

45. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, galima taikyti porinį Student t kriterijų arba, kitu atveju, U kriterijaus procedūrą pagal Mann ir Whitney (29).

EC_x vertinimas

46. Apskaičiuojant bet kokią EC_x vertę, kiekvienos bandomosios grupės vidurkiai naudojami atliekant (tiesinės arba netiesinės) regresijos analizę po to, kai gaunama tinkama dozės ir atsako santykio funkcija. Siekiant gauti kirmėlių augimą kaip nenutrūkstamą atsaką, EC_x vertes galima nustatyti atliekant tinkamą regresinę analizę (35). Tarp dvireikšmiams kintamiesiems (gaištamumas arba išgyvenimas ir atsivestų jauniklių skaičius) tinkamų funkcijų yra įprastos sigmoidinės, logistinės arba Weibull funkcijos su dviem ar keturiais parametrais, iš kurių kai kurie gali taip pat sudaryti hormetinius atsakus. Jeigu dozės ir atsako funkcija buvo pritaikyta atlikus tiesinės regresijos analizę, prieš vertinant EC_x kartu su regresine analize turėtų būti nustatytas reikšmingas r^2 (determinacijos koeficiento) dydis ir (arba) nuolydis, įrašant x % atitinkančią kontrolinės grupės vidurkio vertę į lygtį, sudarytą atlikus regresinę analizę. 95 % pasiklivimo ribos apskaičiuojamos pagal Fieller (cituojuama Finney (21)) arba kitais tinkamais šiuolaikiniais metodais.
47. Kitu atveju atsakas modeliuojamas kaip pavyzdinio parametro procentinis dydis arba proporcija, aiškinama kaip vidutinis kontrolinės grupės atsakas. Šiais atvejais įprastą (logistinę, Weibull) sigmoidinę kreivę dažnai galima lengvai pritaikyti rezultatams pagal probito regresijos procedūrą (21). Tokiais atvejais svarinė funkcija turi būti pritaikyta metriniam atsakams, kaip nurodo Christensen (36). Tačiau pastebėjus hormezę, probito analizę reikėtų pakeisti keturių parametru logistine arba Weibull funkcija, pritaikyta pagal netiesinės regresijos procedūrą (36). Jeigu duomenims neįmanoma pritaikyti tinkamos dozės ir atsako funkcijos, galima rinktis alternatyvius EC_x ir jos pasiklivimo ribų vertinimo metodus, kaip antai slankiųjų vidurkių metodą pagal Thompson (22) ir sutrumpintą Spearman-Kärber procedūrą (23).

BANDYMO ATASKAITA

48. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

- Medžiagos fizikinė prigimtis ir svarbios fizikinės bei cheminės savybės (pvz., tirpumas vandenyje, garų slėgis).
- Bandomosios cheminės medžiagos cheminės atpažinties duomenys pagal IUPAC nomenklatūrą, CAS numeris, partijos ir siuntos numeriai, struktūrinė formulė ir grynumas.
- Iki kokios datos tinka naudoti ėminį.

Bandomosios rūšys

- Naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, šaltinis, iš kurio gauti organizmai, ir jų veisimo sąlygos.

Bandymo sąlygos

- Dirbtinio dirvožemio sudedamosios dalys ir paruošimas.
- Bandomosios cheminės medžiagos naudojimo bandymui metodas.
- Bandymo sąlygų aprašymas, įskaitant temperatūrą, drėgnį, pH ir t. t.
- Išsamus bandymo plano ir procedūrų aprašymas.

Bandymo rezultatai

- Suaugusių kirmėlių gaištamumas po dviejų savaitių ir jauniklių skaičius intervalo nustatymo bandymo pabaigoje.
- Suaugusių kirmėlių gaištamumas po trijų poveikio savaitių ir išsamus jauniklių aprašas nustatomojo bandymo pabaigoje.
- Bet kokie pastebėti fiziniai ar patologiniai simptomai ir bandomųjų organizmų elgesio pokyčiai.
- Poveikio reprodukcijai LC_{50} , NOEC ir (arba) EC_x (pvz., EC_{50} , EC_{10}), jeigu nustatytos kurios nors iš šių verčių, kartu su pasikliautinaisiais intervalais, ir grafikas su pritaikytu modeliu, naudotu joms apskaičiuoti, taip pat visa informacija bei pastabos, galinčios padėti aiškinti gautus rezultatus.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

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

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

EC_x (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Atliekant šį bandymą poveikio koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC₀ (nemirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį nežūsta jokie jos veikiami bandomieji organizmai. Atliekant šį bandymą LC₀ išreiškiamas kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC₅₀ (vidutinė mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 50 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC₅₀ išreiškiamas kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC₁₀₀ (visiškai mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 100 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC₁₀₀ išreiškiamas kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LOEC (mažiausia pastebėto poveikio koncentracija) – mažiausia statistškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) turinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Atliekant šį bandymą LOEC išreiškiamas kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase. Esant visoms bandomosios medžiagos koncentracijoms, kurios yra didesnės negu LOEC, paprastai turėtų būti patirtas statistškai reikšmingas poveikis, palyginti su kontroline grupe. Bet kokius nukrypimus nuo šios LOEC nustatymo tvarkos būtina pagrįsti bandymo ataskaitoje.

NOEC (nepastebėto poveikio koncentracija) – didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC ir kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadarą statistškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Reprodukcijos sparta yra per bandymo laikotarpį atsivestų jauniklių vidutinis skaičius, tenkantis tam tikram suaugusių kirmėlių skaičiui.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Didžiausio vandens įmirkio nustatymas**Dirbtinio dirvožemio didžiausio vandens įmirkio nustatymas**

Nustatyta, kad tinka taikyti šį metodą, kuris aprašytas ISO DIS 11268-2 standarto C priede.

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu ir, pripildę jį vandens, pastatykite ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras įsigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų palikti dirvožemio ėminių dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminių reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S – vandeniu sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T – tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D – sausosios substrato medžiagos masė

NUORODA

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

3 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio ėminio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu.

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma. Po purtymo suspensija paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

NUORODA

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

4 priedėlis

***Enchytraeus* sp. kultūrų auginimo sąlygos**

Enchytraeus albidus rūšies (ir kitų *Enchytraeus* rūšių) enchitrėjus galima auginti didelėse (pvz., 30 × 60 × 10 cm) plastiko dėžėse, pripildytose dirbtinio dirvožemio ir natūralaus neužteršto sodo dirvožemio santykiu 1:1. Kompostuojamų medžiagų dėti negalima, nes jose gali būti nuodingųjų cheminių medžiagų, kaip antai sunkiųjų metalų. Prieš naudojant dirvožemį reikėtų pašalinti jo gyvūniją (pvz., giliai užšaldant). Taip pat galima naudoti tik iš dirbtinio dirvožemio paruoštą substratą, tačiau reprodukcijos sparta jame gali būti mažesnė negu mišriame dirvožemio substrate. Kirmėlių kultūroms auginti naudojamo substrato pH turėtų būti $6,0 \pm 0,5$.

Auginama kultūra laikoma tamsoje, $15\text{--}20 \pm 2$ °C temperatūroje. Reikėtų stengtis, kad temperatūra būtų ne aukštesnė kaip 23 °C. Dirvožemis turi būti visą laiką drėgnas, bet ne šlapias. Dirvožemio drėgnis yra tinkamas, jeigu, nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio, tarp pirštų pasirodo smulkių vandens lašelių. Būtina saugotis, kad nesusidarytų bedeguonės sąlygos, užtikrinant, kad per kultūros auginimo indų dangčius vyktų pakankama dujų apykaita su atmosferos oru. Siekiant pagerinti dirvožemio aeraciją, reikėtų kiekvieną savaitę jį kruopščiai supurenti.

Kirmėlės galima šerti avižiniais dribsniais. Juos reikėtų laikyti sandariai uždengtuose induose ir prieš naudojant apdoroti autoklave arba pakaitinti, kad neįsiveistų miltų erkių (pvz., *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) ar plėšriųjų erkių [pvz., *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Terminiškai apdorotą pašarą reikėtų sumalti, kad jį būtų lengva paskleisti dirvožemio paviršiuje. Avižinių dribsnių pašarą kartais galima papildyti vitaminais, pienu ir žuvų taukais. Kiti tinkami pašarai yra kepimo mielės ir žuvų pašaras „Tetramin“.

Kirmėlės šeriamos maždaug du kartus per savaitę. Tinkamas avižinių dribsnių kiekis paberiamas ant dirvožemio paviršiaus arba atsargiai įmaišomas į substratą, kai dirvožemis purenamas aeracijai pagerinti. Tikslus dedamo pašaro kiekis priklauso nuo substrate esančių kirmėlių skaičiaus. Apskritai, jeigu visas pašaras suvartojamas per vieną parą po šėrimo, jo kiekį reikėtų padidinti, ir priešingai, jeigu per antrą šėrimą (po savaitės) dirvožemio paviršiuje tebėra pašaro, davinį reikėtų sumažinti. Grybeliais užkrėstą pašarą reikėtų išimti ir pakeisti šviežiu pašaru. Po trijų mėnesių kirmėlės reikėtų perkelti į šviežiai paruoštą substratą.

Auginimo sąlygos laikomos tinkamomis, jeigu kirmėlės: a) nebando išlįsti iš dirvožemio substrato, b) greitai šliaužia dirvožemiu, c) jų paviršius blizgus, be prikibusių dirvožemio dalelių, d) jos yra daugiau ar mažiau baltos spalvos, e) auginamose kultūrose yra įvairių amžiaus grupių kirmėlių ir f) jos nepaliaujamai dauginasi.

5 priedėlis

Bandymas naudojant kitų rūšių *Enchytraeus***Rūšių pasirinkimas**

Bandymui galima naudoti ne tik *E. albidus*, bet ir kitų rūšių *enchytrėjus*, tačiau tokiu atveju reikėtų atitinkamai pakeisti bandymo procedūrą ir tinkamumo kriterijus. Kadangi daugelio *Enchytraeus* rūšių kirmėlių lengva gauti ir jas galima tinkamai prižiūrėti laboratorijoje, svarbiausias kriterijus, pagal kurį pasirenkamos ne *E. albidus*, o kitos rūšies kirmėlės, yra jų ekologinė svarba ir santykinis jautris. Kitą rūšį bandymui galima rinktis ir dėl norminių priežasčių. Pavyzdžiui, tose valstybėse, kuriose *E. albidus* rūšies kirmėlės natūraliai neaptinkamos ir jų negalima importuoti (kaip antai dėl karantino apribojimų), reikės naudoti kitų *Enchytraeus* rūšių kirmėles.

Kitų tinkamų rūšių pavyzdžiai

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide ir Graefe, 1992). Pastaraisiais metais šios rūšies kirmėlės dažnai naudojamos per ekotoksikologinius tyrimus, nes jas paprasta veisti ir naudoti bandymams. Tačiau šios kirmėlės yra mažos, todėl su jomis sunkiau dirbti negu su *E. albidus* (ypač ankstesniuose etapuose, prieš taikant dažymo metodą). *E. crypticus* paplitimas gamtoje nėra patikimai nustatytas, nes ši rūšis aprašyta tik auginamose sliekų kultūrose. Todėl jos ekologiniai poreikiai nežinomi.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879) tikriausiai vadinama artimai giminingų rūšių, kurias pagal sandarą sunku vieną nuo kitos atskirti, grupė. Jos naudoti bandymams nerekomenduojama iki tol, kol bus galima patikimai identifikuoti bandymui naudojamų individų rūšį. *E. buchholzi* rūšies kirmėlės paprastai aptinkamos pievose ir žmogaus veiklos paliestose vietose, kaip antai pakelėse.
- *Enchytraeus luxuriosus*. Ši rūšis iš pradžių vadinta *E. minutus*, tačiau aprašyta neseniai (1). Ją pirmą kartą aptiko U. Graefe iš Hamburgo pievoje arti Sankt Peter-Ordingo (Šlėzvigo-Holšteino žemė, Vokietija). *E. luxuriosus* kirmėlės yra maždaug perpus mažesnės nei *E. albidus*, tačiau didesnės nei kitų čia aptariamų rūšių kirmėlės, todėl gali būti tinkamas *E. albidus* pakaitalas.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen ir Christensen, 1963). Ši rūšis iki šiol buvo žinoma kaip gyvenanti Vokietijos ir Ispanijos mineraliniuose dirvožemiuose, kur ji dažna, bet paprastai nelabai gausi. Palyginti su kitomis smulkiosios rūšies kirmėlėmis, ją identifikuoti gana lengva. Nieko nežinoma apie šios rūšies kirmėlių elgseną per laboratorinius bandymus ar jautrį cheminėms medžiagoms, tačiau nustatyta, kad jas auginti gana paprasta (E. Belotti, asmeninė korespondencija).

Veisimo sąlygos

Visų minėtų *Enchytraeus* rūšių kirmėles galima auginti tuose pačiuose substratuose, kaip ir *E. albidus*. Kadangi jos yra mažesnės, jas galima auginti mažesniuose induose ir nors galima naudoti tą patį parašą, davinio dydį reikia atitinkamai sumažinti. Šių rūšių kirmėlių gyvenimo ciklas yra trumpesnis negu *E. albidus* ir jas reikėtų dažniau šerti.

Bandymo sąlygos

Bandymo sąlygos apskritai yra tokios pačios, kaip ir per *E. albidus* bandymą, tačiau:

- galima, tačiau nebūtina, naudoti mažesnius bandymo indus;
- reprodukcijos bandymas gali būti (nebūtinai) trumpesnis, t. y. keturios vietos šešių savaitių, tačiau intervalo nustatymo bandymo trukmės keisti nereikėtų;
- kadangi jauniklės kirmėlės yra labai smulkios, patartina jas skaičiuoti taikant dažymo metodą;
- tinkamumo kriterijų, pagal kurį vertinamas „jauniklių skaičius kiekviename bandymo kontrolinės grupės inde“, reikėtų pakeisti į „50“.

NUORODA

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

6 priedėlis

Išsamus kirmėlių surinkimo metodų aprašymas

Dažymas bengališkuoju raudoniu

Ši limnologijos srityje iš pradžių sukurta metodą (1) taikyti enchitrėjų jaunikliams skaičiuoti per enchitrėjų reprodukcijos bandymą pirmiausia pasiūlė W. de Coen (Gento universitetas, Belgija). RIVM Bilthoven institutas atskirai sukūrė modifikuotą šio metodo versiją (pagal kurią bengališkasis raudonis vietoj etanolio maišomas su formaldehidu) (2), (3).

Baigus nustatomąjį bandymą (t. y. po šešių savačių) dirvožemis iš bandymo indų perkeliamas į negilią talpą. Šiam tikslui tinka „Bellaplast“ indas arba fotografijų ryškinimo vonelė gofruotu dugnu (tai svarbu, nes dugno paviršiaus „bangelės“ riboja kirmėlių judėjimą stebėjimo lauke). Jaunikliai užfiksuojami etanoliu (apie 5 ml vienam kartotiniam bandiniui), tada į indus įpilamas 1–2 cm gylio vandens sluoksnis. Įlašinami keli lašai (200–300 µl) bengališkojo raudonio (1 % etanolio tirpalo; vietoj jo galima naudoti 0,5 % eozino tirpalą) ir abu komponentai kruopščiai sumaišomi. Po 12 valandų kirmėlės turėtų būti nusidažiusios rausva spalva ir jas turėtų būti lengva suskaičiuoti, nes jos gulės substrato paviršiuje; arba, prieš skaičiuojant kirmėles, substrato ir alkoholio mišinį galima perplauti per sietą (kurio akučių dydis 0,250 mm). Per šią procedūrą išplaunamas kaolinitas, durpės ir dalis smėlio, taigi rausvai nudažytas kirmėles lengviau pastebėti ir suskaičiuoti. Skaičiuoti kirmėles taip pat lengviau naudojant apšviestus lęšius (lęšių dydis turėtų būti bent 100 × 75 mm, didinamoji galia 2–3 karto).

Taikant dažymo metodą, viename inde buvusios kirmėlės suskaičiuojamos per kelias minutes, taigi vienam asmeniui turėtų būti įmanoma įvertinti visų vieno bandymo indų turinį daugiausia per dvi dienas.

Surinkimas šlapiuoju būdu

Kirmėles rinkti šlapiuoju būdu reikėtų pradėti iškart, kai tik baigiamas bandymas. Dirvožemis iš kiekvieno bandymo indo sudedamas į maždaug 1 mm dydžio akučių plastikinius sietus, kurie pakabinami plastikiniuose dubenyse taip, kad neliestų dugno. Tada į dubenis atsargiai pripilama vandens tiek, kad dirvožemio ėminiai sietuose būtų visiškai apsemti. Siekiant užtikrinti, kad iš ėminių būtų surinkta daugiau kaip 90 % kirmėlių, jų rinkimo periodas turėtų trukti 3 dienas, palaikant 20 ± 2 °C temperatūrą. Šiam periodui pasibaigus, sietai išimami ir vanduo lėtai ir atsargiai nupilamas, truputį jo paliekant ir stengiantis nesudrumsti dubenų dugne esančių nuosėdų. Tada plastikiniai dubenys lengvai supurtomi, suspenduojant nuosėdas paviršinio vandens likutyje, kuris perpilamas į Petri lėkštelę. Tada, dirvožemio dalelėms vėl nusėdus į dugną, enchitrėjus galima pastebėti, išimti ir suskaičiuoti naudojant stereomikroskopą ir minkšto plieno chirurgines žnyples.

Flotacija

Flotacija (kirmėlių išplukdymu) pagrįstas metodas aprašytas R. Kuperman pastaboje (4). Bandymo indo turinį užfiksavus etanoliu, dirvožemis užpilamas „Ludox“ (AM-30 koloidinio silicio dioksido 30 masės proc. vandeninės suspensijos) preparatu, kad jo lygis siektų 10–15 mm virš dirvožemio paviršiaus. Tada dirvožemis 2–3 minutes kruopščiai maišomas su flotacine medžiaga, o po to galima lengvai suskaičiuoti paviršiuje plūduriuojančias jaunikles kirmėles.

NUORODOS

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

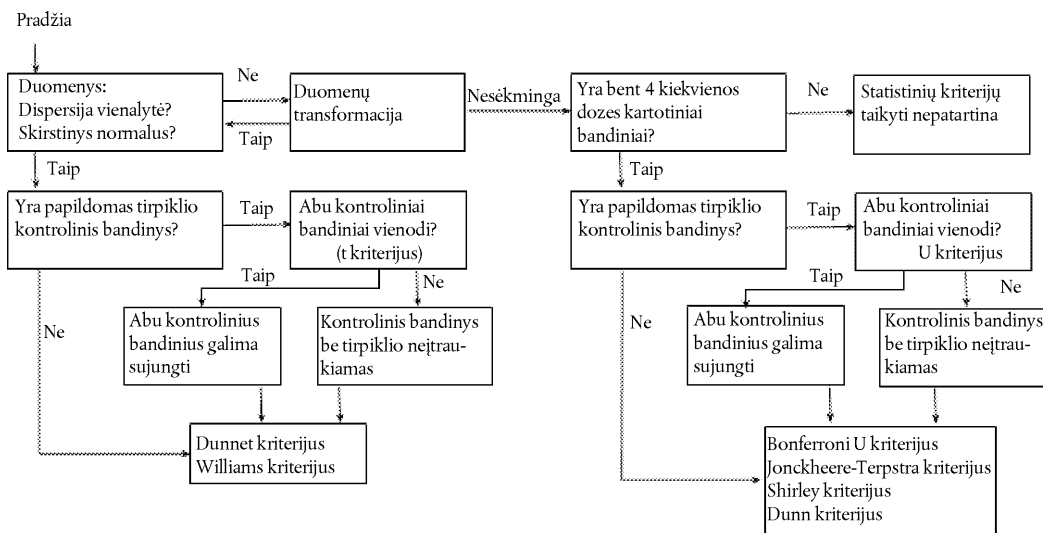
-
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
 - (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T.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

7 priedėlis

Statistinio duomenų vertinimo apžvalga (NOEC nustatymas)

Parametriniai kriterijai

Neparametriniai kriterijai



C.33. SLIEKŲ (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) REPRODUKCIJOS BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 222 (2004). Jis skirtas dirvožemyje esančių cheminių medžiagų poveikiui *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) arba *Eisenia andrei* (Andre, 1963) (1), (2) rūšių sliekų reprodukcijos našumui (ir kitoms nemirtinoms vertinamosioms baigtims) vertinti. Šis metodas patikrintas per tarplaboratorinį bandymą (3). Yra sukurtas bandymo metodas ūmiam toksiškumui sliekams tirti (4). Paskelbta ir daugiau kitų tarptautinių bei nacionalinių gairių, kaip atlikti ūmaus ir lėtinio toksiškumo sliekams bandymus (5), (6), (7), (8).
2. *Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei* laikomos vienomis iš tipinių dirvožemio faunos ir, konkrečiai, sliekų rūšių. Bendra informacija apie sliekų ekologiją ir naudojimą ekotoksikologiniams bandymams paskelbta literatūroje (7), (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

3. Suaugę sliekai patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų poveikį. Bandomoji medžiaga įmaišoma į dirvožemį arba, pesticidų atveju, įterpiama į dirvožemį arba ja apdorojamas dirvožemio paviršius pagal tinkamą tos cheminės medžiagos naudojimo procedūrą. Konkretus bandomosios medžiagos naudojimo būdas priklauso nuo bandymo tikslo. Bandymo koncentracijų intervalas pasirenkamas toks, kad apimtų koncentracijas, kurios, tikėtina, per aštuonių savaitių laikotarpį turėtų tiek nemirtiną, tiek mirtiną poveikį. Poveikis suaugusių sliekų gaištamumui ir augimui nustatomas po 4 bandomosios medžiagos poveikio savaitių. Tada suaugę sliekai išimami iš dirvožemio ir dar po 4 savaitių įvertinamas poveikis reprodukcijai suskaičiuojant dirvožemyje esančius palikuonis. Bandomosios cheminės medžiagos paveiktų sliekų reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės arba grupių sliekų reprodukcijos našumu nustatant: i) nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir (arba) ii) EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}), pagal regresijos modelį vertinant koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x %. EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}) vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktą koncentracijos verčių intervalą, kad EC_x būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu (sąvokų apibrėžtis žr. 1 priedėlyje).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Kad būtų galima tinkamai planuoti bandymo procedūras, reikėtų žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:
 - jos tirpumą vandenyje;
 - $\log K_{ow}$;
 - garų slėgį;
 - kai įmanoma, taip pat informaciją apie jos išliekamumą ir elgseną aplinkoje (pvz., fotolizės lygį ir hidrolizės lygį, kai tinka, priklausomai nuo bandomosios medžiagos naudojimo būdo).
5. Šis bandymo metodas tinka visoms cheminėms medžiagoms, nepriklausomai nuo jų tirpumo vandenyje. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, šiuo atveju apibrėžiamoms kaip cheminės medžiagos, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.
6. Pagal šį bandymo metodą neatsižvelgiama į galimą bandomosios cheminės medžiagos skilimą bandymo laikotarpiu, todėl negalima daryti prielaidos, kad pradinės jos poveikio koncentracijos vertės liks nepakitusios per visą bandymą. Tokiu atveju patartina atlikti bandomosios cheminės medžiagos cheminę analizę pradedant ir baigiant bandymą.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laboratorinės bandymo sąlygos yra tinkamos ir kad laikui bėgant statistiškai nesikeičia bandomųjų organizmų atsakas į poveikį, būtina nustatyti etaloninės cheminės medžiagos NOEC ir (arba) EC_x vertes. Etaloninės cheminės medžiagos bandymą patartina atlikti bent kartą per metus arba, jeigu rečiau, – tuo pačiu metu, kai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas. Tinkamos etaloninės cheminės medžiagos, kurių poveikis reprodukcijai įrodytas, yra karbendazimas arba benomilas (3). Reikšmingas poveikis turėtų būti pastebimas esant: a) 1 ir 5 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui arba b) 250–500 g/ha ar 25–50 mg/m². Jei per bandymų seriją naudojamas teigiamas toksiškumo etalonas, pasirenkama viena koncentracija, o kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse.

BANDYMO TINKAMUMAS

8. Bandymo rezultatas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos kriterijus:
- kiekviename kartotiniame bandinyje (kuriame yra 10 suaugusių individų) iki bandymo pabaigos atsivesta ≥ 30 jauniklių;
 - reprodukcijos variacijos koeficientas yra ≤ 30 %;
 - suaugusių sliekų gaištamumas per pirmas 4 bandymo savaites yra ≤ 10 %.

Jeigu bandymas neatitinka šių tinkamumo kriterijų, jį reikėtų nutraukti, nebent įmanoma pagrįstai įrodyti, kodėl verta jį tęsti. Šį pagrindimą reikėtų pateikti bandymo ataskaitoje.

BANDYMO APRAŠYMAS

Įranga

9. Turėtų būti naudojami iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos pagaminti maždaug 1–2 litrų talpos indai. Indų skerspjuvio plotas turėtų būti maždaug 200 cm², kad pridėjus 500–600 g sauso substrato masės, drėgno substrato sluoksnio gylis būtų apie 5–6 cm. Indų dangčiai turėtų būti tokie, kad per juos vyktų dujų apykaita tarp substrato ir atmosferos oro ir prasiskverbtų šviesa (pvz., naudojami perforuoti skaidrūs dangčiai), tačiau per juos negalėtų iššliaužti sliekai. Jeigu bandymui substrato į kiekvieną bandymo indą dedama kur kas daugiau negu 500–600 g, reikėtų proporcingai padidinti sliekų skaičių.
10. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:
- džiovavimo spinta;
 - stereomikroskopas;
 - pH matuoklis ir fotometras;
 - tinkamos tikslios svarstyklės;
 - tinkama temperatūros kontrolės įranga;
 - tinkama drėgmės kontrolės įranga (nebūtinai, jei bandomosios medžiagos poveikis tiriamas induose su dangčiais);
 - inkubatorius arba maža patalpa su oro kondicionieriumi;
 - pincetai, vąšeliai arba instrumentai su kilpelėmis gale;
 - vandens vonelė.

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

11. Šiam bandymui naudojamas dirbtinis dirvožemis (5), (7), kurio sudėtis yra tokia (nurodyta sausosios medžiagos, išdžiovintos iki pastovios masės 105 °C temperatūroje, mase):
- 10 % kiminių durpių (kurių pH turi būti kuo artimesnis 5,5–6,0, neturi būti pastebimų augalų liekanų, durpės turi būti smulkiai sumaltos ir išdžiovintos iki tam tikro išmatuoto drėgno lygio);
 - 20 % kaolino molio (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

- 0,3–1,0 % kalcio karbonato (analiziškai grynų CaCO_3 miltelių), kad pradinis pH lygis būtų $6,0 \pm 0,5$;
- 70 % ore išdžiovinto kvarcinio smėlio (priklausomai nuo reikiamo CaCO_3 kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio.

1 pastaba. Reikiamas CaCO_3 kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato sudedamųjų dalių, įskaitant pašarą, ir turėtų būti nustatytas prieš pat bandymą atliekant dalinių dirvožemio ėminių matavimus. pH matuojamas sumaišytame ėminyje, naudojant 1 M kalcio chlorido (KCl) tirpalą arba 0,01 M kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalą (13).

2 pastaba. Organinės anglies kiekį dirbtiniame dirvožemyje galima sumažinti, pvz., iki 4–5 % sumažinant durpių kiekį ir atitinkamai padidinant smėlio kiekį. Taip mažinant organinės anglies kiekį, galima sumažinti tikimybę, kad bandomoji cheminė medžiaga įsigers į dirvožemį (dėl jame esančios organinės anglies), ir padidinti bandomosios cheminės medžiagos pasiekiamumą sliekams. Įrodyta, kad *Eisenia fetida* gali atitikti reprodukcijai taikomus bandymo tinkamumo kriterijus, bandymui naudojant iš lauko paimtą dirvožemį su mažesniu organinės anglies kiekiu (pvz., 2,7 %) (14), taip pat iš patirties žinoma, kad tai įmanoma pasiekti ir naudojant dirbtinį dirvožemį su 5 % durpių. Todėl, prieš naudojant tokį dirvožemį nustatomajam bandymui, nebūtina įrodyti dirbtinio dirvožemio tinkamumo tam, kad bandymas atitiktų tinkamumo kriterijus, nebent durpių kiekis būtų sumažintas daugiau negu čia nurodyta.

3 pastaba. Naudojant natūralų dirvožemį papildomiems (pvz., aukštesnės pakopos) bandymams, taip pat reikėtų įrodyti tokio dirvožemio tinkamumą ir atitiktį bandymo tinkamumo kriterijams.

12. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., naudojant didelį laboratorinį maišytuvą) gerai vėdinamoje vietoje. Prieš pradedant bandymą sausas dirbtinis dirvožemis sudrėkinamas įpilant pakankamai dejonizuoto vandens, kad būtų gauta maždaug pusė galutinio vandens kiekio, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio (atitinkamai 50 ± 10 % drėgnis pagal sausą masę). Taip bus gautas substratas be stovinčio vandens, kurį suspaudus sausoje, iš jo neturėtų sunktis vanduo. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras, ISO 11274 (15) arba lygiavertį ES standartą.
13. Jeigu bandomąja chemine medžiaga padengiamas dirvožemio paviršius arba ji įmaišoma į dirvožemį nenaudojant vandens, galutinį reikiamą vandens kiekį galima įmaišyti ruošiant dirbtinį dirvožemį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į dirvožemį kartu su trupučiu vandens, reikiamą papildomą vandens kiekį galima supilti kartu su bandomąja chemine medžiaga (žr. 19 skirsnį).
14. Dirvožemio drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant bandymą pagal ISO 11465 (16) arba lygiavertį ES standartą, o dirvožemio pH – pagal 3 priedėlį arba ISO 10390 (13) ar lygiavertį ES standartą. Juos reikėtų nustatyti naudojant kontrolinio dirvožemio ėminį ir kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos dirvožemio ėminį. Dirvožemio pH neturėtų būti koreguojamas atliekant rūgštinių arba šarminių cheminių medžiagų bandymus. Dirvožemio drėgnį reikėtų stebėti per visą bandymą, reguliariai pasveriant indus (žr. 26 ir 30 skirsnius).

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

15. Bandymui naudojami *Eisenia fetida* arba *Eisenia andrei* rūšies sliekai (1), (2). Pradedant bandymą naudojami suaugę nuo dviejų mėnesių iki vieno metų amžiaus sliekai su kliteliu. Sliekus bandymui reikėtų atrinkti iš sinchronizuotos, gana vienodo amžiaus sliekų kultūros (4 priedėlis). Bandomosios grupės individų amžiaus skirtumas neturėtų būti didesnis nei 4 savaitės.
16. Atrinkti sliekai turėtų būti bent vieną dieną aklimatizuojami tokia pačia dirbtinio dirvožemio substrate, koks bus naudojamas bandymui. Šiuo laikotarpiu sliekai turėtų būti šeriami tokia pačia pašaru, koks bus naudojamas per bandymą (žr. 31–33 skirsnius).
17. Pradedant bandymą, turėtų būti sudarytos grupės iš dešimties atskirai pasvertų sliekų, kurios atsitiktine tvarka paskirstomos į bandymo indus. Prieš sveriant sliekai nuplaunami (dejonizuotu vandeniu) ir vandens perteklius pašalinamas trumpam padedant sliekus ant filtravimo popieriaus. Kiekvieno slieko bendra masė turėtų būti 250–600 mg.

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

18. Bandomąją cheminę medžiagą galima naudoti dešiomis: įmaišant į dirvožemį (žr. 19–21 skirsnius) arba padengiant ja dirvožemio paviršių (žr. 22–24 skirsnius). Tinkamo metodo pasirinkimas priklauso nuo bandymo tikslo. Paprastai patartina bandomąją cheminę medžiagą įmaišyti į dirvožemį, tačiau vietoj to gali reikėti ją naudoti taip, kaip įprasta pagal žemės ūkio praktiką (pvz., purkšti skystą preparatą arba naudoti specialius pesticidų preparatus, kaip antai granules ar sėklų beigus). Tirpiklius, kurie naudojami dirvožemio apdorojimui bandomąją chemine medžiaga palengvinti, reikėtų parinkti atsižvelgiant į nedidelį jų toksiškumą sliekams; bandymo plane turi būti numatyta tinkama tirpiklio kontrolė (žr. 27 skirsnį).

Bandomosios cheminės medžiagos įmaišymas į dirvožemį*Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga*

19. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalas dejonizuotame vandenyje ruošiamas prieš pat pradėdant bandymą – jo paruošiama tiek, kad pakaktų visiems vienos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Kad būtų lengviau ruošti bandomąjį tirpalą, gali reikėti naudoti pagalbinį tirpiklį. Naudinga paruošti tokį tirpalo kiekį, kad jo pakaktų galutiniam dirvožemio drėgniui (40–60 % didžiausio vandens įmirkio) pasiekti. Tirpalas kruopščiai sumaišomas su dirvožemio substratu prieš dedant jį į bandymo indą.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama mažame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., acetono) kiekyje ir užpurškiama and trupučio smulkaus kvarcinio smėlio arba su juo sumaišoma. Tirpiklis pašalinamas bent kelias minutes garinant po traukos gaubtu, tada apdorotas smėlis kruopščiai sumaišomas su iš anksto sudrėkintu dirbtiniu dirvožemiu, įpilama (reikiamas kiekis) dejonizuoto vandens, kad galutinis dirvožemio drėgnis siektų 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, ir sumaišoma. Taip apdorotas dirvožemis yra paruoštas dėti į bandymo indus. Reikėtų turėti omenyje, kad kai kurie tirpikliai gali būti nuodingi sliekams.

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose netirpi bandomoji cheminė medžiaga

21. Paruošiamas mišinys į 10 g smulkiai sumalto pramoninio kvarcinio smėlio įdedant tokį bandomosios cheminės medžiagos kiekį, koks būtinas bandymui reikalingai koncentracijai dirvožemyje pasiekti. Gautas mišinys kruopščiai sumaišomas su iš anksto sudrėkintu dirbtiniu dirvožemiu. Tada įpilama dejonizuoto vandens iki reikiamo kiekio, kad galutinis dirvožemio drėgnis būtų 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, ir sumaišoma. Taip paruoštas dirvožemis sudedamas į bandymo indus.

Dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga

22. Dirvožemis apdorojamas į jį sudėjus sliekus. Pirmiausia bandymo indai papildomi sudrėkinto dirvožemio substrato ir jo paviršiuje padedami pasverti sliekai. Sveiki sliekai paprastai iškart įsirausia į substratą, todėl tuos, kurie lieka paviršiuje ilgiau kaip 15 minučių, reikia laikyti pažeistais ir pakeisti kitais sliekais. Keičiant sliekus kitais, naujus ir keičiamus sliekus reikėtų pasverti, kad bandymo pradžioje būtų žinoma bendra gyvų bandomosios grupės sliekų masė ir bendra indo su sliekais masė.
23. Tada dedama bandomoji cheminė medžiaga. Įdėjus sliekus, reikėtų palaukti pusvalandį (arba iki tol, kol sliekų neliks dirvožemio paviršiuje) prieš apdorojant dirvožemį bandomąja medžiaga, kad būtų išvengta bet kokio tiesioginio jos sąlyčio su gyvūnų oda. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra pesticidas, gali reikėti ją užpurkšti ant dirvožemio paviršiaus. Bandomąją cheminę medžiagą reikėtų stengtis kuo tolygiau paskirstyti dirvožemio paviršiuje naudojant tinkamą laboratorinį purškimo prietaisą, imituojuose purškimą laukuose. Prieš naudojant bandomąją cheminę medžiagą, bandymo indo dangtį reikėtų nuimti ir pakeisti apsauginiu įdėklu, kad purškiamas skystis nepatektų ant indo sienelių. Šį įdėklą galima pasidaryti iš kito bandymo indo su išimtu dugnu. Dedant bandomąją cheminę medžiagą, temperatūra turėtų būti 20 ± 2 °C, o naudojant vandeninius tirpalus, emulsijas arba dispersijas, dedamo vandens norma turėtų būti 600–800 µl/m². Šią normą reikėtų patikrinti naudojant tinkamą kalibravimo įrangą. Specialius preparatus, kaip antai granules ar sėklų beigus, reikėtų tinkamai naudoti pagal žemės ūkio praktiką.

24. Bandymo indus reikėtų vieną valandą palikti atidengtus, kad išgaruotų visas kartu su bandomąja chemine medžiaga naudotas lakus tirpiklis, tačiau saugoti, kad per tą laiką iš bandymo indų neiššliaužtų sliekai.

PROCEDŪRA

Bandomosios ir kontrolinės grupės

25. Rekomenduojama į 500–600 g sausos dirbtinio dirvožemio masės dėti 10 sliekų (t. y. vienam sliekui tenka 50–60 g dirvožemio). Jeigu naudojami didesni dirvožemio kiekiai, kaip antai per specialiais būdais naudojamų pesticidų (pvz., sėklų beicų) bandymus, reikėtų palaikyti tokį santykį, pagal kurį vienam sliekui tektų 50–60 g dirvožemio, atitinkamai didinant sliekų skaičių. Į kiekvieną kontrolinės ir bandomosios grupių indą paruošiama dėti po 10 sliekų. Sliekai nuplaunami vandeniui, nusausinami ir trumpam padedami ant sugeriamojo popieriaus, siekiant pašalinti vandens perteklių.
26. Kad skirstant sliekus į bandymo indus nebūtų padaryta sisteminių klaidų, reikėtų nustatyti bandomosios populiacijos vientisumą, atskirai pasveriant 20 atsitiktine tvarka atrinktų sliekų iš tos populiacijos, iš kurios bus imami sliekai bandymui. Įsitikinus populiacijos vientisumu, atrinktos sliekų grupės pasveriamos ir atsitiktine tvarka paskirstomos į bandymo indus. Sudėjus bandymui atrinktus sliekus, kiekvieną bandymo indą reikėtų pasverti, siekiant užtikrinti, kad būtų žinoma pradinė masė, taigi būtų galima stebėti dirvožemio drėgnį per visą bandymą, kaip aprašyta 30 skirsnyje. Tada bandymo indai uždengiami, kaip aprašyta 9 skirsnyje, ir sudedami į bandymo kamerą.
27. Tinkami kontroliniai bandiniai paruošiami pagal kiekvieną iš 18–24 skirsniuose aprašytų bandomosios cheminės medžiagos naudojimo metodų. Ruošiant kontrolinius bandinius, taikomos tos pačios aprašytos procedūros, išskyrus tai, kad į juos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Todėl, kai tinka, į kontrolinius bandinius dedama organinių tirpiklių, kvarcinio smėlio ar kitų nešiklių tokiomis pačiomis koncentracijomis (kiekiais), kaip ir į bandomosios grupės indus. Kai bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant tirpiklį ar kitą nešiklį, siekiant įsitikinti, kad nešiklis neturės poveikio bandymo rezultatui, taip pat reikėtų paruošti ir išbandyti papildomą kontrolinį bandinį be nešiklio ir be bandomosios cheminės medžiagos.

Bandymo sąlygos

28. Bandymas atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir palaikomas bandymo indų apšvietimas 400–800 lx šviesa.
29. Bandymo indai bandymo metu neaeruojami, tačiau jų dangčiai turėtų būti tokios konstrukcijos, kad per juos vyktų dujų apykaita, bet būtų ribojamas drėgmės garavimas (žr. 9 skirsnį).
30. Per visą bandymą palaikomas reikiamas vandens kiekis dirvožemio substrate, bandymo indus reguliariai pasveriant (be dangčių). Sumažėjęs drėgnis, kai reikia, atkuriamas įpilant dejonizuoto vandens. Vandens kiekis induose nuo bandymo pradžios neturėtų pakisti daugiau kaip 10 %.

Šėrimas

31. Tinkamu laikomas bet koks kokybiškas pašaras, kuris, kaip įrodyta, tinka bent pastoviai sliekų masei palaikyti per bandymą. Iš patirties žinoma, kad tinkamas pašaras yra avižinės kruopos, karvių arba arklių mėšlas. Reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių medžiagų, kaip antai augimą skatinančių medžiagų, nematocidų arba panašių veterinarinių vaistų, galinčių pakenkti sliekams per bandymą. Karvių mėšlą patartina rinkti patiems, nes iš patirties žinoma, kad daržams tręšti parduodamas karvių mėšlas sliekams gali pakenkti. Mėšlas turėtų būti išdžiovintas ore, smulkiai sumaltas ir prieš naudojant pasterizuotas.
32. Kiekviena šviežiai paruošto pašaro porcija, prieš naudojant ją bandymui, reikėtų pašerti bandymui nenaudojamus sliekus, siekiant įsitikinti, kad pašaras yra tinkamos kokybės. Tuo pašaru pašertų sliekų augimas ir kokonių susidarymas neturėtų sulėtėti, palyginti su kitais sliekais, laikomais substrate, į kurį naujojo pašaro nedėta (tokiomis sąlygomis, kaip nurodyta pagal C.8 bandymo metodą (4)).

33. Pašaro pirmą kartą duodama praėjus vienai dienai po to, kai įleisti sliekai ir dirvožemis apdorotas bandomąja chemine medžiaga. Maždaug 5 g pašaro paskleidžiama dirvožemio paviršiuje kiekviename inde ir sudrėkinama dejonizuotu vandeniu (į kiekvieną indą įpilama po 5–6 ml). Vėliau per 4 savaitių bandymo laikotarpį pašaro duodama kartą per savaitę. Jei lieka nesuvalytas pašaras, davinį reikėtų sumažinti, kad neišsivystytų grybelių arba pelėsių. Suaugę sliekai iš dirvožemio išimami 28 bandymo dieną, tada į kiekvieną bandymo indą įdedama dar po 5 g pašaro. Likusias 4 bandymo savaites sliekai papildomai nešeriami.

Tinkamų bandomosios medžiagos koncentracijų pasirinkimas

34. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą (pvz., atlikus ūmaus toksiškumo bandymą (4) ir (arba) intervalo nustatymo tyrimus), turėtų būti lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios medžiagos koncentracijas – 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg vienam sauso dirvožemio masės kilogramui. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje pakanka paruošti po vieną kartotinį bandinį. Intervalo nustatymo bandymas trunka dvi savaites, o gaištamumas įvertinamas baigus bandymą.

Bandymo planas

35. Kadangi per šį bandymą neįmanoma taikyti vienos bendros statistikos sistemos, pagal šį bandymo metodą galima nustatyti NOEC ir EC_x . Reguliavimo institucijos netolimoje ateityje tikriausiai pradės reikalauti nustatyti NOEC, o EC_x vertės netrukus gali būti pradėtos plačiau naudoti dėl statistinių ir ekologinių priežasčių. Todėl, remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus tarplaboratorinį bandymą pagal enchitrėjų reprodukcijos bandymo metodą, siūlomi trys bandymo planai (17).
36. Nustatant koncentracijų intervalą būtina turėti omenyje šiuos dalykus:
- nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias arba dvyliką koncentracijų verčių, išdėstytų geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2,0;
 - nustatant EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}), rekomenduojama parinkti tinkamą koncentracijų skaičių, kad būtų gauti mažiausiai keturi statistiškai pakankamai skirtingi vidutiniai atsakai į tų koncentracijų poveikį. Rekomenduojama paruošti bent po du kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir šešis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;
 - NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal bendrą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8.

Bandymo trukmė ir matavimai

37. 28 bandymo dieną gyvi suaugę sliekai apžiūrimi ir suskaičiuojami. Taip pat aprašomi bet kokie neįprasti elgsenos pokyčiai (pvz., sliekai neįstengia išsirausti į dirvožemį arba guli nejudėdami) ir morfologiniai pokyčiai (pvz., atviros žaizdos). Tada visi suaugę sliekai išimami iš bandymo indų, suskaičiuojami ir pasveriami. Gali būti lengviau surasti suaugusius sliekus, jeigu prieš vertinimą dirvožemis su sliekais perpilamas į švarų padėklą. Iš dirvožemio išimtus sliekus prieš sveriant reikėtų nuplauti (dejonizuotu vandeniu), tada pašalinti vandens perteklių, trumpam padedant sliekus ant filtravimo popieriaus. Visi tuo metu nerasti sliekai užrašomi kaip negyvi, nes reikia manyti, kad jie iki vertinimo nugaišo ir suiro.
38. Jeigu dirvožemis buvo išimtas iš indų, jis sudedamas atgal (be suaugusių sliekų, bet su visais jame esančiais kokonais), tada dar keturias savaites inkubuojamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, tačiau pašaro duodama tik vieną kartą šio bandymo etapo pradžioje (žr. 33 skirsnį).

39. Antrajam 4 savaičių laikotarpiui pasibaigus, pagal 5 priedėlyje aprašytas procedūras nustatomas iš bandymui naudotame dirvožemyje buvusių kokonų išsiritusių jauniklių skaičius ir kokonų skaičius. Taip pat turėtų būti aprašyti bet kokios per visą bandymo laikotarpį sliekams padarytos žalos ar pažeidimo požymiai.

Ribų nustatymo bandymas

40. Jeigu jokio bandomosios medžiagos poveikio nenustatoma esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg) per intervalo nustatymo bandymą, reprodukcijos bandymą reikėtų atlikti kaip ribų nustatymo bandymą, pasirinkus 1 000 mg/kg koncentraciją. Per ribų nustatymo bandymą bus galima įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC viršija ribinę koncentraciją, ir kartu bandymui panaudoti minimalų sliekų kiekį. Reikėtų paruošti po aštuonis tiek bandomąją medžiagą apdoroto dirvožemio, tiek kontrolinius kartotinius bandinius.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

41. Neskaitant 6 priedėlyje pateiktos apžvalgos, pagal šį bandymo metodą konkrečiai nenurodoma, kaip reikėtų atlikti statistinę bandymo rezultatų analizę.
42. Viena vertinamoji baigtis yra gaištamumas. Tačiau taip pat reikėtų aprašyti suaugusių sliekų elgsenos pokyčius (pvz., sliekai neįstengia išsirausti į dirvožemį arba nejudėdami guli prisišlieję prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., atviras žaizdas) ir ar yra jauniklių. Nustatant LC_{50} paprastai reikėtų atlikti probito analizę (18) arba logistinę regresinę analizę. Tačiau tais atvejais, kai šis analizės metodas netinka (pvz., jeigu yra mažiau nei trys koncentracijos, kurioms esant dalis gyvūnų žūsta), galima taikyti alternatyvius metodus; tai gali būti slankiųjų vidurkių metodas (19), sutrumpintas Spearman-Kärber metodas (20) arba paprastoji interpoliacija (pvz., LC_0 ir LC_{100} geometrinis vidurkis apskaičiuojamas LC_0 kvadratinę šaknį dauginant iš LC_{100}).
43. Kita vertinamoji baigtis yra vislumas (t. y. atvestų jauniklių skaičius), tačiau šio bandymo, kaip ir intervalo nustatymo bandymo, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio sliekams požymius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės reprodukcijos aritmetinį vidurkį $\bar{x}$ ir standartinį nuokrypį.
44. Atlikus dispersinę analizę, standartinį nuokrypį s ir laisvės laipsnius df galima pakeisti suminiu dispersijos įverčiu, gautu taikant ANOVA metodą ir, atitinkamai, jo laisvės laipsnius, jeigu dispersija nepriklauso nuo koncentracijos. Tokiu atveju naudokite bendras kontrolinių ir bandomųjų grupių dispersijos vertes. Šios vertės paprastai apskaičiuojamos naudojant komercinę statistikos programinę įrangą, kiekvieno indo rezultatus naudojant kaip kartotinio bandinio rezultatus. Jeigu atrodo, kad galima pagrįstai sujungti neigiamų ir tirpiklio kontrolinių bandinių duomenis, užuot testams naudojus tik kuriuos nors iš jų, reikėtų testais nustatyti, kad tarp jų nėra reikšmingo skirtumo (dėl tinkamo testo žr. 47 skirsnį ir 6 priedėlį).
45. Tolesni statistiniai testai ir išvados priklauso nuo to, ar kartotinių bandinių vertės sudaro normalųjų skirstinių ir ar jų dispersija yra vienalytė.

NOEC vertinimas

46. Turėtų būti taikomi patikimi statistiniai kriterijai. Reikėtų naudoti, pvz., iš ankstesnės tarplaboratorinių bandymų patirties arba kitų ankstesnių duomenų gautą informaciją apie tai, ar duomenys maždaug sudaro normalųjų skirstinių. Labiau lemiamą reikšmę turi dispersijos vienalytiškumas (homoskedastija). Iš patirties žinoma, kad dispersija dažnai didėja, didėjant vidurkiui. Šiais atvejais duomenų transformavimas gali lemti homoskedastiją. Tačiau toks transformavimas turėtų būti pagrįstas ankstesnių duomenų tvarkymo patirtimi, o ne tiriamais duomenimis. Turint vienalyčius duomenis, reikėtų taikyti kelis t kriterijus, kaip antai Williams kriterijų ($\alpha = 0,05$, vienpusis) (21), (22) arba, kai kuriais atvejais, Dunnett kriterijų (23), (24). Pažymėtina, kad netolygios replikacijos atveju lentelėje nurodytas t vertes būtina pataisyti, kaip tai siūlo Dunnett ir Williams. Kartais dėl didelės variacijos atsakai didėja arba mažėja netolygiai. Šiuo atveju, jeigu labai nukrypta nuo monotoniškumo, labiau tinka taikyti Dunnett kriterijų. Jeigu nukrypstama nuo homoskedastijos, gali būti pagrįsta atidžiau ištirti galimą poveikį dispersijoms siekiant nuspręsti, ar taikant t kriterijus per daug nesumažėtų patikimumas (25). Kitu atveju galima taikyti daugybinį U kriterijų, pvz., Bonferroni U kriterijų

pagal Holm (26), arba, kai šiems duomenims būdinga heteroskedastija, tačiau kitais atžvilgiais jie atitinka monotonišką dozės ir atsako santykį, – bet kokią kitą neparametrinį kriterijų (pvz., Jonckheere-Terpstra (27), (28) arba Shirley (29), (30)), ir apskritai jam teiktina pirmenybė prieš nelygios dispersijos t kriterijus (taip pat žr. 6 priedėlyje pateiktą schemą).

47. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, galima taikyti porinį Student t kriterijų arba, kitu atveju, U kriterijaus procedūrą pagal Mann ir Whitney (31).

EC_x vertinimas

48. Apskaičiuojant bet kokią EC_x vertę, kiekvienos bandomosios grupės vidurkiai naudojami atliekant (tiesinės arba netiesinės) regresijos analizę po to, kai gaunama tinkama dozės ir atsako santykio funkcija. Siekiant gauti slienkų augimą kaip nenutrūkstamą atsaką, EC_x vertes galima nustatyti atliekant tinkamą regresinę analizę (32). Tarp dvireikšmiams kintamiesiems (gaištamumas arba išgyvenimas) ir atsivestų jauniklių skaičius tinkamų funkcijų yra įprastos sigmoidinės, logistinės arba Weibull funkcijos su dviem ar keturiais parametrais, iš kurių kai kurie taip pat gali sudaryti hormetinius atsakus. Jeigu dozės ir atsako funkcija buvo pritaikyta atlikus tiesinės regresijos analizę, prieš vertinant EC_x, kartu su regresine analize turėtų būti nustatytas reikšmingas r^2 (determinacijos koeficiento) dydis ir (arba) nuolydis, įrašant x % atitinkančią kontrolinės grupės vidurkio vertę į lygtį, sudarytą atlikus regresinę analizę. 95 % pasiklivimo ribos apskaičiuojamos pagal Fieller (cituojama Finney (18)) arba kitais tinkamais šiuolaikiniais metodais.
49. Kitu atveju atsakas modeliuojamas kaip pavyzdinio parametro procentinis dydis arba proporcija, aiškinama kaip vidutinis kontrolinės grupės atsakas. Šiais atvejais įprastą (logistinę, Weibull) sigmoidinę kreivę dažnai galima lengvai pritaikyti rezultatams pagal probito regresijos procedūrą (18). Tokiais atvejais svarinė funkcija turi būti pritaikyta metriniam atsakams, kaip nurodo Christensen (33). Tačiau pastebėjus hormezę, probito analizę reikėtų pakeisti keturių parametru logistine arba Weibull funkcija, pritaikyta pagal netiesinės regresijos procedūrą (34). Jeigu duomenims neįmanoma pritaikyti tinkamos dozės ir atsako funkcijos, galima rinktis alternatyvius EC_x ir jos pasiklivimo ribų vertinimo metodus, kaip antai slankiųjų vidurkių metodą pagal Thompson (19) ir sutrumpintą Spearman-Kärber procedūrą (20).

BANDYMO ATASKAITA

50. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- Tikslus bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas, jos partija, siunta, CAS numeris, grynumas.
- Bandomosios cheminės medžiagos savybės (pvz., log K_{ow} , tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsnio konstanta (H) ir informacija apie jos išliekamumą bei elgseną aplinkoje).

Bandomieji organizmai

- Naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, šaltinis, iš kurio gauti organizmai, ir jų veisimo sąlygos.
- Bandomųjų organizmų amžius, jų dydžio (masės) intervalas.

Bandymo sąlygos

- Informacija apie bandymui naudojamą dirvožemio paruošimą.
- Didžiausias dirvožemio vandens įmirkis.
- Dirvožemio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga metodo aprašymas.
- Informacija apie kartu su bandomąja chemine medžiaga naudojamąsias pagalbines chemines medžiagas.
- Kai tinka, naudojamos purškimo įrangos kalibravimo duomenys.
- Bandymo plano ir eigos aprašymas.
- Bandymo indų dydis ir bandymui naudojamą dirvožemio tūris.
- Bandymo sąlygos: šviesos stipris, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra.

- Šėrimo tvarkos aprašymas, bandymui naudojamo pašaro rūšis ir kiekis, šėrimo dienos.
- Dirvožemio pH ir jame esančio vandens kiekis bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Bandymo rezultatai

- Suaugusių sliekų gaištamumas (%), nustatytas kiekviename bandymo inde po pirmųjų 4 bandymo savaitių.
- Pradedant bandymą kiekviename bandymo inde buvusių suaugusių sliekų bendra masė.
- Gyvų suaugusių sliekų kūno masės pokytis (pradinės masės proc.), nustatytas kiekviename bandymo inde po pirmųjų keturių bandymo savaitių.
- Kiekviename bandymo inde atsivestų jauniklių skaičius bandymo pabaigoje.
- Pastebimų ar patologinių simptomų arba reikšmingų elgsenos pokyčių apibūdinimas.
- Bandymui naudojant etaloninę cheminę medžiagą gauti rezultatai.
- Poveikio reprodukcijai LC_{50} , NOEC ir (arba) EC_x (pvz., EC_{50} , EC_{10}), jeigu nustatytos kurios nors iš šių verčių, kartu su pasikliautinaisiais intervalais, ir grafikas su pritaikytu modeliu, naudotu joms apskaičiuoti, taip pat visa informacija bei pastabos, galinčios padėti aiškinti gautus rezultatus.
- Dozės ir atsako santykio grafikas.
- Kiekvieno bandymo indo rezultatai.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

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

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

EC_x (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos. Atliekant šį bandymą poveikio koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC₀ (nemirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį nežūsta jokie jos veikiami bandomieji organizmai. Atliekant šį bandymą LC₀ išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC₅₀ (vidutinė mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 50 % jos veikiamų organizmų. Atliekant šį bandymą LC₅₀ išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase arba kaip bandomosios cheminės medžiagos masė, tenkanti vienetiniam dirvožemio plotui.

LC₁₀₀ (visiškai mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 100 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC₁₀₀ išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LOEC (mažiausia pastebėto poveikio koncentracija) – mažiausia statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) turinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Atliekant šį bandymą LOEC išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase arba kaip bandomosios cheminės medžiagos masė, tenkanti vienetiniam dirvožemio plotui. Esant visoms bandomosios medžiagos koncentracijoms, kurios yra didesnės negu LOEC, paprastai turėtų būti patirtas statistiškai reikšmingas poveikis, palyginti su kontroline grupe. Bet kokius nukrypimus nuo šios tvarkos būtina pagrįsti bandymo ataskaitoje.

NOEC (nepastebėto poveikio koncentracija) – didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC ir kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadarо statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Reprodukcijos sparta – per bandymo laikotarpį atsivestų jauniklių vidutinis skaičius, tenkantis tam tikram suaugusių sliekų skaičiui.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Didžiausio dirvožemio vandens įmirkio nustatymas

Nustatyta, kad didžiausiam dirvožemio vandens įmirkiui įvertinti tinka šis metodas, apibūdintas standarto ISO DIS 11268-2 C priede (1).

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami ėminiams imti tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu ir, pripildę jį vandens, pastatykite ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras išigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų palikti dirvožemio ėminį dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminį reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S = vandeniui sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T = tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D = sauso substrato masė

NUORODA

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

3 priedėlis

Dirvožemio pH nustatymas

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO DIS 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu (1).

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma, po to paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

NUORODA

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

4 priedėlis

***Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei* rūšių sliekų kultūrų auginimas**

Šių rūšių sliekus geriausia veisti reguliuojamo klimato kameroje palaikant 20 ± 2 °C temperatūrą. Esant šiai temperatūrai, gaudami pakankamai pašaro, sliekai subręsta per maždaug 2–3 mėnesius.

Abiejų rūšių sliekus galima auginti įvairių rūšių gyvūninėse atliekose. Rekomenduojama naudoti iš arklių ar galvijų mėšlo ir durpių (santykiu 50:50) paruoštą auginimo terpę. Reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių medžiagų, kaip antai augimą skatinančių medžiagų, nematocidų arba panašių veterinarinių vaistų, galinčių pakenkti sliekams per bandymą. Mėšlą patartina rinkti patiems iš ekologinių ūkių, nes iš patirties žinoma, kad daržams tręšti parduodamas mėšlas sliekams gali pakenkti. Terpės pH vertė turėtų būti maždaug 6–7 (tikslinama naudojant kalcio karbonatą), joninis laidis turėtų būti mažas (mažesnė negu 6 mS/cm arba 0,5 % druskų koncentracija) ir ji neturėtų būti per daug užteršta amoniaku ar gyvūnų šlapimu. Substratas turėtų būti drėgnas, bet ne per šlapias. Sliekams veisti tinka naudoti 10–50 litrų talpos dėžės.

Siekiant gauti vienodo standartinio amžiaus ir dydžio (masės) sliekus, geriausia išsiauginti jų kultūrą iš kokonų. Įveista kultūra toliau prižiūrima 14–28 paroms įleidžiant suaugusius sliekus į veisimui skirtą dėžę su šviežiu substratu, kad susidarytų dar daugiau kokonų. Tada suaugę individai išimami, o iš kokonų išsiritę jaunikliai naudojami naujai kultūrai veisti. Sliekai nepaliaujamai šeriami gyvūninėmis atliekomis ir kartkartėmis perkeliama į šviežią substratą. Iš patirties žinoma, kad tinkamas pašaras yra ore išdžiovintas smulkiai sumaltas karvių ar arklių mėšlas arba avižinės kruopos. Reikėtų įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių, kaip antai augimą skatinančių, medžiagų, galinčių pakenkti ilgą laiką auginamoms sliekų kultūroms. Iš kokonų išsiritę sliekai naudojami bandymams, kai jie yra 2–12 mėnesių amžiaus ir laikomi suaugusiais individais.

Sliekus galima laikyti sveikais, jeigu jie rausiasi substrate, nemėgina iš jo iššliaužti ir nepaliaujamai dauginasi. Jeigu sliekai juda labai lėtai ir jų užpakalinis galas pageltęs, tai reiškia, kad substratas yra išeikvotas. Šiuo atveju rekomenduojama įdėti šviežio substrato ir (arba) sumažinti sliekų tankį substrate.

5 priedėlis

Iš kokonų išsiritusių jauniklių sliekų skaičiavimo metodai

Iš dirvožemio substrato išimtų sliekų rūšiavimas rankiniu būdu labai ilgai trunka, todėl vietoj to siūloma taikyti du alternatyvius metodus.

- a) Bandymo indai įdedami į vandens vonelę, kurioje vandens temperatūra iš pradžių yra 40 °C, tačiau palaipsniui didinama iki 60 °C. Po maždaug 20 minučių jaunikliai sliekai turėtų pasirodyti dirvožemio paviršiuje ir tada juos lengva išimti ir suskaičiuoti.
- b) Bandymui naudotą dirvožemį galima perplauti per sietą pagal K. van Gestel ir kt. sukurtą metodą (1), jeigu į dirvožemį dėtos durpės ir mėšlas arba avižinės kruopos buvo smulkiai sumalti. Du 0,5 mm dydžio akučių (30 cm skersmens) sietai padedami vienas ant kito, tada bandymo indo turinys perplaunamas per sietus stipria srove leidžiant vandenį iš čiaupo. Taip dauguma jaunų sliekų ir kokonų lieka viršutiniame sietu. Įsidėmėtina, kad visas viršutinio sieto paviršius per šią procedūrą turėtų būti šlapias, kad jaunikliai sliekai plūduriuotų susidariusios vandens plėvelės paviršiuje ir negalėtų iššliaužti per sieto akutes. Geriausi rezultatai gaunami leidžiant vandenį per dušo antgalį.

Per sietą perplovus visą dirvožemio substratą, sliekų jauniklius ir kokonus nuo viršutinio sieto galima nuplauti į dubenį. Tada dubens turinys paliekamas nusistovėti, kad tušti kokonai išplauktų į vandens paviršių, o pilni kokonai ir jauni sliekai nugrimztų į dugną. Po to stovintį vandenį galima nupilti, o jaunus sliekus ir kokonus perkelti į Petri lėkštelę, kurioje įpilta truputį vandens. Iš jos sliekus galima išimti naudojant adatą arba pincetą ir suskaičiuoti.

Iš patirties žinoma, kad *a* metodas yra tinkamesnis rinkti jaunikliams sliekams, kurie gali būti išplauti net per 0,5 mm dydžio akučių sietą.

Visada reikėtų nustatyti pasirinkto metodo, pagal kurį sliekai (ir, kai tinka, sliekų kokonai) išrenkami iš dirvožemio substrato, efektyvumą. Jeigu sliekų jaunikliai renkami ir rūšiuojami rankomis, patartina taip po du kartus apdoroti visus bandinius.

NUORODA

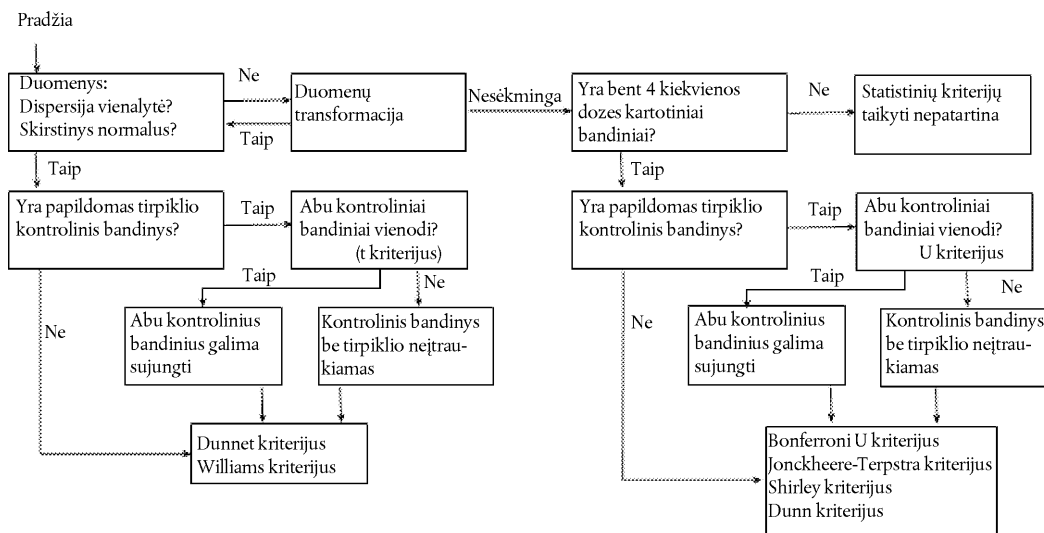
- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

6 priedėlis

Statistinio duomenų vertinimo apžvalga (NOEC nustatymas)

Parametriniai kriterijai

Neparametriniai kriterijai



C.34. ANAEROBINIŲ BAKTERIJŲ AKTYVUMO SLOPINIMO NUSTATYMAS. ANAEROBIŠKAI (NUOTEKAS) SKAIDANČIO DUMBLŲ DUJŲ IŠSKYRIMO SUMAŽĖJIMAS**ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 224 (2007). Į vandens aplinką išleidžiamos cheminės medžiagos prasiskverbia per aerobinę ir anaerobinę zonas, kuriose jos gali būti suskaidytos ir (arba) gali slopinti bakterijų aktyvumą; kai kada jos gali likti nejudinamos anaerobinėse zonose ištisus dešimtmečius ir ilgiau. Pirmojo etapo valymas – pirminis nusodinimas – nuotekų valymo įrenginyje yra aerobinis procesas, vykstantis paviršiniame skystyje, ir anaerobinis procesas dumblo nuosėdose. Antrajame etape nuotekos apdorojamos aerobinėje zonoje, kuri yra aktyviojo dumblo aeracijos rezervuare, ir anaerobinėje zonoje – dumblo nuosėdose antrinio nusodinimo rezervuare. Per abu šiuos etapus gautas dumblas paprastai anaerobiškai apdorojamas ir išskiria metaną bei anglies dioksidą, kurie įprastai naudojami elektros energijos gamybai. Išleistos į aplinką cheminės medžiagos, patekusios į įlankų, estuarijų ar jūrų dugno nuosėdas, gali neribotą laiką likti tose anaerobinėse zonose, jeigu nėra biologiškai skaidžios. Tikėtina, kad į tas zonas patenka didesni kai kurių cheminių medžiagų kiekiai dėl jų fizikinių savybių, kaip antai mažo tirpumo vandenyje, didelės įgerties (adsorbcijos) ir suspenduotų kietųjų medžiagų ir aerobinio biologinio neskaidumo.
2. Pageidautina, kad į aplinką išleidžiamos cheminės medžiagos būtų biologiškai skaidžios tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis, tačiau itin svarbu, kad tokios medžiagos neslopintų mikroorganizmų aktyvumo nė vienoje iš šių zonų. Žinomi keli atvejai Jungtinėje Karalystėje, kai metano išskyrimą visiškai nuslopino, pavyzdžiui, pramoninėse nuotekose buvęs pentachlorfenolis, todėl teko organizuoti labai brangiai kainavusį nuslopinto dumblo gabenimą iš metantankų į „saugias“ vietas ir „sveiko“ nuotekas skaidančio dumblo atvežimą iš greitųjų įrenginių. Tačiau būta ir daug kitų atvejų, kai nuotekų skaidymo procesus kiek mažiau sutrikdė kelios kitos cheminės medžiagos, tarp jų alifatiniai angliavandeniliai (naudojami sausajam valymui) ir plovikliai, dėl kurių labai sumažėjo nuotekų skaidymo metantankų efektyvumas.
3. Bakterijų aktyvumo (aktyviojo dumblo kvėpavimo) slopinimas tiriamas pagal vienintelį bandymo metodą C.11 (1), pagal kurį vertinamas bandomųjų cheminių medžiagų poveikis deguonies sugerties spartai substrate. Šis metodas plačiai taikomas siekiant iš anksto perspėti apie galimą kenksmingą cheminių medžiagų poveikį aerobiniam nuotekų valymui, taip pat nustatyti neslopinančias bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijas, tinkamas įvairiems biologinio skaidumo bandymams. Pagal C.43 bandymo metodą (2) galima iš dalies nustatyti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobinio dumblo dujų išskyrimui, jo kietąsias medžiagas atskiedžiant iki 1/10 įprastos koncentracijos, kad būtų pasiektas reikiamas procentinio biologinio skaidumo vertinimo tikslumas. Kadangi atskiestas dumblas gali jautriau reaguoti į slopinančias chemines medžiagas, ISO grupė nusprendė parengti metodą, pagal kurį būtų naudojamas neskiestas dumblas. Buvo išnagrinėti mažiausiai trys mokslo darbai (iš Danijos, Vokietijos ir Jungtinės Karalystės) ir galiausiai parengti du ISO standartai – pagal vieną iš jų, ISO 13 641-1 (3), naudojamas neskiestas dumblas, o pagal kitą – ISO 13 641-2 (4) – iki 1/100 atskiestas dumblas; toks santykis atitinka dumblą ir dugnines nuosėdas su nedidelėmis bakterijų populiacijomis. Pagal abu metodus buvo atliktas tarplaboratorinis bandymas (5); pirmasis iš šių standartų buvo patvirtintas kaip tinkamas, tačiau dėl antrojo nesutarta. Jungtinės Karalystės manymu, kadangi nemažai bandymo dalyvių pranešė, jog dujų susidarė labai nedaug arba jų visai nebuvo, nes procentinė dujoms skirta erdvės dalis buvo per didelė (75 %) optimaliam jautriui, šį metodą reikia tirti papildomai.
4. Ankstesniuose Jungtinės Karalystės mokslo darbuose (6), (7) aprašytas manometrinis metodas, pagal kurį naudotas neskiestas nuotekas skaidantis dumblas ir žalių nuotekų dumblas kaip substratas 500 ml tūrio kolbose; tokio bandymo aparatūra buvo nepatogi naudoti, o žalio dumblo dvokas nepakenčiamas. Vėliau Wilson ir kt. (10) sėkmingai pritaikė bandymams kompaktiškesnį ir patogesnį Shelton ir Tiedje aparatą (8), patobulintą Battersby ir Wilson (9). Kawahara ir kt. (11) laboratorijoje sėkmingai paruošė labiau standartizuotus dumblo ėminių, skirtus naudoti įvairių cheminių medžiagų anaerobinio biologinio skaidumo ir slopinamojo poveikio bandymams. Taip pat žalio dumblo substratas bandymams pakeistas iki 1/100 atskiestu anaerobiniu dumblo arba mažo bakterijų aktyvumo dumblo, dugninėmis nuosėdomis ir kt.
5. Pagal šį metodą galima gauti informacijos, naudingos prognozuojant tikėtiną bandomosios cheminės medžiagos poveikį dujų susidarymui anaerobiniuose metantankuose. Tačiau tik atliekant ilgesnius bandymus, per kuriuos tiksliau modeliuojamas metantankų veikimas, galima nustatyti, ar mikroorganizmai geba prisitaikyti prie bandomosios cheminės medžiagos ir ar į dumblą arba dumblo paviršių linkusios įsigerti cheminės medžiagos gali jame susikaupti iki toksiškos koncentracijos per ilgesnį laiką, negu trunka šis bandymas.

BANDYMO PRINCIPAS

6. Anaerobiškai nuotekas skaidančio dumblo (iš viso 20–40 g/l kietųjų medžiagų) ir skaidaus substrato tirpalo mišinio alikvotinės dalys sandariai uždarytuose induose iki 3 dienų inkubuojamos atskirai ir kartu su įvairių koncentracijų bandomąja chemine medžiaga. Išsiskyrusių (metano ir anglies dioksido) dujų kiekis matuojamas pagal slėgio padidėjimą (išreikštą paskaliais, Pa) buteliuose. Įvairių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų sukeltas dujų išskyrimo slopinimas procentais apskaičiuojamas pagal atitinkamuose bandymo ir kontrolinės grupės buteliuose susidariusių dujų kiekius. EC_{50} ir kitos efektyviosios koncentracijos apskaičiuojamos pagal grafikus, kuriuose procentinis slopinimo lygis parodomas kaip bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos, arba, įprasciau, jos logaritmo funkcija.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Bandomosios cheminės medžiagos paprastai turėtų būti naudojamos pačiu gryniausiu pavidalu, koku įmanoma jas gauti, nes kai kuriose cheminėse medžiagose esančios priemaišos, kaip antai chlorfenoliai, gali būti kur kas toksiškesnės nei pati bandomoji cheminė medžiaga. Tačiau reikėtų apsvarstyti, ar tinka bandyti chemines medžiagas tokiu pavidalu, koku jos gaminamos ir (arba) parduodamos rinkoje. Naudoti apibrėžtos sutarties produktų paprastai nepatartina, tačiau kai bandomos mažai tirpios cheminės medžiagos, gali būti tinkama naudoti jų preparatus. Reikėtų žinoti šias bandomosios cheminės medžiagos savybes: jos tirpumą vandenyje ir kai kuriuose organiniuose tirpikliuose, garų slėgį, įgerties (adsorbcijos) koeficientą, hidrolizę ir biologinį skaidumą anaerobinėmis sąlygomis.

METODO TAIKOMUMAS

8. Šis bandymo metodas taikytinas vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, įskaitant lakiąsias chemines medžiagas. Vis dėlto su vandenyje mažai tirpiomis (12) ir labai lakiomis medžiagomis reikia elgtis itin atsargiai. Taip pat galima naudoti dumblo pasėlius, paimtus iš kitų vietų, kuriose yra anaerobinės sąlygos, pvz., natūralaus dumblo, įmirkusio dirvožemio ar dugninių nuosėdų. Anaerobinių bakterijų sistemos, kurios jau yra patyrusios nuodingųjų cheminių medžiagų poveikį, gali būti prie jo prisitaikiusios, taigi jų aktyvumas gali nesumažėti veikiant ksenobiotinėms cheminėms medžiagoms. Iš prisitaikiusių bakterijų sistemų paimti pasėliai gali būti atsparesni bandomosioms cheminėms medžiagoms negu pasėliai, paimti iš neprisitaikiusių sistemų.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Siekiant patikrinti bandymo procedūrą, atliekamas bandymas naudojant etaloninę cheminę medžiagą, atitinkamus bandymo indus paruošiant taip pat, kaip ir per įprastus bandymus. Įrodyta, kad 3,5-dichlorfenolis nuolat slopina anaerobinių dujų išskyrimą, taip pat aktyviojo dumblo deguonies sugertį ir kitas biochemines reakcijas. Įrodyta, kad dar labiau negu 3,5-dichlorfenolis metano išskyrimą slopina kitos dvi cheminės medžiagos – metilen-bis-tiocianatas ir pentachlorfenolis, tačiau bandymų su šiomis medžiagomis rezultatai nepatvirtinti. Pentachlorfenolio naudoti nerekomenduojama, nes jo gryno gauti sunku.

REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

10. Per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (5) pakankamas EC_{50} verčių atkuriamumas dešimtyje dalyvavusių laboratorijų gautas naudojant tik 3,5-dichlorfenolį ir 2-brometansulfonrūgštį (pirmosios medžiagos EC_{50} verčių intervalas buvo 32–502 mg/l, antrosios – 220–2 190 mg/l).

Laboratorių skaičius	mg/l			mg /1 g dumblo		
	vidurkis	standar-tinis nuokry-pis	variaci-jos koefi-cientas (proc.)	vidurkis	standar-tinis nuokry-pis	varia-cijos koefi-cientas (proc.)
	3,5-dichlorfenolis					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-brometansulfonrūgštis					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC₅₀ duomenys, gauti per tarplaboratorinį bandymą naudojant neskiestą dumblą.

11. Dideli variacijos koeficientai tarp laboratorijų daugiausia gaunami dėl nevienodo dumblo mikroorganizmų jautrio, kuris priklauso nuo to, ar tie mikroorganizmai jau pirmiau yra patyrę bandomosios cheminės medžiagos arba kitų chemiškai artimų medžiagų poveikį. EC₅₀ vertė pagal dumblo koncentraciją buvo nustatyta tik truputį tiksliau negu „tūrinė“ vertė (mg/l). Visų trijų laboratorijų, pranešusių apie savo nustatytą 3,5-dichlorfenolio EC₅₀ verčių tikslumą, nurodyti variacijos koeficientai (atitinkamai 22, 9 ir 18 % EC₅₀ mg/g) buvo kur kas mažesni negu visų dešimties laboratorijų vidurkių. Šių trijų laboratorijų atskiri vidurkiai atitinkamai buvo 3,1, 3,2 ir 2,8 mg/g. Mažesni, priimtini variacijos koeficientai, nustatyti atskirose laboratorijose (9–22 %), palyginti su kur kas didesniais koeficientais, gautais gretinant įvairių laboratorijų nustatytas vertes (92 %), reiškia, kad atskiri dumblo ėminiai turi labai skirtingų savybių.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

12. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga ir reikmenys:

a) inkubatorius – pagamintas iš nekibirkščiuojančių medžiagų, reguliuojamos 35 ± 2 °C temperatūros;

b) iš aukštam slėgiui atsparaus stiklo pagaminti bandymo indai – tinkamų vardinių matmenų ⁽¹⁾, su dujoms nelaidžiais dengtais sandarikliais, galintys atlaikyti apie 2 bar arba 2×10^5 Pa slėgį (sandarikliai turėtų būti padengti, pvz., politetrafluoretenu, PTFE). Rekomenduojama naudoti stiklinius serumo buteliukus, kurių vardinis tūris 125 ml, o faktinis tūris apie 160 ml, užkemšamus serumo buteliukams skirtais sandarikliais ⁽²⁾, kurie sutvirtinami rangytais aliuminio žiedais; tačiau taip pat sėkmingai galima naudoti butelius, kurių bendras tūris yra 0,1–1 l;

c) ypač tikslus slėgmatis ⁽³⁾ su įtaisais adatai;

bendras išskiriamų dujų (metano ir anglies dioksido) kiekis matuojamas slėgmačiu, pritaikytu susidariusioms dujoms matuoti ir išleisti iš indo. Tinkamo prietaiso pavyzdys – rankoje laikomas tikslusis slėgmatis su prijungta švirkšto adata ir įtaisyta trieigis dujoms nelaidus vožtuvas per dideliu slėgiu sumažinti (1 priedelis). Svarbu, kad slėgio keitlio vamzdelių ir vožtuvo vidaus tūris būtų kuo mažesnis, taigi, neatsižvelgiant į įrangos vidaus tūrį, nebūtų padaryta reikšmingų klaidų;

d) izoliuotos talpos, skirtos nuotekas skaidančiamajam dumblui transportuoti;

e) trieigiai slėgio reguliavimo vožtuvai;

f) sietas, pagamintas iš 1 mm dydžio kvadratinų akučių tinklelio;

g) talpa nuotekas skaidančiamajam dumblui laikyti – iš stiklo arba didelio tankio polietileno pagamintas apie 5 l talpos butelis su įtaisytu maišikliu ir įranga azoto dujų srautui leisti (žr. 13 skirsnį) per viršerdvę;

h) membraniniai filtrai (0,2 μm dydžio akučių) substratui sterilizuoti;

⁽¹⁾ Rekomenduojama naudoti 0,1–1 l tūrio indus.

⁽²⁾ Patartina naudoti dujoms nelaidžius silikoninius sandariklius. Taip pat patartina patikrinti butelių dangtelių, ypač butilkaučiuko sandariklių, nelaidumą dujoms, nes kai kurie rinkoje parduodami sandarikliai nėra pakankamai sandarūs ir praleidžia metano dujas, o kai kurie sandarikliai netenka sandarumo, bandymo sąlygomis pradūrus juos adata.

— Rekomenduojama naudoti dujoms nelaidžius dengtus sandariklius. Jie yra būtini atliekant lakiųjų cheminių medžiagų bandymus (kai kurie rinkoje parduodami sandarikliai yra gana ploni, mažiau nei 0,5 cm storio, ir netenka sandarumo, kai praduriami švirkšto adata).

— Butilkaučiuko (apie 1 cm storio) sandariklius rekomenduojama naudoti, kai bandomosios cheminės medžiagos nėra lakios (jie paprastai lieka nelaidūs dujoms ir po to, kai praduriami adata).

— Rekomenduojama prieš bandymą kruopščiai patikrinti, ar adata pradurti sandarikliai lieka nelaidūs dujoms.

⁽³⁾ Slėgmatis turėtų būti naudojamas ir reguliariai kalibruojamas pagal gamintojo nurodymus. Jeigu naudojamas nustatyto tikslumo slėgmatis, pvz., su plieniniu aptaisu, laboratorijoje jo kalibruoti nereikia. Jį kalibruoti rekomenduojamais intervalais turėtų licenciją turintis institutas. Kalibravimo tikslumą galima patikrinti laboratorijoje atliekant matavimą viename taške, esant 1×10^5 Pa slėgiui, ir sutikrinant gautus rodmenis su kito slėgmačio mechaninio indikatoriaus rodmenimis. Jeigu matavimas tame taške atliekamas tiksliai, matavimo tiesiškumas taip pat nesikeičia. Jeigu naudojami kiti matavimo prietaisai (be gamintojo patvirtinto kalibravimo), patartina reguliariai perskaičiuoti visą jų rodmenų intervalą (2 priedelis).

- i) mikrošvirkštai, naudojami slėgio keitliui sandariai prijungti (žr. 12 skirsnio c punktą) prie butelių viršerdvės (žr. 12 skirsnio b punktą), taip pat netirpioms skystoms bandomosioms medžiagoms iššvirkšti į butelius;
- j) boksas (kamera su pirštinėmis) – jį naudoti rekomenduojama, bet neprivaloma. Jame turi būti palaikomas nedidelis teigiamas azoto dujų slėgis.

Cheminiai reagentai

13. Per visą bandymą turi būti naudojami analiziškai grynai cheminiai reagentai. Per visą bandymą reikėtų naudoti itin grynas azoto dujas, kuriose būtų mažiau nei 5 µl/l deguonies.

Vanduo

14. Jeigu reikia ką nors atskiesti, skiedimui naudokite dejonizuotą vandenį, kurį prieš naudojant būtina deaeruoti. Šio vandens tikrinti analizės metodais nebūtina, tačiau reikia užtikrinti vandens dejonizavimo aparato reguliarią techninę priežiūrą. Dejonizuotas vanduo turi būti naudojamas ir pradiniam tirpalams ruošti. Prieš dedami anaerobinio dumblo pasėlį į bet kokius bandomosios medžiagos tirpalus arba skiedinius, įsitikinkite, kad juose nėra deguonies. Šiuo tikslu vieną valandą prieš dedant pasėlį per skiedimui skirtą vandenį (arba per skiedinius) pučiamas azoto dujų srautas arba skiedimui skirtas vanduo pakaitinamas iki virimo ir bedeguonėje aplinkoje ataušinamas iki kambario temperatūros.

Suskaidytas dumblas

15. Aktyvųjų nuotekas skaidantį dumblą imkite iš nuotekų valymo įrenginio metantanko arba, kitu atveju, iš laboratorinio metantanko, kuriame apdorojamas daugiausia buitinių nuotekų dumblas. Praktinės informacijos apie dumblą iš laboratorinių metantankų galima rasti literatūroje (11). Jeigu ketinate naudoti adaptuoto dumblo pasėlį, apsvarstykite galimybę naudoti nuotekas skaidantį dumblą iš pramoninių nuotekų valymo įrenginio. Dumblą rinkite į plačiakaklius butelius, pagamintus iš didelio tankio polietileno ar iš panašios gebančios plėstis medžiagos. Į ėminiams skirtus butelius dumblo dėkite tiek, kad iki butelio viršaus liktų maždaug 1 cm tarpas, sandariai užkimškite, geriausia su apsauginiu vožtuvu (12 skirsnio e punktas), ir sudėkite į izoliuotas talpas (12 skirsnio d punktas), kad temperatūros svyravimai būtų kuo mažesni iki tol, kol dumblas bus perkeltas į inkubatorių, kuriame bus palaikoma 35 ± 2 °C temperatūra. Prieš atidarydami butelius, būtinai sumažinkite susikaupusių dujų slėgį, atsargiai išimdami kamštį arba naudodami trieigį slėginį vožtuvą (12 skirsnio e punktas). Dumblą patartina sunaudoti per kelias valandas nuo tada, kai jis surinktas, o jei ne, laikykite jį 35 ± 2 °C temperatūroje, viršerdvę virš dumblo pripildę azoto dujų, iki 3 dienų, per kurias dumblo aktyvumas paprastai nedaug tesumažėja.

Ispėjimas. Nuotekas skaidantis dumblas išskiria degias dujas, todėl kyla gaisro ir sprogimo pavojus. Dumble taip pat gali būti patogeninių mikroorganizmų, todėl dirbdami su dumblu naudokite tinkamas apsaugos priemones. Saugos tikslais nedėkite renkamo dumblo į stiklinius indus.

Pasėlis

16. Prieš pat naudodami dumblą, atsargiai jį pamaišykite ir perkoškite per 1 mm² dydžio akučių sieta (12 skirsnio f punktas) į tinkamą butelį (12 skirsnio g punktas), per kurio viršerdvę turi būti leidžiamas azoto dujų srautas. Paimkite dumblo pavyzdį bendrajai sausų kietųjų medžiagų koncentracijai išmatuoti (žr., pvz., ISO 11 923 (13) arba lygiavertį ES standartą). Apskritai reikėtų naudoti neskiestą dumblą. Įprasta kietųjų medžiagų koncentracija dumble yra 2–4 % (masės proc.). Patikrinkite dumblo pH vertę ir prireikus ją patikslinkite iki $7 \pm 0,5$.

Bandymo substratas

17. Dejonizuotame vandenyje ištirpinkite 10 g mitybinių medžiagų sultinio koncentrato (pvz., „Oxoid“), 10 g mielių ekstrakto ir 10 g D-gliukozės ir atskieskite iki 100 ml tūrio. Sterilizuokite perfiltruodami per 0,2 µm dydžio akučių membraninį filtrą (12 skirsnio h punktas) ir naudokite iškart arba ne ilgiau kaip 1 dieną laikykite 4 °C temperatūroje.

Bandomoji cheminė medžiaga

18. Kiekvienai vandenyje tirpiai bandomajai cheminei medžiagai paruoškite atskirą pradinį tirpalą, pvz., 10 g cheminės medžiagos 1 litre skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis). Tinkamus šių pradinių tirpalų kiekius naudokite nustatytų koncentracijų reakcijos mišiniams ruošti. Kitu atveju iš kiekvieno pradinio tirpalo paruoškite atskiestų tirpalų seriją, kad į bandymo butelius pilamo skysčio tūris būtų vienodas kiekvienai galutinei koncentracijai pasiekti. Jeigu reikia, pradinių tirpalų pH turėtų būti patikslintas iki $7 \pm 0,2$.

19. Atlikdami vandenyje nepakankamai tirpių cheminių medžiagų bandymus remkitės ISO 10 634 (12) arba lygiavertį ES standartu. Jeigu reikia naudoti organinį tirpiklį, venkite tokių tirpiklių kaip chloroformas ir anglies tetrachloridas, kurie, kaip žinoma, itin slopina metano išskyrimą. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos reikiamos koncentracijos tirpalą paruoškite naudodami tinkamą lakų tirpiklį, pvz., acetoną ar dietileterį. Reikiamus tirpiklio tirpalo kiekius įpilkite į tuščius bandymo butelius (12 skirsnio b punktas) ir, prieš dėdami dumblą, tirpiklį išgarinkite. Kitas procedūras atlikite pagal ISO 10 634 (12) arba lygiavertį ES standartą, tačiau atminkite, kad bet kokios emulsijoms ruošti naudojamos paviršinio aktyvumo medžiagos gali slopinti anaerobinių dujų išskyrimą. Jeigu manoma, kad naudojant organinius tirpiklius ir emulsiklius atsirastų artefaktų, bandomąją cheminę medžiagą galima dėti tiesiai į bandomąjį mišinį miltelių arba skystu pavidalu. Lakias ir vandenyje netirpias skystas chemines medžiagas galima išvirkšti į serumo buteliukus su pasėliu naudojant mikrošvirkštus (12 skirsnio i punktas).
20. Sudėję bandomąsias chemines medžiagas į butelius, turėtumėte gauti geometrinę koncentracijos verčių progresiją, pvz., 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l ir 15,6 mg/l. Jeigu panašių cheminių medžiagų toksiškumo intervalas nežinomas, pirmiausia atlikite išankstinį intervalo nustatymo bandymą, naudodami 1 000 mg/l, 100 mg/l ir 10 mg/l bandomosios medžiagos koncentracijas, kad nustatytumėte tinkamą intervalą.

Etaloninė cheminė medžiaga

21. Paruoškite 3,5-dichlorfenolio vandeninį tirpalą (10 g/l) – pamažu užpilkite kietąją medžiagą minimaliu 5 mol/l natrio hidroksido tirpalo kiekiu ir purtykite, kol ištirps. Tada įpilkite skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis), iki reikiamo tūrio; tirpimą gali palengvinti apdorojimas ultragarsu. Kitas etalonines chemines medžiagas galima naudoti tada, kai yra nustatytas vidutinis jų EC_{50} verčių intervalas per mažiausiai tris bandymus, naudojant skirtingus pasėlius (gautus iš skirtingų šaltinių arba surinktus skirtingu laiku).

TRUKDŽIAI IR KLAIDOS

22. Manoma, kad kai kurios dumblo sudedamosios dalys gali reaguoti su potencialiais inhibitoriais ir padaryti juos neprieinamus mikroorganizmams, todėl jų slopinamasis poveikis būtų mažesnis arba jo visai nebūtų. Taip pat klaidingi rezultatai būtų gauti tuo atveju, jeigu dumble jau yra slopinamąjį poveikį turinčios cheminės medžiagos, kai ta pati cheminė medžiaga naudojama atliekant bandymą. Klaidingų rezultatų galima gauti ne tik šiais atvejais, bet ir dėl kelių kitų nustatytų veiksnių. Jie išvardyti 3 priedėlyje kartu su metodais, kaip galima išvengti klaidų ar bent jas sumažinti.

BANDYMO PROCEDŪRA

23. Reikiamų kartotinių bandinių skaičius priklauso nuo to, kiek preciziški turi būti slopinimo rodikliai. Jeigu butelių kamščiai yra pakankamai sandarūs ir per visą bandymo trukmę nepraleidžia dujų, pakanka paruošti po vieną kiekvienos reikiamos koncentracijos bandymo butelių partiją (bent po tris kartotinius bandinius). Taip pat paruoškite vieną butelių partiją su etalonine chemine medžiaga ir vieną kontrolinių bandinių grupę. Tačiau jeigu butelių kamščiai lieka sandarūs pradūrus juos tik vieną ar kelis kartus, paruoškite po atskirą bandymo butelių partiją (pvz., po tris kartotinius bandinius) kiekvienam intervalui (t), kuriam reikia gauti visų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų rezultatus. Taip pat paruoškite t butelių partijas su etalonine chemine medžiaga ir kontroliniais bandiniais.
24. Rekomenduojama naudoti boksą (12 skirsnio j punktas). Likus bent 30 min. iki bandymo pradžios, pradėkite leisti azoto dujų srautą per boksą, kuriame turi būti surinkta visa reikiama įranga. Užtikrinkite, kad tvarkant ir užkėmšant butelius dumblo temperatūra visą laiką būtų 35 ± 2 °C.

Išankstinis bandymas

25. Jeigu dumblo aktyvumas nežinomas, rekomenduojama atlikti išankstinį bandymą. Paruoškite kontrolinius bandinius, kuriuose kietųjų medžiagų koncentracijos būtų, pvz., 10 g/l, 20 g/l ir 40 g/l, į juos įdėkite substrato, tačiau nedėkite bandomosios cheminės medžiagos. Taip pat naudokite nevienodus reakcijos mišinio kiekius, kad gautumėte tris arba keturis skirtingus butelio viršerdvės ir skysčio tūrio santykius. Pagal įvairiais laiko intervalais susidariusių dujų kiekius nustatomos tinkamiausios sąlygos, kuriomis galima dukart per dieną atlikti matavimus, susidarius pakankamiems dujų kiekiams, ir išleisti slėgį kartą per dieną, užtikrinant optimalų jautrį ⁽¹⁾ ir nerizikuojant, kad buteliai susprogs.

⁽¹⁾ Tai tokios pasirengimo bandymui ir bandymo sąlygos, kai susidariusių dujų kiekius tuščiuose kontroliniuose bandiniuose ir induose, kuriuose vyksta 70–80 % slopinimas, galima įvertinti su priimtino dydžio paklaidomis.

Bandomųjų cheminių medžiagų dėjimas

26. Vandenyje tirpias bandomąsias chemines medžiagas į tuščius bandymo butelius (12 skirsnio b punktas) įpilkite vandeninių tirpalų sudėtyje (18 punktas). Kiekvienos pasirinkto intervalo koncentracijos kartotinių bandinių butelių turėtų būti ne mažiau kaip po tris (20 skirsnis). Vandenyje netirpių ir mažai tirpių bandomųjų medžiagų, ištirpintų organiniuose tirpikliuose, tirpalus išvirkškite į tuščius butelius naudodami mikrošvirkštą, kad gautumėte kiekvienos iš penkių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų kartotinių bandinių rinkinius. Tirpiklį iš bandymo butelių išgarinkite leisdami azoto dujų srautą virš tirpalų paviršiaus. Kitu atveju pasvertus tinkamus netirpių kietųjų cheminių medžiagų kiekius įdėkite tiesiai į bandymo butelius.
27. Jeigu vandenyje netirpios ir mažai tirpios skystos bandomosios cheminės medžiagos dedamos nenaudojant tirpiklio, išvirkškite jas mikrošvirkštu tiesiai į bandymo butelius po to, kai į juos įdėtas pasėlis ir bandymo substratas (žr. 30 skirsnį). Lakias bandomąsias chemines medžiagas galima įleisti į butelius tokiu pačiu būdu.

Pasėlio ir substrato dėjimas

28. Sumaišykite reikiamą per sieta perkošto nuotekas skaidančio dumblo kiekį (žr. 16 skirsnį) 5 litrų butelyje (12 skirsnio g punktas), per jo viršerdvę leisdami azoto dujų srautą. Į bandymo butelius, į kuriuos supilti bandomųjų cheminių medžiagų vandeniniai tirpalai arba tirpalai, kuriuose naudotas ir vėliau išgarintas tirpiklis, pūskite azoto dujų srautą maždaug dvi minutes, kad pašalintumėte orą. Į bandymo butelius paskirstykite gerai sumaišyto dumblo alikvotines dalis, pvz., po 100 ml, naudodami pipetę dideliu antgaliu arba matavimo cilindrą. Svarbu vienu kartu įtraukti į pipetę reikiamą dumblo kiekį, nes kietosios dumblo dalelės greitai nugrimzta į dugną. Jei paėmėte daugiau dumblo, negu reikia, ištuštinkite pipetę ir pradėkite iš naujo.
29. Tada, tebepūsdami azoto dujas, įpilkite pakankamą substrato tirpalo kiekį (17 skirsnis), kad mišinyje būtų po 2 g/l mitybinių medžiagų sultinio, mielių ekstrakto ir D-gliukozės koncentracija. Toliau pateiktas bandinių partijų ruošimo pavyzdys.

Galutinė bandomosios cheminės medžiagos masės koncentracija bandymo buteliuose (mg/l)	Bandomosios cheminės medžiagos tūris (ml)		Reagentai ir terpės (ml)		
	Pradinis tirpalas a) 10 g/l 18 skirsnis	Pradinis tirpalas b) 1 g/l 18 skirsnis	Skiedimui tinkamas vanduo 14 skirsnis	Pasėlis 16 skirsnis	Substratas 17 skirsnis
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Bendras butelio tūris – 160 ml. Skysčio tūris – 103 ml.

Dujų tūris – 57 ml, arba 35,6 % bendrojo tūrio.

30. Taip pat paruoškite pakankamai tuščių bandymo butelių ir pūskite per juos azoto dujas, kai naudojate bet kokią lakią arba netirpią skystą bandomąją cheminę medžiagą (žr. 27 skirsnį).

Kontroliniai bandiniai ir etaloninė cheminė medžiaga

31. Paruoškite mažiausiai trijų kartotinių butelių rinkinius tik su dumblu ir substratu, kaip kontrolinius bandinius. Taip pat paruoškite papildomų kartotinių bandinių butelius su dumblu ir substratu, į kuriuos būtų įpilta pakankamai etaloninės cheminės medžiagos 3,5-dichlorfenolio (21 skirsnis) pradinio tirpalo, kad būtų gauta galutinė 150 mg/l koncentracija. Tokia koncentracija turėtų apie 50 % slopinti dujų išskyrimą. Kitu atveju sudarykite etaloninės cheminės medžiagos koncentracijų intervalą. Be to, paruoškite keturis papildomus butelius pH matuoti – į juos turi būti dedama dumblo, vandens, iš kurio pašalintas deguonis, ir substrato. Į du iš šių butelių įdėkite didžiausią bandymui pasirinktą bandomosios medžiagos koncentraciją, o į likusius du butelius įpilkite vandens, iš kurio pašalintas deguonis.

32. Įsitikinkite, kad visuose – bandomosios bei etaloninės cheminių medžiagų ir kontrolinių bandinių – buteliuose skysčio tūris (V_R) yra vienodas; kai reikia, įpilkite dejonizuoto vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis), iki reikiamo tūrio. Viršerdvė turėtų sudaryti 10–40 % butelio tūrio; tikslus santykis nustatomas remiantis išankstinio bandymo duomenimis. Sudėję visas sudedamąsias dalis į butelius, ištraukite adatą, per kurią pučiamos dujos, ir užkimškite kiekvieną butelį guminiu kamščiu su aliuminio gaubteliu (12 skirsnio b punktas), sudrėkinę kamštį dejonizuoto vandens lašu, kad jį būtų lengviau įstatyti. Sumaišykite kiekvieno butelio turinį jį papurtydami.

Butelių inkubavimas

33. Perkelti butelius į termostatu reguliuojamą inkubatorių (geriausia su purtykle) ir palaikykite jame 35 ± 2 °C temperatūrą. Buteliai inkubuojami tamsoje. Praėjus maždaug 1 valandai, suvienodinkite slėgį buteliuose su atmosferos slėgiu: paeiliui pradurkite prie slėgmačio pritvirtinta švirkšto adatą (12 skirsnio c punktas) kiekvieno butelio kamštį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgmačio rodmuo pasieks nulį, ir galiausiai vėl uždarykite vožtuvą. Adatą reikėtų įstatyti maždaug 45° kampu, kad iš butelių neišeitų dujos. Jeigu butelių inkubatorius yra be purtyklės, rankomis juos papurtykite dukart per dieną per visą inkubacinį periodą, taip palaikydami sistemos pusiausvyrą. Inkubuojamus butelius apverskite, kad per sandariklį neišeitų dujų, tačiau apversti butelius netinka tais atvejais, kai netirpios bandomosios cheminės medžiagos gali prikibti prie butelio dugno.

Slėgio matavimas

34. Kai buteliuose pasiekama 35 ± 2 °C temperatūra, išmatuokite ir užrašykite dviejų iš keturių šiam tikslui paruoštų butelių turinio pH ir tada jų turinį pašalinkite; likusius butelius toliau inkubuokite tamsoje. Per vėlesnį 48–72 val. laikotarpį dukart per dieną išmatuokite ir užrašykite slėgį buteliuose, paeiliui išmeigdami slėgmačio adatą per kiekvieno butelio kamštį, tarp matavimų adatą išdžiovindami. Atliekant matavimus, visos butelio dalys turi būti laikomos toje pačioje temperatūroje, kaip ir per inkubaciją; matavimą reikėtų stengtis atlikti kuo greičiau. Palaukite, kol nusistovės slėgio rodmuo, ir jį užrašykite, tada atidarykite vožtuvą, kad išleistumėte dujų perteklių, ir vėl uždarykite, kai slėgio rodmuo pasieks nulį. Bandymas paprastai tęsiamas 48 valandas po pirmojo slėgio suvienodinimo (pažymėto kaip „nulinis laikas“). Per lakiųjų cheminių medžiagų bandymus matavimą ir dujų išleidimą reikėtų atlikti tik vieną kartą (inkubacinio periodo pabaigoje) arba du kartus, kad būtų prarasta kuo mažiau bandomosios cheminės medžiagos (10).
35. Jeigu slėgio rodmuo yra neigiamas, vožtuvo neatidarykite. Kartais švirkšto adatoje ir vamzdyje susikaupia šiek tiek drėgmės, todėl slėgmačio rodmuo parodo mažą neigiamą slėgį. Tokiu atveju išimkite adatą, papurtykite vamzdelį, nusauskite servetėle ir įdėkite naują adatą.

pH matavimas

36. Po paskutinio slėgio matavimo išmatuokite ir užrašykite kiekvieno butelio turinio pH vertę.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų išraiška

37. Apskaičiuokite per kiekvieną laiko intervalą kiekviename kartotinių bandinių butelių rinkinyje nustatytų ir užrašytų slėgio rodmenų sumą bei vidurkį ir apskaičiuokite kiekvieno kartotinių bandinių rinkinio bendrąjį vidutinį dujų slėgį per kiekvieną laiko intervalą. Nubrėžkite kontrolinės, bandomosios ir etaloninės grupių butelių bendrojo vidutinio dujų išskyrimo (išreikšto paskaliais, Pa) kreives kaip laiko funkciją. Tiesinėje kreivės dalyje pažymėkite tam tikrą laiko vienetą, paprastai 48 valandas, ir apskaičiuokite kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos sukeltą procentinį slopinimą (I) pagal lygtį [1]:

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

kurioje:

I procentinis slopinimas (%);

P_t naudojant bandomąją medžiagą susidariusių dujų slėgis pasirinktu laiku, išreikštas paskaliais (Pa);

P_c kontrolinėje grupėje susidariusių dujų slėgis tuo pačiu laiku, išreikštas paskaliais (Pa);

Patartina nubrėžti abu grafikus, t. y. I grafiką kaip koncentracijos funkciją ir kartu grafiką kaip koncentracijos logaritmo funkciją, kad būtų galima pasirinkti tiesiškumui artimiausią kreivę. Įvertinkite EC_{50} (mg/l) vertę iš akies arba atlikdami regresinę analizę pagal tiesiškumui artimesnę kreivę. Siekiant palyginamumo, cheminės medžiagos koncentraciją gali būti naudingiau išreikšti kaip tos cheminės medžiagos kiekio (mg) ir bendro sausų kietųjų medžiagų kiekio (g) santykį. Šią koncentraciją gausite padaliję bandomosios medžiagos tūrinę koncentraciją (mg/l) iš sausų dumblo kietųjų medžiagų tūrinės koncentracijos (g/l) (16 skirsnis).

38. Apskaičiuokite procentinį slopinimą, esant vienintelei pasirinktai etaloninės cheminės medžiagos koncentracijai, arba EC_{50} , jeigu tyrimui pasirinkta pakankamai koncentracijos verčių.
39. Vidutinį kontroliniame bandinyje susidariusių dujų slėgį P_c (Pa) paverskite tūriu remdamiesi slėgmačio kalibravimo kreive (2 priedėlis) ir pagal tai apskaičiuokite dujų išeigą, kuri išreiškiama dujų tūriu, susidariusiu per 48 valandas iš 100 ml neskiesto dumblo, kurio kietųjų medžiagų koncentracija yra nuo 2 % (20 g/l) iki 4 % (40 g/l).

Tinkamumo kriterijai

40. Iš ISO tarplaboratorinio bandymo (5) rezultatų žinoma, kad etaloninė cheminė medžiaga (3,5-dichlorfenolis) 50 % nuslopino dujų išskyrimą esant 32–510 mg/l koncentracijų intervalui ir 153 mg/l vidurkiui (10 skirsnis). Tai toks platus intervalas, kad neįmanoma patikimai nustatyti aiškių slopinimo ribinių verčių kaip bandymo tinkamumo kriterijų; tai turėtų būti įmanoma tada, kai bus sužinota, kaip gauti vienodesnius pasėlius. Kontrolinės grupės buteliuose per 48 valandas susidariusių dujų tūris siekė nuo 21 ml/g iki 149 ml vienam kietos dumblo medžiagos gramui (vidurkis – 72 ml/g). Nenustatyta aiškaus ryšio tarp susidariusių dujų kiekio ir atitinkamos EC_{50} vertės; bandymo pabaigoje išmatuotas pH buvo nuo 6,1 iki 7,5.
41. Bandymas pripažįstamas tinkamu, kai etaloniniame kontroliniame bandinyje, į kurį dėta 150 mg/l 3,5-dichlorfenolio, nustatytas slopinimas yra didesnis negu 20 %, tuščiame kontroliniame bandinyje susidaro daugiau kaip 50 ml dujų vienam kietosios medžiagos gramui, o pH vertė bandymo pabaigoje yra nuo 6,2 iki 7,5.

Bandymo ataskaita

42. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- Bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė, atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės.
- Bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos).

Bandymo sąlygos

- Bandymo induose esančio skysčio ir viršerdvės tūrio santykis.
- Bandymo indų ir dujų matavimo aprašymai (pvz., kokios rūšies slėgmatis naudojamas).
- Bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos naudojimas bandymo sistemoje, bandymui pasirinktos koncentracijos ir bet kokių tirpiklių naudojimas.
- Informacija apie naudotą pasėlį: nuotekų valymo įrenginio pavadinimas, jame valomų nuotekų šaltinio aprašymas (pvz., įrenginio eksploatavimo temperatūra, dumblo laikymo trukmė, ar tai daugiausia buitinės nuotekos, ar pramonės atliekos, ir t. t.), dumblo kietųjų medžiagų koncentracija, dujų susidarymo aktyvumas anaerobiniame metantanke, ankstesnis nuodingųjų cheminių medžiagų poveikis ar galimas prisitaikymas prie jų arba, jeigu naudojamas natūralus dumbblas, nuosėdos ar kt. – iš kokios vietos paimti tie ėminiai.
- Inkubacijos temperatūra ir trukmė.
- Kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai

- Bandymo pabaigoje nustatytos pH vertės.
- Visi matavimais nustatyti bandomosios grupės, tuščių kontrolinių bandinių ir etaloninės cheminės medžiagos kontrolinių bandinių indų duomenys, tinkamai pateikti (pvz., slėgis išreikštas paskaliais arba milibaraais) lentelėse.
- Buteliuose su bandomąja medžiaga ir etalonine medžiaga nustatytas procentinis slopinimas ir slopinimo bei koncentracijos santykio kreivės.
- EC₅₀ verčių, išreiškiamų mg/l ir mg/g, apskaičiavimas.
- Vienam gramui dumblo per 48 valandas susidariusių dujų kiekis.
- Jei kurie nors bandymo rezultatai atmeti kaip netinkami – jų atmetimo priežastys.
- Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokius nukrypimus nuo šio bandymo metodo procedūrų ir aptariant bet kokius atvejus, kai bandymo rezultatai neatitinka prognozių dėl įvairių trukdžių ir klaidų.
- Taip pat nurodykite, ar per bandymą siekta išmatuoti bandomosios medžiagos toksiškumą tos medžiagos jau pirmiau paveiktiems, ar jos poveikio dar nepatyrusiems mikroorganizmams.

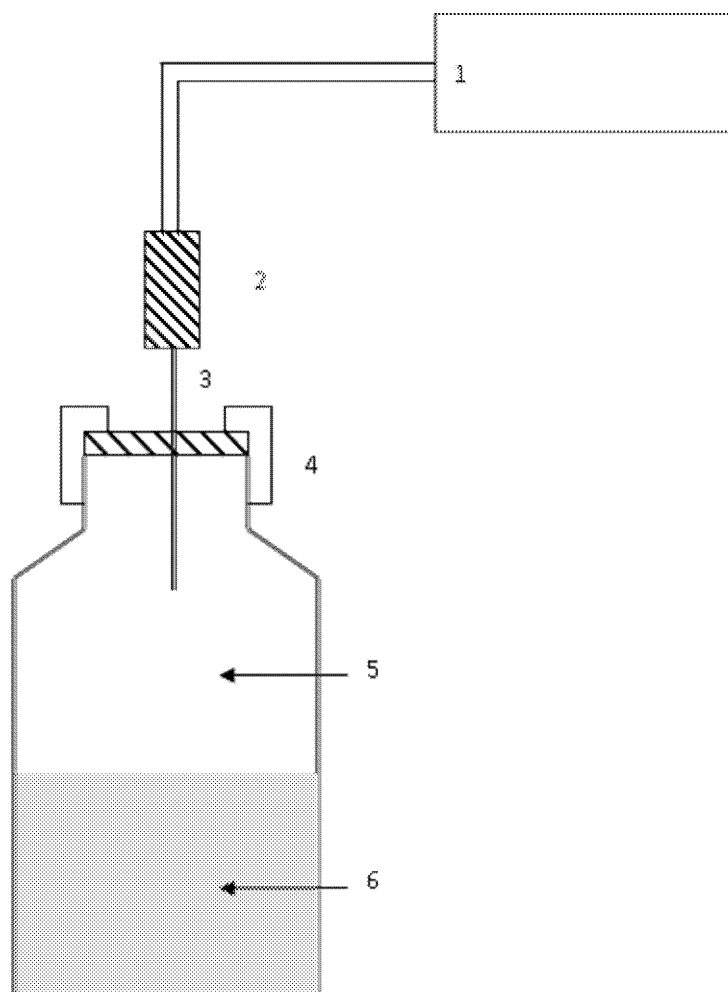
NUORODOS

- (1) Šio priedo C.11 skyrius. Aktyviojo dumblo kvėpavimo slopinimo bandymas.
- (2) Šio priedo C.43 skyrius. Organinių junginių anaerobinis biologinis skaidumas suskaidytame dumble. Dujų susidarymo matavimo metodas.
- (3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.
- (4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

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

1 priedėlis

Biodujų susidarymui matuoti pagal dujų slėgį skirto aparato pavyzdys



Paaiškinimas:

- 1 – slėgmatis
- 2 – triegis dujoms nelaidus vožtuvas
- 3 – švirkšto adata
- 4 – dujoms nelaidus kamštis (rangytos vielos dangtelis ir sandariklis)
- 5 – viršerdvė
- 6 – suskaidyto dumblo pasėlis

Bandymo indai laikomi 35 ± 2 °C temperatūros aplinkoje.

2 priedėlis

Slėgmačio rodmenų perskaičiavimas

Slėgmačio rodmenis galima susieti su dujų tūrio vertėmis naudojant standartinę kreivę ir taip galima apskaičiuoti vienam sauso dumblo gramui (g) per 8 valandas tenkanti susidariusių dujų tūrį. Šis dumblo aktyvumo rodiklis naudojamas kaip vienas iš kriterijų, pagal kuriuos vertinamas bandymo rezultatų tinkamumas. Kalibravimo kreivė gaunama išvirkščiant žinomo tūrio dujų kiekius, esant 35 ± 2 °C temperatūrai, į serumo buteliukus su vandeniu, kurio tūris yra lygus reakcijos mišinio tūriui V_R :

- į penkis serumo buteliukus išpilstykite V_R ml alikvotines dalis 35 ± 2 °C temperatūroje laikyto vandens. Buteliukus užkimškite ir pastatykite į 35 ± 2 °C temperatūros vandens vonelę vienai valandai, kad nusistovėtų pusiausvyra;
- įjunkite slėgmatį, palaukite, kol nusistovės rodmenys, ir nustatykite nulį;
- išmeikite švirkšto adatą per vieno iš buteliukų kamštį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgmačio rodmuo pasieks nulį, ir uždarykite vožtuvą;
- pakartokite tą pačią procedūrą likusiuose buteliukuose;
- į kiekvieną buteliuką išvirkškite po 1 ml 35 ± 2 °C temperatūros oro. Įbeskite (matuoklio) adatą per vieno iš buteliukų kamštį ir palaukite, kol nusistovės slėgio rodmuo. Užrašykite slėgį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgio rodmuo pasieks nulį, ir uždarykite vožtuvą;
- pakartokite tą pačią procedūrą likusiuose buteliukuose;
- pakartokite visą šią procedūrą naudodami 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ir 50 ml oro;
- nubrėžkite slėgio (Pa) perskaičiavimo pagal įleistų dujų tūrį (ml) kreivę. Gautas instrumento atsakas yra tiesinis 0–70 000 Pa intervale ir nuo 0 ml iki 50 ml susidariusių dujų tūrio.

3 priedėlis

Nustatyti veiksniai, dėl kurių gali būti gauti klaidingi rezultataia) *Butelių dangtelių kokybė*

Rinkoje parduodami įvairių rūšių sandarikliai serumo buteliukams; daugelis jų, įskaitant butilkaučiuko sandariklius, netenka sandarumo, kai praduriami adata šio bandymo sąlygomis. Kartais, pradūrus sandariklį švirkšto adata, slėgis mažėja labai lėtai. Kad nebūtų nuotėkio, rekomenduojama naudoti dujoms nelaidžius sandariklius (12 skirsnio b punktas).

b) *Švirkšto adatoje susikaupusi drėgmė*

Kartais švirkšto adatoje ir vamzdelyje susikaupia šiek tiek drėgmės, todėl slėgmačio rodmuo parodo mažą neigiamą slėgį. Tokiu atveju išimkite adatą, papurtykite vamzdelį, nusauskite servetėle ir įdėkite naują adatą (12 skirsnio c punktas ir 35 skirsnis).

c) *Deguonies priemonės*

Atliekant bandymus anaerobiniais metodais, galima padaryti klaidų, jeigu yra deguonies priemonių, dėl kurių gali sumažėti dujų išskyrimas. Taikant šį metodą, tokių klaidų tikimybę reikėtų sumažinti, griežtai laikantis anaerobinių technologijų, be kita ko, naudojant boksą (kamerą su pirštinėmis).

d) *Stambios dalelės dumblo substratuose*

Anaerobiniam dujų išskyrimui ir dumblo jautriui daro įtaką substratai, kartu su pasėliu dedami į bandymo butelius. Suskaidytame dumble, paimtame iš buitinių nuotekų anaerobinio valymo metantankų, dažnai tebėra neasimiliuotų medžiagų, kaip antai plaukų ir augalinių celiuliozės liekanų, dėl kurių paimti reprezentatyvius ėminius paprastai yra sunku. Šias netirpias kietąsias medžiagas galima pašalinti perkošiant dumblą per sieta – taip labiau tikėtina, kad pavyks paimti reprezentatyvius ėminius (16 skirsnis).

e) *Lakios bandomosios cheminės medžiagos*

Lakios bandomosios cheminės medžiagos bandymo buteliuose išsiskiria į viršerdvę, todėl dalis bandomosios cheminės medžiagos gali pasišalinti iš sistemos išleidžiant dujas po slėgio matavimų. Dėl to gali būti gautos klaidingai didelės EC_{50} vertės. Tokių klaidų tikimybę galima sumažinti pasirinkus tinkamą viršerdvės ir skysčio tūrio santykį ir neišleidžiant dujų po slėgio matavimų (10).

f) *Dujų susidarymo kreivės netiesiškumas*

Jeigu vidutinio bendrojo dujų susidarymo per inkubacinį periodą grafiko kreivė 48 val. laikotarpiu nėra artima tiesei, tai reiškia, kad gali būti sumažėjęs bandymo tikslumas. Siekiant išspręsti šią problemą, gali būti patartina naudoti nuotekas skaidantį dumblą iš kito šaltinio ir (arba) padidinti bandymo substrato ir mitybinių medžiagų sultinio, mielių ekstrakto ir gliukozės koncentraciją (29 skirsnis).

4 priedėlis

Šio bandymo metodo taikymas mažos biomasės koncentracijos ėminiams, paimtiems iš aplinkos – natūralaus anaerobinio dumblo, dugninių nuosėdų ir kt.

IVADAS

- A.1 Gamtoje natūraliai susidariusio anaerobinio dumblo, dugninių nuosėdų, dirvožemio ir kt. savitasis mikroorganizmų aktyvumas (vienam sausų kietųjų medžiagų gramui susidariusių dujų tūris) apskritai yra kur kas mažesnis negu iš nuotekų gauto anaerobinio dumblo aktyvumas. Todėl, kai reikia vertinti cheminių medžiagų slopinamąjį poveikį šio mažiau aktyvaus dumblo ėminiams, būtina pakeisti kai kurias bandymo sąlygas. Bandymus su šiais mažiau aktyviais ėminiais apskritai galima atlikti dvejopai:
- a) atlikti iš dalies pakeistą išankstinį bandymą (25 skirsnis) naudojant neskiestą natūralaus dumblo, dirvožemio ar kt. ėminį, palaikant 35 ± 2 °C temperatūrą arba tokią pačią temperatūrą, kokia buvo toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys, siekiant tiksliau imituoti aplinkos sąlygas (kaip tai daroma pagal ISO 13 641 standarto 1 dalį); arba
 - b) atlikti bandymą naudojant atskiestą (1:100 santykiu) iš metantanko paimtą dumblą, imituojant mažą iš aplinkos paimtam ėminiui būdingą aktyvumą, tačiau palaikant 35 ± 2 °C temperatūrą (kaip tai daroma pagal ISO 13 641 standarto 2 dalį).
- A.2 Pagal čia aprašytąjį metodą galima rinktis a variantą (atitinkantį ISO 13 641 standarto 1 dalį), tačiau būtina atlikti išankstinį bandymą (25 skirsnis), siekiant nustatyti optimalias bandymo sąlygas, nebent jos būtų jau žinomos iš ankstesnių bandymų. Natūralaus dumblo arba dugninių nuosėdų ėminys turėtų būti kruopščiai sumaišytas, pvz., maišytuvu, ir, jei reikia, atskiestas nedideliu deaeruooto skiedimui tinkamo vandens kiekiu (14 skirsnis), kad būtų pakankamai skystas, taigi jį būtų galima perkelti naudojant pipetę stambiu galu arba matavimo cilindrą. Jeigu manoma, kad gali pritrūkti mitybinių medžiagų, natūralaus dumblo ėminį galima centrifuguoti (anaerobinėmis sąlygomis) ir resuspenduoti mineralinėje terpėje, į kurią dėta mielių ekstrakto (A.11).
- A.3 Pasirinkus b variantą, pakankamai tiksliai imituojamas mažas iš aplinkos paimtų ėminių aktyvumas, tačiau tokiose ėminiuose nėra didelės suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracijos. Šių kietųjų medžiagų įtaka cheminės medžiagos slopinamajam poveikiui nežinoma, tačiau įmanoma, kad bandomosioms cheminėms medžiagoms reaguojant su natūralaus dumblo sudedamosiomis dalimis ir įsigeriant į kietųjų medžiagų paviršių, gali sumažėti tų bandomųjų cheminių medžiagų toksiškumas.
- A.4 Kitas svarbus veiksnys yra temperatūra: siekiant tiksliai imituoti aplinkos sąlygas, bandymus reikėtų atlikti tokioje temperatūroje, kokia yra toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys, nes yra žinoma, kad įvairių metaną išskiriančių bakterijų populiacijų aktyvumo temperatūros intervalai skiriasi, t. y. jos skirstomos į šilumamėges (~ 30–35 °C), vidutinę temperatūrą mėgstančias (20–25 °C) ir šaltamėges (< 20 °C) bakterijas ir tai gali lemti skirtingus slopinimo duomenis.
- A.5 Trukmė. Atliekant bendrąjį bandymą (1 dalis), naudojant neskiestą dumblą, dujų per 2–4 dienas visada susidarydavo pakankamai, o atliekant bandymą pagal 2 dalį, naudojant iki 1/100 atskiestą dumblą, tuo pačiu laikotarpiu per tarplaboratorinį bandymą dujų susidarė nepakankamai daug arba jų visai nebuvo. Kaip pastarojo bandymo apibūdinime nurodė Madsen ir kt. (1996), jam reikėtų skirti bent 7 paras.

Mažos biomasės koncentracijos bandymai (b variantas)

Šiuo atveju reikėtų atlikti toliau aprašytus pakeitimus ir pataisas, papildant arba pakeičiant kai kurias pagrindinio teksto dalis ir punktus.

- A.6 6 skirsnis „BANDYMO PRINCIPAS“ papildomas šiuo tekstu:

„Pagal šį metodą galima naudoti 1:100 santykiu atskiestą anaerobinį dumblą, iš dalies siekiant imituoti mažą natūralaus dumblo ir dugninių nuosėdų aktyvumą. Inkubavimo temperatūra gali būti 35 °C arba tokia pati, kokia buvo toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys. Kadangi bakterijų aktyvumas yra kur kas mažesnis negu neskiestame dumble, inkubacinį periodą reikėtų pratęsti bent iki 7 parų.“

- A.7 12 skirsnio a punktas papildomas šiuo tekstu:

„inkubatoriaus temperatūros intervalo žemutinė riba turėtų siekti iki 15 °C“.

A.8 Po 13 skirsnio įrašomas papildomas reagentas:

„Fosforo rūgštis (H_3PO_4), 85 % (masės) vandeninis tirpalas.“

A.9 16 skirsnio pabaigoje įrašoma:

„Galutinė bendra sausų kietųjų medžiagų koncentracija per bandymą turėtų būti $0,20 \pm 0,05$ g/l.“

A.10 17 skirsnis. Bandymo substratas

Šio substrato naudoti nereikia, jis pakeičiamas mielių ekstraktu (žr. 17 skirsnį; A.11, A.12, A.13).

A.11 Anaerobiniam dumblui skiesti būtina naudoti mineralinių medžiagų terpę su mikroelementais. Dėl patogumo į šią terpę dedama organinio substrato – mielių ekstrakto.

Po 17 skirsnio įterpiamas toks tekstas:

„a) bandymo mineralinė terpė su mielių ekstraktu.

Ji ruošama iš 10 kartų didesnės koncentracijos bandymo terpės (17 skirsnio b punktas; A.12) su mikroelementų tirpalu (17 skirsnio c punktas; A.13). Naudokite ką tik gautą šviežią natrio sulfido nonahidratą (17 skirsnio b punktas; A.12) arba prieš naudodami jį išplaukite ir išdžiovinkite, kad užtikrintumėte pakankamą jo redukuojamąją gebą. Jeigu bandymas atliekamas nenaudojant bokso (12 skirsnio j punktas), natrio sulfido koncentraciją pradiniam tirpale (1 g/l) reikėtų padidinti iki 2 g/l. Taip pat galima įdėti natrio sulfido iš tinkamo pradinio tirpalo, įleidžiant jį per užkimštą bandymo butelių sandariklį, taip sumažinant oksidacijos riziką; galutinė jo koncentracija turi būti 0,2 g/l. Kitu atveju galima naudoti titano (III) citratą (17 skirsnio b punktas) – jis įleidžiamas per užkimštą bandymo butelių sandariklį ir jo koncentracija turi būti 0,8–1,0 mmol/l. Titano (III) citratas yra labai veiksmingas ir mažai toksiškas reduktorių, kuris ruošiamas taip: 2,94 g trinatrio citrato dihidrato ištirpinama 50 ml skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 dalis) (taip gaunamas 200 mmol/l tirpalas) ir įpilama 5 ml titano (III) chlorido tirpalo (15 g / 100 ml skiedimui tinkamo vandens). Neutralizuokite pH iki $7 \pm 0,5$ naudodami natrio karbonatą ir, pūsdami azoto dujų srautą, supilkite gautą skystį į reikiamą serumo buteliuką. Titano (III) citrato koncentracija šiame pradiniam tirpale yra 164 mmol/l. Šią terpę bandymui naudokite iškart arba ne ilgiau kaip 1 dieną laikykite 4 °C temperatūroje.

A.12 b) 10 kartų didesnės koncentracijos bandymo terpė, paruošta iš šių medžiagų:

bevandensio kalio dihidrogenfosfato (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatrio vandenilio fosfato (Na_2HPO_4)	4,4 g
(arba 11,2 g dodekahidrato)	5,3 g
amonio chlorido (NH_4Cl)	
kalcio chlorido dihidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
magnio chlorido heksahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
geležies (II) chlorido tetrahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
resazūrinio (oksidacijos-redukcijos indikatorius)	0,01 g
natrio sulfido nonahidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(arba titano (III) citrato), galutinė koncentracija	0,8–1,0 mmol/l
mikroelementų tirpalas (žr. 17 skirsnio c punktą; A.13)	10,0 ml
mielių ekstraktas	100 g
Ištirpinkite skiedimui tinkamame vandenyje (14 skirsnis) ir papildykite iki	1 000 ml

A.13 c) Mikroelementų tirpalas, ruošiamas iš šių medžiagų:

mangano (II) chlorido tetrahidrato ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
ortoboro rūgšties (H_3BO_3)	0,05 g

cinko chlorido (ZnCl_2)	0,05 g
vario (II) chlorido (CuCl_2)	0,03 g
natrio molibdato dihidrato ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
kobalto (II) chlorido heksahidrato ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
nikelio (II) chlorido heksahidrato ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
dinatrio selenito (Na_2SeO_3)	0,05 g
Ištirpinkite skiedimui tinkamame vandenyje (14 skirsnis) ir papildykite iki	1 000 ml“

A.14 25 skirsnis. Išankstinis bandymas

Būtina atlikti išankstinį bandymą 24 skirsnyje aprašyta tvarka, išskyrus tai, kad dumblo kietųjų medžiagų koncentracija per šį bandymą turėtų būti 1/100 nurodytų koncentracijų, t. y. 0,1 g/l, 0,2 g/l ir 0,4 g/l. Inkubacinis periodas turėtų trukti bent 7 paras.

Pastaba. Per tarplaboratorinį bandymą (5) viršerdvės tūris – 75 % bendro tūrio – buvo gerokai per didelis; rekomenduojamas intervalas yra 10–40 %. Atitinkamas kriterijus yra tai, kad dujų, susidariusių esant maždaug 80 % slopinimui, tūris turėtų būti matuojamas pakankamai preciziškai (pvz., su ± 5 –10 % paklaida).

A.15 26–30 skirsniai. Bandomosios cheminės medžiagos, pasėlio ir substrato dėjimas

Šios medžiagos dedamos į bandymo indus taip pat, kaip aprašyta nurodytuose skirsniuose, tačiau substrato tirpalas (17 skirsnis) pakeičiamas bandymo terpe, į kurią dėta mielių ekstrakto substrato (A.11).

Galutinė sausų kietųjų dumblo medžiagų koncentracija taip pat sumažinama nuo 2–4 g/l iki $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Du sudedamųjų dalių dėjimo į bandomąjį mišinį pavyzdžiai pateikti A.1 lentelėje, kuria pakeičiama 29 skirsnio lentelė.

A.16 33 skirsnis. Butelių inkubacija

Dėl numatomos mažesnės dujų išskyrimo spartos inkubacinis periodas trunka bent 7 paras.

A.17 34 skirsnis. Slėgio matavimai

Jeigu reikia nustatyti dujinės fazės medžiagų kiekius, butelių viršerdvės slėgis matuojamas pagal tą pačią procedūrą, kaip aprašyta 34 skirsnyje. Jeigu reikia išmatuoti bendrą CO_2 ir CH_4 kiekį, skystosios fazės pH sumažinamas iki maždaug 2, į kiekvieną atitinkamą butelį išvirkščiant H_3PO_4 ir išmatuojant slėgį po 30 minučių purtymo tokioje pačioje temperatūroje, kokia palaikoma per bandymą. Tačiau daugiau informacijos apie pasėlio kokybę galima gauti išmatuojant slėgį kiekviename butelyje prieš rūgštinimą ir po jo. Pavyzdžiui, kai CO_2 išskyrimo sparta yra kur kas didesnė negu metano, gali pasikeisti fermentuojančiųjų bakterijų jautris ir (arba) bandomoji cheminė medžiaga pirmiausia paveikia metaną išskiriančias bakterijas.

A.18 36 skirsnis. pH matavimas

Jeigu naudojama H_3PO_4 , reikėtų paruošti papildomų pH matuoti skirtų butelių, į kuriuos nededama H_3PO_4 .

NUORODA.

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

A.1 lentelė.

Bandinių partijų ruošimo bandymui pavyzdžiai

Reakcijos mišinio sudedamosios dalys	1 pavyzdys	2 pavyzdys	Įprasta dėjimo eilės tvarka
Paruošto pasėlio koncentracija (g/l)	0,42	2,1	—
Įdėto pasėlio tūris (ml)	45	9	4
Pasėlio koncentracija bandymo buteliuose (g/l)	0,20	0,20	—
Įdėtos bandymo terpės tūris (ml)	9	9	2
Įpildo skiedimui skirtos vandens tūris (ml)	36	72	3
Mielių ekstrakto koncentracija bandymo buteliuose (g/l)	9,7	9,7	—
Bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo tūris (ml)	3	3	1
Bendras skysčio tūris (ml)	93	93	—

*5 priedėlis***Sąvokų apibrėžtys**

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

**C.35 TOKSIŠKUMO LUMBRICULUS DUGNINIŲ NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE BANDYMAS
NAUDOJANT DUGNINES NUOSĖDAS SU ĮTERPTA BANDOMĄJA MEDŽIAGA****ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 225 (2007). Vandens telkinių dugno nuosėdas ryjantys podugnio gyvūnai gali patirti didelį dugninėse nuosėdose besikaupiančių cheminių medžiagų poveikį, todėl reikėtų jiems skirti ypač daug dėmesio, kaip rašoma literatūroje, pvz., (1), (2), (3). Iš šių dugnines nuosėdas ryjančių gyvūnų itin svarbios vandens telkinių dugno nuosėdų ekosistemoms yra vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės (*Oligochaeta*). Nuo šių dugnines nuosėdas biologiškai perdirbančių gyvūnų, kuriais minta kiti plėšrieji gyvūnai, gali labai priklausyti tokių cheminių medžiagų biologinis prieinamumas kitiems organizmams, pvz., bentosiu mintančioms žuvis. Kitaip negu dugno paviršiaus organizmai, podugnyje gyvenančios vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės (pvz., *Lumbriculus variegatus*) įsirausia į dugnines nuosėdas ir minta rydamos po dugno paviršiumi esančias nuosėdų daleles. Taip bandomoji cheminė medžiaga iš tiesų paveikia bandomuosius organizmus visais įmanomais jos įsisavinimo būdais (pvz., per sąlytį su ja ir praryjant ją užterštų dugninių nuosėdų dalelių, tačiau taip pat per dugno porų vandenį ir virš dugno esančio vandens sluoksnį).
2. Pagal šį bandymo metodą siekiama įvertinti ilgalaikį dugninėse nuosėdose esančių cheminių medžiagų poveikį podugnio mažašerėms žieduotosioms kirmėlėms *Lumbriculus variegatus* (Müller). Jis pagrįstas esamais dugninių nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymų protokolais, pvz., (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Šis metodas skirtas taikyti stacionariojo bandymo sąlygomis. Pagal šį bandymo metodą pasirinktas bandomosios cheminės medžiagos poveikio scenarijus yra jos įterpimas į dugnines nuosėdas. Dugnines nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga naudojamos siekiant imituoti ta medžiaga užterštas nuosėdas.
3. Cheminės medžiagos, kurių poveikį dugninėse nuosėdose gyvenantiems organizmams reikia ištirti, paprastai lieka šiame sluoksnyje ilgą laiką. Dugninėse nuosėdose gyvenantys organizmai gali patirti šių medžiagų poveikį keliais būdais. Kiekvieno poveikio būdo santykinė reikšmė ir trukmė, reikalinga bendram toksiniam poveikiui pasiekti, priklauso nuo atitinkamos cheminės medžiagos fizikinių bei cheminių savybių ir nuo jos galutinės baigties gyvūno organizme. Jeigu tai lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos) cheminės medžiagos (pvz., kurių $\log K_{ow} > 5$) arba kovalentinių ryšių su dugninėmis nuosėdomis saistomos cheminės medžiagos, reikšmingą jų poveikį gyvūnai gali patirti prarydami jomis užteršto pašaro. Siekiant nenuvertinti tokių cheminių medžiagų toksiškumo, bandomiesiems organizmams daugintis ir augti reikalingas pašaras dedamas į dugnines nuosėdas prieš dedant bandomąją cheminę medžiagą (11). Šis bandymo metodas aprašytas pakankamai išsamiai, kad būtų galima atlikti bandymą ir kartu atitinkamai keisti bandymo planą, atsižvelgiant į konkrečiose laboratorijose esamas sąlygas ir įvairias bandomųjų cheminių medžiagų savybes.
4. Bandymu pagal šį metodą siekiama nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį bandomųjų organizmų reprodukcijai ir biomasei. Vertinami biologiniai parametrai yra bendras išgyvenusių kirmėlių skaičius ir biomasė (sausosios medžiagos masė) bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje. Šie duomenys išanalizuojami taikant regresijos modelį, siekiant įvertinti, kokiai koncentracijai esant būtų patirtas x % poveikis (pvz., EC₅₀, EC₂₅ ir EC₁₀), arba tikrinant hipotezę pagal statistinius kriterijus, siekiant nustatyti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC).
5. Šio priedo C.27 skyriuje „Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga“ (6) pateikta daug būtinų ir naudingų informacijos apie tai, kaip atlikti bandymus pagal aprašytąjį dugninių nuosėdų toksiškumo bandymo metodą. Taigi, remiantis šiuo dokumentu, buvo parengti pakeitimai, reikalingi toksiškumo *Lumbriculus variegatus* dugninėse nuosėdose bandymams atlikti. Papildomi dokumentai, į kuriuos daromos nuorodos, yra, pvz., ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) ir ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). Be to, svarbūs informacijos šaltiniai rengiant šį dokumentą buvo praktinė patirtis, sukaupta atliekant tarplaboratorinius bandymus pagal šį metodą ((13), tarplaboratorinio bandymo ataskaita), ir literatūros šaltiniuose pateikta informacija.

BŪTINA INFORMACIJA IR GAIRĖS

6. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kaip antai įspėjimus dėl saugos, tinkamas tos medžiagos laikymo sąlygas ir analizės metodus, reikėtų gauti prieš pradedant ją tirti. Gairių dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurių bandymus sunku atlikti dėl jų fizikinių ir cheminių savybių, pateikta (14).

7. Prieš pradėdant bandymą, turėtų būti žinoma tokia informacija apie bandomąją cheminę medžiagą:
 - bendrinis pavadinimas, cheminis (geriausia IUPAC) pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS registro numeris, grynumas;
 - garų slėgis;
 - tirpumas vandenyje.
8. Prieš pradėdant bandymą, naudinga turėti papildomos informacijos apie bandomosios medžiagos:
 - oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą K_{ow} ;
 - organinės anglies / vandens pasiskirstymo koeficientą K_{oc} ;
 - hidrolizę;
 - fotocheminį virsmą vandenyje;
 - biologinį skaidumą;
 - paviršiaus įtempį.
9. Prieš pradėdant bandymą, reikėtų gauti informaciją apie tam tikras naudojamų dugninių nuosėdų savybes (7). Apie tai išsamiau skaitykite 22–25 skirsniuose.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Panašios fiziologinės būklės (synchronizuotos, kaip aprašyta 5 priedėlyje) kirmėlės patiria nuodingųjų medžiagų, kurių tam tikros koncentracijos dedamos į dugninių nuosėdų ir vandens sistemos nuosėdų fazę, poveikį. Bandymo terpėms reikėtų naudoti dirbtines dugnines nuosėdas ir regeneruotą vandenį. Kontroliniai bandiniai yra bandymo indai, į kuriuos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Ruošiant kiekvieno koncentracijos lygio bandinius, bandomoji cheminė medžiaga bendrai dedama į dar nepaskirstytas dugnines nuosėdas, taip siekiant sumažinti kiekvieno koncentracijos lygio kartotinių bandinių kintamumą, o tada bandomieji organizmai įleidžiami į bandymo indus, kuriuose nustatyta reikiama dugninių nuosėdų ir vandens koncentracijų pusiausvyra (žr. 29 skirsnį). Šiose dugninių nuosėdų ir vandens sistemose bandomieji gyvūnai yra 28 paras veikiami bandomosios cheminės medžiagos. Kadangi dirbtinėse dugninėse nuosėdose mitybinių medžiagų yra nedaug, reikėtų į jas įdėti papildomo pašaro (žr. 22–23 skirsnius ir 4 priedėlį), siekiant užtikrinti, kad kirmėlės kontroliuojamomis sąlygomis augtų ir daugintųsi. Taip užtikrinama, kad bandomieji gyvūnai bandomosios medžiagos poveikį patirtų tiek per vandenį ir dugnines nuosėdas, tiek per pašarą.
11. Pageidautina šio pobūdžio tyrimo vertinamoji baigtis yra reprodukcijos arba, atitinkamai, biomasės EC_x (pvz., EC_{50} , EC_{25} ir EC_{10} – poveikio koncentracija, kuriai esant poveikį patiria x % bandomųjų organizmų), palyginti su kontroline grupe. Tačiau reikia pažymėti, jog turint omenyje didelį mažų EC_x verčių (pvz., EC_{10} , EC_{25}) neapibrėžtumą su itin aukštomis 95 % pasiklovimo ribomis (pvz., (15)) ir statistinį patikimumą, apskaičiuotą tikrinant hipotezę, EC_{50} laikoma patikimiausia vertinamąja baigtimi. Taip pat galima apskaičiuoti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) biomasei ir reprodukcijai, jeigu bandymo planas ir duomenys tinka šiems skaičiavimams (žr. 34–38 skirsnius). Bandymo planas priklausys nuo tyrimo tikslo – gauti EC_x arba NOEC.

ETALONINIŲ MEDŽIAGŲ BANDYMAI

12. Naudojant kontrolinius organizmus, turėtų būti pakankamai patikimai įrodytas laboratorijos gebėjimas atlikti šį bandymą ir, jeigu yra ankstesnių duomenų, bandymo pakartojamumas. Be to, galima reguliariais intervalais atlikti etaloninius toksiškumo bandymus, naudojant etaloninę nuodingąją medžiagą, siekiant įvertinti bandomųjų organizmų jautrį. Bandomųjų gyvūnų jautrį ir būklę tinkamai nustatyti galima tik atliekant 96 val. trukmės etaloninės medžiagos toksiškumo vandenyje bandymus (4), (7). Informacijos apie pentachlorfenolio (PCP) toksiškumą, nustatytą išsamiais bandymais (per kuriuos 28 paras tirtas į dugnines nuosėdas įterptos bandomosios medžiagos poveikis), pateikta 6 priedėlyje ir pagal šį bandymo metodą atlikto tarplaboratorinio bandymo ataskaitoje (13). Ūmus pentachlorfenolio toksinis poveikis, patiriamas tik vandenyje, aprašytas literatūroje, pvz., (16). Šia informacija galima remtis lyginant bandomųjų organizmų jautrį per etaloninius bandymus, naudojant etaloninę nuodingąją medžiagą pentachlorfenolį. Bandymams su *L. variegatus* rekomenduojama naudoti etalonines nuodingąsias medžiagas kalcio chloridą (KCl) arba vario sulfatą ($CuSO_4$) (4), (7). Kol kas sunku nustatyti bandymo kokybės kriterijus, remiantis KCl toksiškumo duomenimis, nes literatūroje trūksta duomenų apie *L. variegatus*. Informacijos apie vario toksiškumą *L. variegatus* galima rasti literatūroje (17)–(21).

BANDYMO TINKAMUMAS

13. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu tenkinami šie reikalavimai:

- per tarplaboratorinį bandymą (13) nustatyta, kad naudojant *Lumbriculus variegatus*, vidutinis gyvų kirmėlių skaičius kiekviename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje iki bandomosios medžiagos poveikio laikotarpio pabaigos turėtų padidėti bent 1,8 karto, palyginti su poveikio laikotarpio pradžioje kiekviename kartotiniame bandinyje buvusių kirmėlių skaičiumi;
- paviršinio vandens pH per visą bandymą turėtų būti 6–9;
- deguonies koncentracija paviršiniame vandenyje bandymo metu, esant bandymo temperatūrai, turėtų būti ne mažesnė negu 30 % oro soties vertės.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo sistema

14. Rekomenduojama naudoti stacionarias sistemas, nekeičiant paviršinio vandens sluoksnio. Jeigu dugninių nuosėdų ir vandens santykis (žr. 15 skirsnį) yra tinkamas, paprastai pakanka nestipriai aeruoti vandenį, kad jo kokybė būtų tinkama bandomiesiems organizmams (pvz., būtų palaikomas optimalus ištirpusio deguonies lygis ir mažinamas šalinimo produktų kaupimasis). Pusiaus stacionarias arba dinamines sistemas, kuriose paviršinis vanduo kartkartėmis arba nuolat atnaujinamas, reikėtų naudoti tik išimtiniais atvejais, nes manoma, kad reguliarius paviršinio vandens keitimas veikia cheminę pusiausvyrą (pvz., iš bandymo sistemos išplaunama bandomoji cheminė medžiaga).

Bandymo indai ir aparatūra

15. Bandomosios medžiagos poveikis turėtų būti tiriamas naudojant, pvz., 250 ml tūrio (6 cm skersmens) chemines stiklines (pagamintas iš stiklo). Galima naudoti ir kitus tinkamus stiklinius indus, jeigu juose palaikomi tinkamo storio paviršinio vandens ir dugninių nuosėdų sluoksniai. Kiekviename inde turėtų būti maždaug 1,5–3 cm storio paruoštų dugninių nuosėdų sluoksnis. Dugninių nuosėdų ir paviršinio vandens sluoksnių gylio santykis turėtų būti 1:4. Indai turėtų būti tinkamos talpos, turint omenyje jų įkrovą, t. y. dugninių nuosėdų svorio vienetui tenkantį bandomųjų kirmėlių skaičių (taip pat žr. 39 skirsnį).
16. Bandymo indai ir kita su bandomąja chemine medžiaga besiliečianti aparatūra turėtų būti pagaminta tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Reikėtų stengtis, kad visos naudojamos įrangos dalys būtų be medžiagų, galinčių tirpdyti ar sugerti bandomąsias chemines medžiagas arba išskirti kitas chemines medžiagas ir pakenkti bandomiesiems gyvūnams. Bet kokia su bandymo terpėmis besiliečianti įranga turėtų būti pagaminta iš politetrafluoretileno (PTFE), nerūdijančio plieno ir (arba) stiklo. Organinėms cheminėms medžiagoms, kurios, kaip žinoma, yra linkusios įsigerti į stiklo paviršių, gali reikėti naudoti silanizuoto stiklo indus. Šiais atvejais panaudotą įrangą reikia pašalinti.

Bandomoji rūšis

17. Šio pobūdžio tyrimui naudojama bandomųjų gyvūnų rūšis yra gėlavandenės mažašerės žieduotosios kirmėlės *Lumbriculus variegatus* (Müller). Šios rūšies kirmėlės pakenčia labai įvairių rūšių dugnines nuosėdas ir plačiai naudojamos dugninių nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymams [pvz., (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti bandomųjų gyvūnų kilmę, patikimai identifikuoti rūšį (pvz., (36)) ir aprašyti bandomųjų kultūrų auginimo sąlygas. Rūšies identifikuoti prieš kiekvieną bandymą nebūtina, jeigu organizmai bandymui imami iš toje pačioje laboratorijoje auginamos kultūros.

Bandomųjų organizmų kultūrų auginimas

18. Siekiant turėti pakankamai kirmėlių dugninių nuosėdų toksiškumo bandymams, naudinga laboratorijoje nuolat turėti auginamų ir veisiamų kirmėlių kultūrą. 5 priedėlyje pateikta gairių, kokiais metodais *Lumbriculus variegatus* kultūros gali būti auginamos laboratorijose, ir nurodyti pradinių kultūrų tiekimo šaltiniai. Išsamios informacijos apie šios rūšies kultūrų auginimą pateikta literatūroje (3), (7), (27).
19. Siekiant užtikrinti, kad bandymams būtų naudojami tos pačios rūšies gyvūnai, labai patartina veisti vienaarūšes kultūras. Reikia užtikrinti, kad auginamos kultūros ir ypač bandymams naudojamos kirmėlės būtų be pastebimų ligų ir anomalijų.

Vanduo

20. Kaip paviršinį vandenį atliekant bandymus rekomenduojama naudoti regeneruotą vandenį pagal šio priedo C.1 skyrių (37); jį taip pat galima naudoti laboratorijoje auginamoms kirmėlių kultūroms (kaip jį paruošti, skaitykite 2 priedėlyje). Kai reikia, galima naudoti gamtinį vandenį. Pasirinktas vanduo turi būti tokios kokybės, kad bandomosios rūšies gyvūnai per aklimatizacijos ir bandymo laikotarpius jame augtų ir daugintųsi be išvaizdos ar elgsenos pakitimų. Įrodyta, kad *Lumbriculus variegatus* gali gyventi, augti ir daugintis tokiaame vandenyje (30), kurį naudojant užtikrinamos itin standartizuotos bandymo ir kultūrų auginimo sąlygos. Jeigu naudojamas regeneruotas vanduo, reikėtų nurodyti jo sudėtį ir prieš naudojant vandenį iširti, nustatant bent jo pH, deguonies kiekį ir kietumą (išreiškiamą CaCO_3 kiekiu, mg/l). Naudingos informacijos galima gauti išanalizavus numatomame naudoti vandenyje esančius mikroteršalus (žr. pvz., 3 priedėlį).
21. Paviršinio vandens pH turėtų būti nuo 6,0 iki 9,0 (žr. 13 skirsnį). Jeigu numatoma, kad per bandymą susidarys daugiau amoniako, patartina palaikyti 6,0–8,0 pH, o atliekant, pvz., nestiprių organinių rūgščių bandymus, patartina patikslinti pH, į bandymui naudojamą vandenį įpilant buferinio tirpalo, kaip aprašyta literatūroje, pvz., (16). Bendrasis bandymui naudojamo vandens kietumas turėtų būti toks, kad viename gamtinio vandens litre būtų 90–300 mg CaCO_3 . 3 priedėlyje apibendrinti papildomi kriterijai, taikomi skiedimui tinkamam vandeniui pagal EBPO gaires Nr. 210 (38).

Duginės nuosėdos

22. Kadangi neužterštų natūralių dugninių nuosėdų iš tam tikro šaltinio gali būti įmanoma gauti ne visus metus ir kadangi tose nuosėdose esantys vietiniai organizmai bei mikroteršalai gali daryti įtaką bandymui, patartina naudoti paruoštas nuosėdas (taip pat vadinamas perdirbtomis, dirbtinėmis arba sintetinėmis nuosėdomis). Naudojant paruoštas nuosėdas, mažiau kinta bandymo sąlygos ir nuosėdose neįsiveisia vietinės faunos. Toliau aprašytos dugninės nuosėdos, ruošiamos dirbtinių nuosėdų pagrindu pagal literatūros šaltinius (6), (39), (40). Jas rekomenduojama naudoti šio pobūdžio bandymams ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- a) 4–5 % kiminių durpių (sausosios medžiagos masės); durpes svarbu naudoti miltelių pavidalu, vidutinio suirimo lygio, smulkiai sumaltas (dalelių dydis $\leq 0,5$ mm) ir tik ore išdžiovintas.
 - b) 20 ± 1 % kaolino molio (sausosios medžiagos masės) (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);
 - c) 75–76 % kvarcinio smėlio (sausosios medžiagos masės) (naudojamas smulkus smėlis, kurio dalelių dydis ≤ 2 mm, tačiau daugiau kaip 50 % dalelių jame turėtų būti 50–200 μm dydžio).
 - d) Kartu su dugninių nuosėdų sausosiomis sudedamosiomis dalimis įpilama dejonizuoto vandens (30–50 % nuosėdų sausosios medžiagos masės).
 - e) Galutinio nuosėdų mišinio pH vertė patikslinama įdedant chemiškai gryno kalcio karbonato (CaCO_3).
 - f) Bendrosios organinės anglies kiekis galutiniame mišinyje turėtų būti 2 % ($\pm 0,5$ %) nuosėdų sausosios medžiagos masės; šis kiekis turėtų būti tikslinamas įdedant tinkamus durpių ir smėlio kiekius pagal a–c punktus.
 - g) Kartu su sausosiomis nuosėdų sudedamosiomis dalimis įdedama pašaro, pvz., maltų didžiosios dilgėlės lapų (*Urtica* sp., žaliava turi būti tinkama vartoti žmonėms pagal farmacijos standartus) arba maltų *Urtica* sp. lapų, sumaišytų su alfa celiulioze santykiu 1:1; dedamo pašaro kiekis turi būti 0,4–0,5 % nuosėdų sausosios medžiagos masės; daugiau apie tai skaitykite 4 priedėlyje.
23. Reikėtų žinoti, iš kokio šaltinio gautos durpės, kaolino molis, pašarinės medžiagos ir smėlis. Kartu su tuo, kas nurodyta g punkte, šio priedo C.27 skyriuje (6) išvardyti augaliniai pakaitalai, tinkami naudoti kaip pašaro šaltinis: džiovinti baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapai, baltieji dobilai (*Trifolium repens*), daržiniai špinatai (*Spinacia oleracea*) arba javų želmenys.
24. Pasirinkto pašaro turėtų būti dedama į dugnines nuosėdas prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą arba kartu su ja. Reikėtų rinktis tokią pašarą, kad būtų galima užtikrinti bent pakankamą reprodukcijos lygį kontroliuose bandiniuose. Naudingos informacijos galima gauti išanalizavus numatomose naudoti dirbtinėse

nuosėdose ar jų sudedamosiose dalyse esančius mikroteršalus. Sintetinių nuosėdų ruošimo pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Taip pat galima sumaišyti sausas sudedamąsias dugninių nuosėdų dalis, jei galima įrodyti, kad užpylus paviršinio vandens sluoksnį nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskiria (pvz., durpių dalelės neišplaukia į paviršių) ir kad durpės arba nuosėdos yra pakankamai kondicionuotos (taip pat žr. 25 skirsnį ir 4 priedėlį). Apibūdinant dirbtines nuosėdas, reikėtų nurodyti bent jų sudedamųjų dalių kilmę, granulimetrinę sudėtį (procentines smėlio, dumblo ir molio dalis), bendrosios organinės anglies kiekį, vandens kiekį ir pH. Oksidacijos-redukcijos potencialo matuoti nebūtina.

25. Kai reikia, pvz., konkretiems bandymo tikslams pasiekti, bandymui ir (arba) kultūrų auginimui galima naudoti natūralias dugnines nuosėdas, paimtas iš neužterštų vietų (3). Tačiau jeigu naudojamos natūralios nuosėdos, jas apibūdinant reikėtų nurodyti bent jų kilmę (surinkimo vietą), porų vandens pH ir amoniako kiekį, bendrosios organinės anglies ir azoto kiekius, granulimetrinę sudėtį (procentines smėlio, dumblo ir molio dalis) ir vandens procentinį kiekį (7). Jose neturėtų būti jokių teršalų ir kitų organizmų, galinčių konkuruoti su bandomaisiais organizmais arba jais maitintis. Oksidacijos-redukcijos potencialo ir katijonų mainų talpos matuoti nebūtina. Taip pat rekomenduojama, prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą, natūralias dugnines nuosėdas septynias paras kondicionuoti tokiomis pačiomis, kaip būsimo bandymo, sąlygomis. Šio kondicionavimo periodo pabaigoje paviršinį vandenį reikėtų nupilti ir pašalinti.
26. Dugnines nuosėdas turi būti tokios kokybės, kad kontroliniai organizmai per visą bandomosios medžiagos poveikio laikotarpį jose išgyventų ir dauginųsi be išvaizdos ar elgsenos pakitimų. Kontrolinės grupės kirmėlės turėtų įsirausti į nuosėdas ir maitintis jas rydamos. Kontrolinių organizmų reprodukcija turėtų bent atitikti 13 skirsnyje nurodytą tinkamumo kriterijų. Reikėtų užrašyti, ar nuosėdų paviršiuje yra, ar nėra išmatų kruopelių – iš to galima spręsti, ar kirmėlės ryja nuosėdas, ir tai gali padėti aiškinti su bandomosios medžiagos poveikio būdais susijusius bandymo rezultatus. Papildomos informacijos apie nuosėdų rijimą galima gauti taikant literatūros šaltiniuose (24), (25), (44), (45) aprašytus metodus, pagal kuriuos apibūdinamas bandomųjų organizmų nuosėdų rijimas arba dalelių atranka.
27. Natūralių nuosėdų apdorojimo, prieš naudojant jas laboratorijoje, procedūros aprašytos literatūros šaltiniuose (3), (7), (12). Per *Lumbriculus* bandymą rekomenduojamų naudoti dirbtinių nuosėdų ruošimas ir laikymas aprašyti 4 priedėlyje.

Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas

28. Bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į dugnines nuosėdas. Kadangi dauguma bandomųjų cheminių medžiagų yra mažai tirpios vandenyje, reikėtų paruošti jų pradinį tirpalą, ištirpinant jas kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., acetono, n-heksano, cikloheksano) kiekyje. Pradinį tirpalą reikėtų atskiesti tuo pačiu tirpikliu, kuris naudojamas ruošiant bandomuosius tirpalus. Renkantis tinkamą soliubilizavimo priemonę, pagrindiniai kriterijai turėtų būti tirpiklio toksiškumas bei lakumas ir bandomosios cheminės medžiagos tirpumas pasirinktame tirpiklyje. Kiekvienam koncentracijos lygiui turėtų būti naudojamas vienodas atitinkamo tirpalo kiekis. Ruošiant kiekvieno koncentracijos lygio bandinius, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bendrai dedama į dar nepaskirstytas dugnines nuosėdas, taip siekiant sumažinti kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos lygio kartotinių bandinių kintamumą. Tada kiekvienas bandomasis tirpalas sumaišomas su kvarciniu smėliu, kaip aprašyta 22 skirsnyje (pvz., po 10 g kvarcinio smėlio į kiekvieną bandymo indą). Nustatyta, jog vienam kvarcinio smėlio gramui pakanka 0,20–0,25 ml tirpalo, kad smėlis visiškai permirkėtų. Vėliau tirpiklis turi būti išgarintas iki sausos masės. Kad kuo mažiau bandomosios cheminės medžiagos būtų prarasta dėl garavimo kartu su tirpikliu (pvz., priklausomai nuo tos cheminės medžiagos garų slėgio), ja padengtą išdžiovintą smėlį reikėtų naudoti iškart. Sausas smėlis sumaišomas su tinkamu paruoštų atitinkamo koncentracijos lygio nuosėdų kiekiu. Ruošiant dugnines nuosėdas reikia atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišinyje esantį smėlio kiekį (t. y. ruošiant nuosėdas reikėtų atitinkamai mažiau dėti smėlio). Svarbiausias šios procedūros pranašumas yra tai, kad į dugnines nuosėdas visai nepatenka tirpiklio (7). Kitu atveju, pvz., naudojant iš lauko paimtas dugnines nuosėdas, bandomąją cheminę medžiagą galima dėti įterpiant į išdžiovintų ir smulkiai sumaltų nuosėdų dalį, kaip pirmiau nurodyta kalbant apie kvarcinį smėlį, arba įmaišant bandomąją medžiagą į šlapias dugnines nuosėdas ir bet kokią naudotą soliubilizavimo priemonę vėliau išgarinant. Reikėtų stengtis užtikrinti, kad į dugnines nuosėdas dedama bandomoji cheminė medžiaga būtų jose kruopščiai ir tolygiai paskirstyta. Jei reikia, siekiant patikrinti tikslesnes medžiagos koncentracijas nuosėdose ir nustatyti jų vienalytiškumą, galima atlikti dalinių ėminių analizę. Taip pat, siekiant patvirtinti tikslesnes koncentracijas nuosėdose, gali būti naudinga išanalizuoti dalinius bandymo tirpalų ėminius. Kadangi kvarciniam smėliui padengti bandomąją chemine medžiaga naudojamas tirpiklis, reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinį bandinį, kuris paruošiamas naudojant tokį patį tirpiklio kiekį, koks dėtas į bandomąją medžiagą apdorotas nuosėdas. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti, pagal kokią metodą bandomoji medžiaga įterpta į nuosėdas, ir dėl kokių priežasčių pasirinkta ta, o ne kita iš pirmiau aprašytų jos įterpimo procedūrų. Bandomosios cheminės medžiagos įterpimo metodą galima pritaikyti atsižvelgiant į tos medžiagos fizikines ir chemines savybes, pvz., siekiant išvengti jos nuostolių dėl garavimo ją įterpiant arba reguliuojant pusiausvyrą. Papildomų gairių dėl bandomųjų cheminių medžiagų įterpimo procedūrų pateikta *Environment Canada* (1995) (46).

29. Paruoštas nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga paskirsčius į kartotinių bandinių indus ir užpylus bandymui tinkamu vandeniu, patartina palaukti, kol dalis bandomosios cheminės medžiagos iš dugno nuosėdų išsiskirs į vandeninę fazę (žr., pvz., (3), (7), (9)). Pageidautina, kad tai vyktų bandymo temperatūros ir aeracijos sąlygomis. Tinkama pusiausvyros nusistovėjimo trukmė priklauso nuo naudojamų nuosėdų ir cheminių medžiagų – tai gali trukti kelias valandas ar dienas arba, retais atvejais, ilgiausiai kelias (4–5) savaites (žr., pvz., (27), (47)). Atliekant šį bandymą nelaukiama, kol visiškai nusistovės pusiausvyra, tačiau patartina pusiausvyros nusistovėjimui skirti laiko tarpą nuo 48 valandų iki 7 parų. Taip sutrumpinamas bandomosios cheminės medžiagos skaidymo laikas. Priklausomai nuo tyrimo tikslo, pvz., kai reikia imituoti gamtines aplinkos sąlygas, nuosėdas su įterpta chemine medžiaga galima palikti iki tol, kol nusistovės pusiausvyra, ar brandinti dar ilgesnį laiką.
30. Šiam pusiausvyros nusistovėjimo periodui pasibaigus, reikėtų paimti bent paviršinio vandens ir jungtinius dugninių nuosėdų (bent pačios didžiausios ir vienos mažesnės koncentracijos) ėminius bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos analizei. Po šių bandomosios cheminės medžiagos analizinių nustatymų turėtų būti įmanoma apskaičiuoti masės balansą ir išreikšti rezultatus remiantis išmatuotomis pradinėmis koncentracijomis. Apskritai, imant ėminius, dugninių nuosėdų ir vandens sistema suardoma arba sunaikinama, todėl tų pačių kartotinių bandinių paprastai neįmanoma naudoti nuosėdų ir kirmėlių ėminiams tirti. Reikia paruošti papildomus analizei skirtus bandinius tinkamų matmenų induose, kurie būtų tvarkomi taip pat, kaip ir kiti bandiniai (į juos taip pat dedama bandomųjų organizmų), tačiau nenaudojami biologiniams stebėjimams. Reikėtų rinktis tokių matmenų indus, kad iš jų būtų galima imti pagal taikomą analizės metodą reikiamo dydžio ėminius. Apie ėminių ėmimą išsamiau rašoma 53 skirsnyje.

BANDYMO EIGA

Išankstinis bandymas

31. Jeigu nėra informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą *Lumbriculus variegatus*, gali būti naudinga atlikti išankstinį bandymą, siekiant parinkti nustatomajam bandymui tinkamą koncentracijų intervalą ir pagerinti nustatomojo bandymo sąlygas. Šiuo tikslu sudaroma labai besiskiriančių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių eilutė. Kirmėlės yra tam tikrą laiko tarpą (pvz., 28 paras, kaip ir per nustatomąjį bandymą) veikiamos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, taigi galima įvertinti bandymui tinkamas koncentracijas; kartotinių bandinių paruošti nereikia. Per išankstinį bandymą reikėtų stebėti ir aprašyti kirmėlių elgseną, pvz., jeigu pastebima, kad jos vengia nuosėdų (taip gali būti dėl bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) pačių nuosėdų). Per išankstinį bandymą nereikėtų rinktis bandomosios medžiagos koncentracijų, viršijančių 1 000 mg vienam sausosios nuosėdų medžiagos masės kilogramui.

Nustatomasis bandymas

32. Per nustatomąjį bandymą reikėtų naudoti mažiausiai penkias koncentracijos vertes, kurios pasirenkamos, pvz., remiantis išankstinio intervalo nustatymo bandymo rezultatu (31 skirsnis) ir 35, 36, 37 bei 38 skirsniuose aprašyta tvarka.
33. Kartu su bandomąja grupe paruošiama kontrolinė grupė (dėl kartotinių bandinių žr. 36, 37 ir 38 skirsnius) naudojant visas tas pačias sudedamąsias dalis, tačiau nededant bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant kokią nors soliubilizuojančią medžiagą, pastaroji medžiaga neturėtų reikšmingai paveikti bandomųjų organizmų (tokį poveikį parodytų papildomas kontrolinis bandinys, į kurį dėta tik tirpiklio).

Bandymo planas

34. Sudarant bandymo planą, parenkamas bandomosios medžiagos koncentracijų skaičius ir intervalas, kiekvienos koncentracijos bandinių indų skaičius ir kirmėlių skaičius kiekviename inde. Kokia tvarka reikia įvertinti EC_x arba NOEC ir atlikti ribų nustatymo bandymą, rašoma 35, 36, 37 ir 38 skirsniuose.
35. Efektyviosios koncentracijos vertės (pvz., EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) ir koncentracijų, kurioms esant patiriamas reikšmingas bandomosios cheminės medžiagos poveikis, intervalas turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą. Nereikėtų ekstrapoliuoti iki kur kas mažesnių negu mažiausioji poveikį bandomiesiems organizmams daranti koncentracija arba kur kas didesnių nei didžiausia bandomoji koncentracija verčių. Jeigu išimtiniais atvejais atliekama tokia ekstrapoliacija, būtina tai išsamiai paaiškinti ataskaitoje.

36. Jeigu reikia įvertinti EC_{50} , per bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes ir paruošti bent po tris kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius; kontrolinėje grupėje arba tirpiklio (jeigu naudojamas) kontrolinėje grupėje patartina paruošti šešis kartotinius bandinius, kad būtų galima tiksliau įvertinti kontrolinės grupės kintamumą. Bet koku atveju patartina bandymui pasirinkti pakankamą koncentracijos verčių skaičių, kad būtų atliktas patikimas modelio įvertinimas. Koncentracijos turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2 (išimtį galima daryti tais atvejais, kai koncentracijos ir atsako kreivės nuolydis yra nedidelis). Kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių galima sumažinti, jeigu padidinamas 5–95 % atsaką sukeliančių bandymo koncentracijos verčių skaičius. Didinant kartotinių bandinių skaičių arba siaurinant bandymo koncentracijų intervalus, paprastai per bandymą gaunami siauresni pasikliautinieji intervalai.
37. Jeigu reikia įvertinti LOEC (NOEC), per bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes ir paruošti bent po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius (kontrolinėje grupėje arba tirpiklio (jeigu naudojamas) kontrolinėje grupėje patartina paruošti šešis kartotinius bandinius, kad būtų galima tiksliau įvertinti kontrolinės grupės kintamumą). Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį bandymo metodą.
38. Ribų nustatymo bandymą (naudojant vieną bandomosios medžiagos koncentraciją ir kontrolinius bandinius) galima atlikti tada, kai nesitikima jokio poveikio, koncentracijai esant iki 1 000 mg vienam sausosios nuosėdų medžiagos masės kilogramui (pvz., kaip nustatyta per išankstinį intervalo nustatymo bandymą), arba kai reikiamai NOEC vertei patvirtinti pakanka atlikti vienos bandomosios medžiagos koncentracijos bandymą. Pastaruoju atveju ribinės koncentracijos pasirinkimą reikėtų išsamiai pagrįsti bandymo ataskaitoje. Atliekant ribų nustatymo bandymą, tikslas yra pasirinkti pakankamai didelę bandomosios medžiagos koncentraciją, kad už sprendimų priėmimą atsakingi asmenys galėtų išskirti galimą toksių bandomosios cheminės medžiagos poveikį ir būtų nustatyta ribinė jos koncentracijos vertė, kurios jokiais būdais negalima viršyti. Rekomenduojama koncentracija per ribų nustatymo bandymą – 1 000 mg bandomosios medžiagos vienam (sausosios medžiagos masės) kilogramui. Paprastai būtina paruošti ne mažiau kaip šešis kartotinius tiek bandomųjų grupių, tiek kontrolinius bandinius. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį bandymo metodą.

Bandomosios medžiagos poveikio sąlygos

Bandomieji organizmai

39. Atliekant bandymą kiekviename kartotiniame bandinyje, naudojamame biologiniams parametrams nustatyti, turi būti bent 10 kirmėlių. Šis kirmėlių skaičius atitinka maždaug 50–100 mg šviežios biomasės. Jei daroma prielaida, kad sausosios medžiagos joje yra 17,1 % (48), tai reiškia, kad kiekviename inde yra apie 9–17 mg sausos biomasės. JAV aplinkos apsaugos agentūra (2000) (7) rekomenduoja, kad bandinių įkrova (sausos biomasės ir bendrosios organinės anglies santykis) neviršytų 1:50. Naudojant 22 skirsnyje aprašytas paruoštas nuosėdas, tokį santykį atitinka maždaug 43 g nuosėdų (sausosios medžiagos masės) ir 10 kirmėlių, bendrosios organinės anglies kiekiui esant 2,0 % sausų nuosėdų. Tais atvejais, kai į indą dedama daugiau kaip 10 kirmėlių, nuosėdų ir paviršinio vandens kiekius reikėtų atitinkamai patikslinti.
40. Visos bandymui naudojamos kirmėlės turėtų būti iš to paties šaltinio gauti, panašios fiziologinės būklės gyvūnai (žr. 5 priedėlį). Bandymui reikėtų atrinkti panašaus dydžio kirmėles (žr. 39 dalį). Rekomenduojama prieš bandymą pasverti dalinį kirmėlių, paimtų iš turimos kultūros partijos ar atsargų, ėminį, siekiant įvertinti jų masės vidurkį.
41. Bandymui atrinktos kirmėlės išimamos iš auginamos kultūros indo (apie tai išsamiau skaitykite 5 priedėlyje). Dideli (suaugę) gyvūnai, neturintys neseno dalijimosi požymių, perkeliama į stiklinius indelius (pvz., Petri lėkšteles) su švariu vandeniu. Tada jie sinchronizuojami, kaip aprašyta 5 priedėlyje. Po 10–14 parų regeneracijos laikotarpio reikėtų naudoti bandymui sveikas nepažeistas panašaus dydžio kirmėles, kurios, reaguodamos į nestiprų mechaninį dirgiklį, aktyviai plaukia arba šliaužia. Jeigu bandymo sąlygos (pvz., temperatūra, apšvietimo režimas ir paviršinis vanduo) skiriasi nuo kultūros auginimo sąlygų, turėtų pakakti, pvz., 24 val. trukmės aklimatizacijos tarpsnio esant bandymo temperatūrai, apšvietimo režimui ir naudojant tą patį paviršinį vandenį, kaip ir per bandymą, kad kirmėlės prisitaikytų prie bandymo sąlygų. Adaptuotos mažasrės žieduotosios kirmėlės turėtų būti atsitiktine tvarka paskirstytos į bandymo indus.

Šėrimas

42. Kadangi pašaro į nuosėdas dedama prieš dedant bandomąją cheminę medžiagą (arba kartu su ja), bandymo metu kirmėlės papildomai nešeriamos.

Šviesa ir temperatūra

43. Įprasta apšvietimo trukmė kultūros auginimo ir bandymo metu yra 16 valandų per parą (3), (7). Šviesa turėtų būti ne per daug stipri (pvz., 100–500 lx), imituojant natūralias sąlygas dugninių nuosėdų paviršiuje; šviesos stipris matuojamas bent kartą per bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį. Per visą bandymą turėtų būti palaikoma pastovi 20 ± 2 °C temperatūra. Pasirinktą matavimo dieną bandymo indų temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1 °C. Bandymo indus reikėtų atsitiktine tvarka sudėti į bandymo inkubatorių ar bandymo vietą siekiant, pvz., sumažinti reprodukcijos skirtumą, kuris gali atsirasti dėl indų padėties.

Aeravimas

44. Paviršinis vanduo bandymo induose turėtų būti nestipriai aeruojamas (pvz., pučiant 2–4 oro burbuliukus per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm atstumu iki dugninių nuosėdų paviršiaus, kad nuosėdos būtų kuo mažiau judinamos. Reikėtų stebėti, kad vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 30 % oro soties vertės. Oro tiekimas turėtų būti kontroliuojamas ir, jei reikia, patikslinamas bent kartą per dieną darbo dienomis.

Vandens kokybės matavimai

45. Turėtų būti matuojami šie paviršinio vandens kokybės parametrai:

Temperatūra	Matuojama bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje; jeigu įmanoma, galima papildomai, pvz., kas valandą, užrašyti aplinkos terpės (aplinkos oro ar vandens vonelės) temperatūrą.
Ištirpusio deguonies kiekis	Matuojamas bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l ir oro soties vertės proc.
Oro tiekimas	Turėtų būti tikrinamas bent kartą per dieną darbo dienomis ir, jei reikia, patikslinamas.
pH	Matuojamas bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje.
Bendrasis vandens kietumas	Matuojamas bent viename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje ir viename didžiausios koncentracijos bandymo inde bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje; išreiškiamas mg/l CaCO_3 .
Bendrasis amoniako kiekis	Matuojamas bent viename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje ir viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir vėliau 3 kartus per savaitę; išreiškiamas mg/l NH_4^+ ar NH_3 , arba bendru amoniakinio azoto kiekiu.

Jeigu, matuojant vandens kokybės parametrus, reikia paimti iš indų nemažus vandens ėminius, gali būti patartina paruošti atskirus bandinių indus vandens kokybei matuoti, kad bandymo induose nepakistų vandens ir nuosėdų tūrio santykis.

Biologiniai stebėjimai

46. Bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu reikėtų stebėti bandymo indus, siekiant iš akies įvertinti bet kokius kirmėlių elgsenos pokyčius (pvz., nuosėdų vengimą, nuosėdų paviršiuje matomas išmatų kruopeles), lyginant su kontrolinės grupės kirmėlėmis. Stebėjimų duomenis reikėtų užrašyti.

47. Bandymo pabaigoje patikrinamas kiekvienas kartotinis bandinys (papildomų cheminei analizei skirtų bandinių indų galima netikrinti). Reikėtų tinkamu būdu išrinkti visas kirmėles iš bandymo indo, stengiantis jų nesužaloti. Vienas galimas būdas yra kirmėlių išsijojimas iš nuosėdų. Tam galima naudoti tinkamo dydžio akučių sietą iš nerūdijančio plieno. Didžioji dalis paviršinio vandens atsargiai nupilama, likusios nuosėdos ir vanduo suplakami, kad susidrumstų, ir tada drumzles galima perkošti per sietą. Naudojant 500 µm dydžio akučių sietą, dauguma nuosėdų dalelių per jį prasiskverbia labai greitai, tačiau perkošti reikėtų sparčiai, kad kirmėlės neišliaužtų į sieto akutes ar per jas neišlįstų. Naudojant 250 µm dydžio akučių sietą, kirmėlės negalėtų išliaužti į akutes ar per jas išlįsti, tačiau tokiu atveju reikėtų stengtis, kad sietė liktų kuo mažiau nuosėdų dalelių. Perkoštas drumzles iš kiekvieno kartotinio bandinio indo galima perkošti per sietą dar kartą, kad tikrai būtų surinktos visos kirmėlės. Kitas būdas yra sušildyti nuosėdas, pastačius bandymo indus į 50–60 °C temperatūros vandens vonelę; taip kirmėlės iššliaužia iš nuosėdų ir jas galima surinkti nuo nuosėdų paviršiaus naudojant plačiaangę grūdinto stiklo pipetę. Dar vienas alternatyvus būdas yra suplakti nuosėdų drumzles ir jas išpilti į negilų tinkamo dydžio padėklą. Iš šio seklaus drumzlių sluoksnio kirmėles galima išrinkti plienine adata arba laikrodininko pincetu (naudojant jį kaip šakutę, o ne kaip chirurgines žnyples, stengiantis nesužeisti kirmėlių) ir įdėti į švarų vandenį. Iš nuosėdų drumzlių išimtos kirmėlės nuplaunamos bandymui naudotos terpės skysčiu ir suskaičiuojamos.
48. Bet kuriuo būdu išrenkant kirmėles, reikėtų įsitikinti, kad laboratorijos darbuotojai geba iš visų nuosėdų išrinkti vidutiniškai bent 90 % jose buvusių organizmų. Pavyzdžiui, tam tikrą bandomųjų organizmų kiekį galima įdėti į kontrolę ar bandymui naudojamas nuosėdas ir po 1 val. nustatyti, kiek jų pavyksta išimti (7).
49. Reikėtų užrašyti ir įvertinti bendrą gyvų ir negyvų individų kiekviename kartotiniame bandinyje skaičių. Negyvomis laikomos kirmėlės, kurios:
- a) nereaguoja į nestiprų mechaninį dirgiklį;
 - b) turi irimo požymių (kartu su a punktu);
 - c) yra dingusios.
- Be to, gyvas kirmėles galima suskirstyti į tris grupes:
- a) didelės (suaugusios) sveikos kirmėlės be regeneruotų kūno dalių;
 - b) suaugusios kirmėlės, turinčios regeneruotų, šviesesnės spalvos kūno dalių (pvz., naują užpakalinę dalį, naują priekinę dalį arba naujas užpakalinę ir priekinę dalis);
 - c) kirmėlės, kurioms trūksta kai kurių kūno dalių (pvz., neseniai pasidalijusios kirmėlės, kurių trūkstamos kūno dalys dar neataugusios).
- Šie papildomi stebėjimai nėra privalomi, tačiau gali būti naudingi papildomai aiškinant biologinius rezultatus (pvz., jeigu daug kirmėlių priskiriama c grupei, tai gali reikšti, kad atitinkamas poveikis pavėlino kirmėlių reprodukcijos arba regeneracijos procesą. Taip pat jeigu pastebima bandomosios ir kontrolinės grupių kirmėlių išvaizdos skirtumų (pvz., apvalkalo įtrūkių, pabrinkusių kūno dalių), reikėtų juos aprašyti.
50. Suskaičiuotos ir įvertintos kiekviename kartotiniame bandinyje rastos gyvos kirmėlės iškart perkeliama į sausus, iš anksto pasvertus ir paženklintus svėrimo padėklus (po vieną kiekvienam kartotiniam bandiniui) ir numarinamos, į kiekvieną svėrimo padėklą įlašinant po lašą etanolio. Svėrimo padėklai įdedami į 100 ± 5 °C temperatūros džiovinimo spintą, kad per naktį išdžiūtų, po to ataušinami eksikatoriuje, pasveriami ir nustatoma kirmėlių sausosios medžiagos masė (geriausia gramais, bent dešimtųjų tikslumu).
51. Kartu su bendra sausosios medžiagos mase galima nustatyti sausosios medžiagos masę be pelenų, kaip aprašyta literatūroje (49), siekiant atsižvelgti į kirmėlių virškinamajame trakte likusias jų prarytų nuosėdų neorganines daleles.
52. Nustatomas bendras kiekvieno kartotinio bandinio biomasės kiekis, įskaitant suaugusias ir jaunikles kirmėles. Nustatant kiekvieno kartotinio bandinio biomasę, nereikėtų įskaityti negyvų kirmėlių.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų patikrinimas*Ėminių paėmimas*

53. Bent pusiausvyros nusistovėjimo etapo pabaigoje (prieš įdedant bandomuosius organizmus) ir bandymo pabaigoje reikėtų paimti bent pačios didžiausios ir vienos mažesnės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius cheminei analizei. Analizei reikėtų paimti bent sujungtų nuosėdų ir paviršinio vandens ėminius. Kiekvieną dieną, kurią imami ėminiai analizei, reikėtų paimti bent po du kiekvienos terpės ir bandomosios grupės ėminius. Vieną iš dviejų kartotinių ėminių galima palikti atsargai (kad jį būtų galima išanalizuoti, pvz., tuo atveju, jeigu per pradinę analizę būtų nustatytas didesnis nei $\pm 20\%$ nuokrypis nuo vardinės koncentracijos). Atsižvelgiant į konkrečias cheminių medžiagų savybes, pvz., jeigu tikėtina, kad bandomoji cheminė medžiaga bus greitai suskaidyta, analizės tvarkaraštį galima patikslinti (pvz., dažniau imti ėminius, analizuoti daugiau koncentracijų lygių) remiantis ekspertų vertinimu. Tokiu atveju ėminius galima imti ir tarpinėmis dienomis (pvz., septintąją dieną nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios).
54. Paviršinio vandens ėminius reikėtų imti atsargiai nupilant (dekantuojant) arba nusiurbiant dalį paviršinio vandens, stengiantis kuo mažiau sujudinti nuosėdas. Reikėtų užrašyti paimtų ėminių tūrį.
55. Pašalinus paviršinį vandenį, nuosėdas reikėtų sumaišyti iki vienalytės masės ir perkelti į tinkamą talpą. Užrašoma šlapių nuosėdų ėminio masė.
56. Jeigu reikia papildomai išanalizuoti nuosėdų porų vandenyje buvusią bandomąją cheminę medžiagą, porų vanduo gaunamas centrifuguojant iki vienalytės masės sumaišytų ir pasvertų nuosėdų ėminius. Pavyzdžiui, galima įpilti į centrifugavimo stiklines apie 200 ml šlapių nuosėdų, tada, siekiant atskirti porų vandenį, pavyzdžiui turėtų būti centrifuguojami nefiltruojant, pvz., $10\,000 \pm 600 \times g$ intensyvumu 30–60 min., neviršijant bandymo metu buvusios temperatūros. Po centrifugavimo paviršinis skystis dekantuojamas arba nusiurbiamas pipete stengiantis, kad į jį nepatektų nuosėdų dalelių, ir užrašomas jo tūris. Taip pat užrašoma likusio nuosėdų gumulo masė. Įvertinti masės balansą arba regeneruoti bandomąją cheminę medžiagą iš vandens ir dugninių nuosėdų sistemos gali būti lengviau, jeigu nuosėdų sausosios medžiagos masė nustatoma kiekvieną ėminių ėmimo dieną. Kai kuriais atvejais gali būti neįmanoma išanalizuoti nuosėdų porų vandenyje esančių bandomosios medžiagos koncentracijų, nes ėminys tam yra per mažas.
57. Jei nepavyksta iškart atlikti analizės, visus ėminius reikėtų tinkamai laikyti, pvz., rekomenduojamomis laikymo sąlygomis, kad atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos skilimas būtų minimalus (pvz., iš aplinkos paimti ėminiai paprastai laikomi tamsoje, – $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje). Prieš pradėdami tyrimą, gaukite informaciją apie tinkamas bandomosios cheminės medžiagos laikymo sąlygas, pavyzdžiui, laikymo trukmę ir temperatūrą, ekstrahavimo procedūras ir t. t.

Analizės metodas

58. Kadangi visa procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai cheminei medžiagai taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo, eksperimento būdu patikrinkite, ar pagal konkretų pasirinktą metodą atliekamos cheminės analizės preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios cheminės medžiagos regeneravimas iš vandens ir nuosėdų ėminių yra pakankami esant bent mažiausiai ir didžiausiai bandomosios medžiagos koncentracijoms. Taip pat įsitikinkite, kad kontroliniuose induose nėra bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų, viršijančių jos kiekybinio nustatymo ribą. Jeigu reikia, patikslinkite vardines koncentracijas, kai regeneruojant nustatomos kokybės kontrolės pikinės vertės (pvz., kai regeneruotas medžiagos kiekis yra mažesnis negu 80 % arba viršija 120 % pikinės vertės). Visus ėminius per visą bandymą tvarkykite taip, kad jie kuo mažiau užsiterštų ir būtų prarasta kuo mažiau bandomosios medžiagos (pvz., dėl jos įgerties (adsorbcijos) į ėminių ėmimo prietaiso paviršių).
59. Reikėtų užrašyti ir ataskaitoje nurodyti bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo duomenis, kiekybinio nustatymo ribą ir aptikimo ribą dugninėse nuosėdose bei vandenyje.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**Rezultatų tvarkymas**

60. Pagrindiniai per šį bandymą privalomi taikyti atsako kintamieji, kuriuos reikia statistiškai įvertinti, yra biomasė ir bendras kiekvieno kartotinio bandinio kirmėlių skaičius. Taip pat galima pasirinkti vertinti reprodukciją (kirmėlių skaičiaus padidėjimą) ir augimą (biomassės padidėjimą, nustatomą matuojant sausą biomasę). Šiuo atveju reikėtų gauti kirmėlių sausosios medžiagos masės įvertį bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje, pvz., išmatuojant bandymui naudojamos sinchronizuotų kirmėlių partijos reprezentatyvaus dalinio ėminio sausąją masę.

61. Nors gaištamumas nėra šio bandymo vertinamoji baigtis, reikėtų, kiek įmanoma, įvertinti kirmėlių gaištamumą. Vertinant gaištamumą, negyvimis reikėtų laikyti tas kirmėles, kurios nereaguoja į nestiprų mechaninį dirgiklį arba turi irimo požymių, taip pat dingusias kirmėles. Gaištamumo duomenis reikėtų bent užrašyti ir į juos atsižvelgti aiškinant bandymo rezultatus.
62. Efektyviosios koncentracijos turėtų būti išreiškiamos miligramais vienam nuosėdų sausosios medžiagos masės kilogramui (mg/kg). Jei regeneruojamas bandomosios cheminės medžiagos, išmatuotos dugninėse nuosėdose arba nuosėdose ir paviršiniame vandenyje jos veikimo laikotarpio pradžioje, kiekis siekia 80–120 % vardinių koncentracijų verčių, efektyviosios koncentracijos (EC_x , NOEC, LOEC) gali būti išreiškiamos remiantis vardinėmis koncentracijomis. Jei regeneruotas kiekis daugiau kaip ± 20 % skiriasi nuo vardinių koncentracijų verčių, efektyviasias koncentracijas (EC_x , NOEC, LOEC) reikėtų nustatyti remiantis bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje išmatuotomis pradinėmis koncentracijomis, pvz., atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos masės balansą bandymo sistemoje (žr. 30 skirsnį). Šiais atvejais papildomos informacijos galima gauti išanalizavus pradinius ir (arba) bandymui naudojamus tirpalus, siekiant įsitikinti, kad bandymui naudotos nuosėdos buvo tinkamai paruoštos.

EC_x

63. EC_x vertės pagal 60 skirsnyje aprašytus parametrus apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Kärber metodą arba paprastąją interpoliaciją). Statistinio vertinimo gairių pateikta literatūroje (15), (50). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC_{50} ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių ($\bar{X}$) regresinė analizė.

NOEC (LOEC)

64. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC (LOEC), reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus. Apskritai bandomosios medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienpusį (mažesniąją) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$. Tolesniuose skirsniuose pateikiama pavyzdžių. Gairių, kaip pasirinkti tinkamus statistinius metodus, pateikta literatūroje (15), (50).
65. Galima testuoti normalųjų duomenų skirstinį taikant, pvz., Kolmogorov-Smirnov suderinamumo kriterijų (angl. *goodness-of-fit test*), intervalo ir standartinio nuokrypio santykio kriterijų (angl. *range-to-standard-deviation ratio test*, R/s kriterijus) arba Shapiro-Wilk kriterijų (dvipusį, $p \leq 0,05$). Cochran kriterijus, Levene kriterijus arba Bartlett kriterijus (dvipusis, $p \leq 0,05$) gali būti taikomas testuojant dispersijos vienalytiškumą. Jei tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, dispersijos vienalytiškumo) sąlygos, galima atlikti vienpusę dispersinę analizę (ANOVA) ir vėlesnius daugiopio palyginimo testus. Galima, atliekant porinių duomenų palyginimus (pvz., pagal Dunnett t kriterijų) arba taikant žingsnio žemyn trendo kriterijus (pvz., Williams kriterijų), apskaičiuoti, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų. Kitu atveju NOEC ir LOEC reikėtų nustatyti neparаметriniais metodais (pvz., taikant Bonferroni U kriterijų pagal Holm arba Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų).

Ribų nustatymo bandymas

66. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas (kontrolinė grupė palyginta su vienintelės koncentracijos bandiniais) ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, metriniais atsakais (bendrą kirmėlių skaičių ir biomasę, išreikštą kirmėlių sausosios medžiagos mase) galima įvertinti pagal Stjudento kriterijų (t kriterijus). Jeigu šie reikalavimai netenkinami, galima taikyti nelygios dispersijos t kriterijų (Welch t kriterijus) arba neparаметrinį kriterijų, kaip antai Mann-Whitney U kriterijų. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį metodą.
67. Siekiant nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių (kontrolės ir tirpiklio kontrolės) grupių, kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima testuoti ta pačia tvarka, kaip nurodyta per ribų nustatymo bandymą. Jeigu šiais testais nenustatoma reikšmingų skirtumų, galima sujungti visus kontrolinės ir tirpiklio kontrolės grupių kartotinius bandinius. Kitu atveju visas bandomąsias grupes reikėtų lyginti su tirpiklio kontrolės grupe.

Rezultatų aiškinimas

68. Jeigu buvo nukrypta nuo šio bandymo metodo arba jeigu išmatuotos bandymo koncentracijos vertės yra artimos aptikimo ribai pagal taikomą analizės metodą, rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai. Bet kokius nukrypimus nuo šio bandymo metodo būtina nurodyti.

Bandymo ataskaita

69. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta bent toliau nurodyta informacija.

— *Bandomoji cheminė medžiaga*

- Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir t. t.), įskaitant grynumą, ir analizės metodas, taikytas bandomosios cheminės medžiagos kiekybiniam nustatymui; šaltinis, iš kurio gauta bandomoji cheminė medžiaga, taip pat bet koks naudotas tirpiklis ir jo koncentracija.
- Bet kokia turima iki bandymo gauta informacija apie bandomosios medžiagos fizikinę prigimtį ir fizikines bei chemines savybes (pvz., tirpumą vandenyje, garų slėgį, pasiskirstymo koeficientą dirvožemyje (arba dugninėse nuosėdose, jeigu žinoma), $\log K_{ow}$, stabilumą vandenyje ir t. t.).

— *Bandomoji rūšis*

- Mokslinis pavadinimas, šaltinis, bet kokia išankstinė priežiūra, aklimatizacija, kultūros auginimo sąlygos ir t. t.

— *Bandymo sąlygos*

- Taikyta bandymo procedūra (pvz., stacionarusis, pusiau stacionarusis ar pratekamojo srauto bandymas).
- Bandymo planas (pvz., bandymo indų skaičius, dydis ir iš kokios medžiagos jie pagaminti, vandens talpa induose, nuosėdų masė ir tūris kiekviename inde (per pratekamojo srauto ar pusiau stacionariojo bandymo procedūras – vandens tūrio keitimo sparta), bet koks aeravimas prieš ir per bandymą, kartotinių bandinių skaičius, kirmėlių skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje, bandomosios medžiagos koncentracijų skaičius, kondicionavimo trukmė, pusiausvyros nusistovėjimo ir poveikio periodai, ėminių ėmimo dažnis).
- Dugninių nuosėdų ir paviršinio vandens sluoksnių gylis.
- Bandomosios cheminės medžiagos išankstinio apdorojimo ir įterpimo į nuosėdas (naudojimo) metodas.
- Bandomosios medžiagos vardinės koncentracijos, informacija apie ėminių ėmimą cheminei analizei ir analizės metodai, pagal kuriuos gautos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.
- Nustatytos dugninių nuosėdų savybės, kaip aprašyta 24–25 skirsniuose, ir bet kokie kiti atlikti matavimai; sintetinių nuosėdų paruošimas.
- Bandymui naudojamo vandens paruošimas (jeigu naudojamas regeneruotas vanduo) ir savybės (deguonies koncentracija, pH, laidumas, kietumas ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys) iki bandymo pradžios.
- Išsami informacija apie pašarą, įskaitant jo rūšį, paruošimą, kiekį ir šėrimo tvarką.
- Šviesos stipris ir apšvietimo laikotarpis (-iai).
- Metodai, pagal kuriuos nustatyti visi biologiniai parametrai (pvz., imant ėminius, tikrinant, sveriant bandomuosius organizmus) ir visi abiotiniai parametrai (pvz., vandens ir nuosėdų kokybės parametrai).
- Visų cheminei analizei naudotų ėminių tūris ir (arba) masė.
- Išsami informacija apie visų ėminių apdorojimą cheminei analizei, įskaitant informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, laikymą, įterpimo į nuosėdas tvarką, ekstrahavimą ir analizės procedūras, taip pat apie bandomosios cheminės medžiagos regeneravimą.

— *Rezultatai*

- Vandens kokybė bandymo induose (pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, kietumas, amoniako koncentracijos ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys).
- Nuosėdų bendrosios organinės anglies kiekis, sausosios medžiagos masės ir šviežios medžiagos masės santykis, pH ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys.
- Bendras bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde buvusių kirmėlių skaičius ir, jeigu nustatyta, sveikų ir pažeistų kirmėlių skaičius.
- Bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde buvusių kirmėlių sausosios medžiagos masė ir, jeigu išmatuota, dalinio kirmėlių ėminio sausosios medžiagos masė bandymo pradžioje.
- Bet kokios pastebėtos elgsenos anomalijos (pvz., nuosėdų vengimas, ar yra, ar nėra išmatų kruopelių), palyginti su kontrolinės grupės kirmėlėmis.
- Bet koks pastebėtas gaištamumas.
- Toksiškumo vertinamųjų baigčių (pvz., EC₅₀, NOEC ir (arba) LOEC) įverčiai ir pagal kokius statistinius metodus jie nustatyti.
- Bandomosios medžiagos vardinės koncentracijos, išmatuotos koncentracijos ir visų analizių, atliktų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai bandymo induose nustatyti, rezultatai.
- Bet kokie nukrypimai nuo tinkamumo kriterijų.

— *Rezultatų vertinimas*

- Rezultatų atitiktis 13 skirsnyje išvardytiems tinkamumo kriterijams.
- Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

- (1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

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

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

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

Papildoma literatūra apie statistines procedūras

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

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Kondicionavimo periodas skirtas dugninėse nuosėdose esančių mikroorganizmų populiacijai stabilizuoti ir, pvz., iš nuosėdų sudedamųjų dalių išsiskyrusiam amoniakui pašalinti prieš įterpiant į nuosėdas bandomąją cheminę medžiagą. Naudotas paviršinis vanduo po kondicionavimo periodo paprastai pašalinamas.

EC_x – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija dugninėse nuosėdose, per nustatytą veikimo laikotarpį padaranti X % (pvz., 50 %) poveikį tam tikram biologiniam parametru.

Pusiausvyros nusistovėjimo periodas reikalingas tam, kad bandomoji cheminė medžiaga pasiskirstytų tarp kietosios fazės, jos porų vandens ir paviršinio vandens sluoksnio, prieš įterpiant į nuosėdas bandomąją cheminę medžiagą ir prieš įdedant bandomuosius organizmus.

Bandomosios medžiagos veikimo etapas yra laikas, kurį bandomieji organizmai yra veikiami bandomosios cheminės medžiagos.

Paruoštos nuosėdos (arba perdirbtos, dirbtinės ar sintetinės nuosėdos) yra natūralių nuosėdų fizines sudedamąsias dalis atitinkančių medžiagų mišinys.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) yra mažiausia bandymui pasirinkta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebimas reikšmingas toksinis poveikis ($p \leq 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijų poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Jeigu šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – už LOEC tik truputį mažesnė bandomosios medžiagos koncentracija, kuri per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p \leq 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{ow} ; taip pat kartais išreiškiamas P_{ow}) – cheminės medžiagos tirpumo n-oktanolioje ir vandenyje, esant pusiausvyrai, santykis, atitinkantis cheminės medžiagos lipofiliškumą (šio priedo A.24 skyrius). K_{ow} arba K_{ow} logaritmas ($\log K_{ow}$) naudojamas cheminės medžiagos biologinio kaupimosi vandens organizmuose potencialui apibūdinti.

Organinės anglies / vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) – cheminės medžiagos koncentracijos dugninių nuosėdų organinės anglies dalyje ar prie jos santykis su tos cheminės medžiagos koncentracija vandenyje esant pusiausvyrai.

Paviršinis vanduo – bandymo inde virš dugninių nuosėdų esantis vanduo.

Porų vanduo ar laisvasis vanduo – ertmės tarp dugninių nuosėdų arba dirvožemio dalelių užpildantis vanduo.

Nuosėdos su įterpta bandomąja medžiaga – nuosėdos, į kurias dėta bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Rekomenduojamo naudoti regeneruoto vandens sudėtis

(parengta pagal šio priedo C.1 skyrių (1))

a) *Kalcio chlorido tirpalas*

Ištirpinkite 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

b) *Magnio sulfato tirpalas*

Ištirpinkite 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

c) *Natrio hidrokarbonato tirpalas*

Ištirpinkite 2,59 g NaHCO_3 dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

d) *Kalio chlorido tirpalas*

Ištirpinkite 0,23 g KCl dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Distiliuoto arba dejonizuoto vandens elektrinis laidis neturėtų viršyti $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Sumaišoma po 25 ml kiekvieno iš a–d tirpalų ir papildomai įpilama dejonizuoto vandens iki bendro 1 l tūrio. Šiuose tirpaluose esančių kalcio ir magnio jonų suma yra 2,5 mmol/l.

Ca ir Mg jonų santykis yra 4:1, o Na ir K jonų santykis lygus 10:1. Šio tirpalo rūgšties talpa $K_{\text{S4,3}}$ yra 0,8 mmol/l.

Skiedimui skirtas vanduo aeruojamas iki tol, kol prisisotina deguonies, po to laikomas maždaug dvi dienas; prieš naudojant papildomai neaeruojamas.

NUORODA

(1) Šio priedo C.1 skyrius. Ūmus toksiškumas žuvims.

3 priedėlis

Skiedimui tinkamo vandens fizikinės ir cheminės savybės

Sudedamoji dalis	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 µg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Visuminis chloro kiekis	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Visuminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l
(parengta pagal EBPO (1992) (1))	

NUORODA

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

4 priedėlis

Rekomenduojamų naudoti dirbtinių nuosėdų ruošimo ir laikymo gairės

Nuosėdų sudedamosios dalys

Sudedamoji dalis	Savybės	Nuosėdų sausosios medžiagos masės %
Durpės	Samaninės durpės, vidutinio suirimo lygio, ore išdžiovinotos, be pastebimų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis ≤ 2 mm, tačiau > 50 % dalelių turėtų būti $50\text{--}200$ μm dydžio	75–76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20 ± 1
Pašaras	Pvz., dilgėlių milteliai (<i>Folia urticae</i>), <i>Urtica dioica</i> (didžiosios dilgėlės) lapai, smulkiai sumalti (dalelių dydis $\leq 0,5$ mm); atitinkantys farmacijos standartus, tinkami vartoti žmonėms; dedami į sausas nuosėdas	0,4–0,5 %
Organinė anglis	Kiekis tikslinamas pridėdant durpių ir smėlio	$2 \pm 0,5$
Kalcio karbonatas	Chemiškai grynai CaCO_3 milteliai, dedami į sausas nuosėdas	0,05–1
Dejonizuotas vanduo	≤ 10 $\mu\text{S/cm}$ elektrinio laidžio, įpilamas į sausas nuosėdas	30–50

Pastaba. Jeigu tikimasi didesnių amoniako koncentracijų, pvz., kai žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga slopina nitrifikaciją, gali būti naudinga 50 % dilgėlių miltelių, kuriuose gausu azoto, pakeisti celiulioze (pvz., chemiškai gryniais α -celiuliozės milteliais, kurių dalelių dydis $\leq 0,5$ mm; (1), (2)).

Paruošimas

Durpės išdžiovinamos ore ir smulkiai sumalamos. Naudojant didelio našumo homogenizavimo įrenginį, paruošiama reikiamo durpių miltelių kiekio ir dejonizuoto vandens suspensija. Šios suspensijos pH patikslinamas iki $5,5 \pm 0,5$ naudojant CaCO_3 . Suspensija bent dvi dienas kondicionuojama nestipriai maišant, 20 ± 2 °C temperatūroje, siekiant stabilizuoti pH ir paruošti stabilią mikroorganizmų populiaciją. Dar kartą išmatuojama pH vertė, kuri turėtų būti $6,0 \pm 0,5$. Tada durpių suspensija sumaišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolinu) ir dejonizuotu vandeniu, gaunant vienalytes nuosėdas, kuriose vandens kiekis sudaro 30–50 proc. nuosėdų sausosios masės. Dar kartą išmatuojamas galutinio mišinio pH ir, jei reikia, koreguojamas naudojant CaCO_3 , kol pasiekia 6,5–7,5. Tačiau jeigu numatoma, kad susidarys daugiau amoniako, gali būti naudinga palaikyti nuosėdų pH žemiau 7,0 lygio (pvz., nuo 6,0 iki 6,5). Paimami nuosėdų ėminiai sausosios medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Jeigu numatoma, kad susidarys daugiau amoniako, paruoštas nuosėdas galima septynias dienas kondicionuoti tokiomis pačiomis sąlygomis, kokiomis bus atliekamas bandymas (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnis tokio paties gylio, kaip ir bandymo induose), prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą, t. y. jas reikėtų užpilti

vandeniu ir šį vandenį nuolat aeruoti. Šio kondicionavimo periodo pabaigoje paviršinį vandenį reikėtų nupilti ir pašalinti. Tada į nuosėdas įmaišoma kvarcinio smėlio su įterpta bandomąja medžiaga iki kiekvieno reikiamo koncentracijos lygio, nuosėdos paskirstomos į kartotinius bandymo indus ir užpilamos bandymui naudojamu vandeniu. Po to indai inkubuojami tokiomis pačiomis sąlygomis, kokiomis bus atliekamas bandymas; tai yra pusiausvyros nusistovėjimo periodo pradžia. Paviršinis vanduo turėtų būti aeruojamas.

Pasirinkto pašaro turėtų būti dedama į dugnines nuosėdas prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą arba kartu su ja. Jį galima iš pradžių sumaišyti su durpių suspensija (žr. pirmiau). Tačiau, kad įdėtas pašaras per daug nesuirėtų dar prieš įdedant bandomuosius organizmus, pvz., jeigu pusiausvyros nusistovėjimo periodas yra ilgas, galima stengtis, kad kuo mažiau laiko praeitų nuo pašaro dėjimo iki bandomosios medžiagos poveikio pradžios. Siekiant užtikrinti, kad bandomosios cheminės medžiagos patektų į pašarą, jį reikėtų sumaišyti su nuosėdomis ne vėliau kaip tą dieną, kurią į nuosėdas įterpiama bandomoji cheminė medžiaga.

Laikymas

Dirbtinių nuosėdų sausas sudedamąsias dalis galima laikyti sausoje ir vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštas nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga reikėtų bandymui naudoti nedelsiant. Paimtus nuosėdų ėminių su įterpta bandomąja chemine medžiaga iki analizės galima laikyti tai bandomajai medžiagai tinkamomis rekomenduojamomis sąlygomis.

NUORODOS

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

5 priedėlis

***Lumbriculus variegatus* kultūrų auginimo metodai**

Lumbriculus variegatus (MÜLLER, *Lumbriculidae*, *Oligochaeta*) rūšies kirmėlės gyvena gėlo vandens telkinių dugno nuosėdose ir plačiai naudojamos ekotoksikologiniams bandymams. Šių kirmėlių kultūras lengva auginti laboratorinėmis sąlygomis. Toliau apžvelgiami jų auginimo metodai.

Kultūrų auginimo metodai

Lumbriculus variegatus kultūrų auginimo sąlygos yra išsamiai apžvelgtos Phipps *et al.* (1993) (1), Brunson *et al.* (1998) (2), ASTM (2000) (3), JAV aplinkos apsaugos agentūros (2000) (4). Šios sąlygos glaustai aptariamos toliau. Svarbus *L. variegatus* naudojimo pranašumas yra spartus šios rūšies kirmėlių dauginimasis, dėl kurio greitai didėja laboratorijoje auginamų populiacijų biomasė (pvz., (1), (3), (4), (5)).

Šių kirmėlių kultūras galima auginti dideliuose (57–80 l) talpos akvariumuose, palaikant 23 °C temperatūrą ir 16 šviesos ir 8 tamsos val. apšvietimo režimą (100–1 000 lx šviesa), naudojant kasdien keičiamą natūralų vandenį (45–50 l vandens kiekviename akvariume). Ruošiant substratą, nebalinto rudojo popieriaus servetėlės sukarpos ir juosteles, kurias tada galima kelias sekundes maišyti maišytuvu įpylus auginimo terpei skirtą vandenį, gaunant smulkių popieriaus gumulėlių substratą. Šį substratą galima dėti tiesiai į *Lumbriculus* kultūroms skirtus akvariumus, padengiant juo akvariumo dugną, arba laikyti sušaldytą dejonizuotame vandenyje vėlesniam naudojimui. Šviežią substratą akvariume paprastai tinka laikyti apie du mėnesius.

Kiekviena nauja kirmėlių kultūra įveisiama naudojant 500–1 000 kirmėlių ir, jeigu akvariume vanduo keičiamas reguliariai arba nenutrūkstant srauto, šeriama 3 kartus per savaitę įpilant po 10 ml suspensijos, kurioje yra 6 g upėtakiams skirtą pradinio pašaro. Stacionariojo arba pusiau stacionariojo režimo sąlygomis auginamas kultūras reikėtų šerti mažiau, kad nesiveistų bakterijos ir grybeliai.

Tokiomis sąlygomis auginamos kultūros individų skaičius paprastai padvigubėja per maždaug 10–14 dienų.

Kitu atveju *Lumbriculus variegatus* kultūras taip pat galima auginti sistemoje, sudarytoje iš kvarcinio smėlio, kuris naudojamas dirbtinėms nuosėdoms, 1–2 cm gylio sluoksnio ir regeneruoto vandens. Jų auginimui galima naudoti 12–20 cm aukščio talpas iš stiklo ar nerūdijančio plieno. Vanduo turėtų būti nestipriai aeruojamas (pvz., pučiant po 2 oro burbuliukus per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm atstumu iki dugninių nuosėdų paviršiaus. Siekiant išvengti, pvz., amoniako kaupimosi, paviršinių vandenį reikėtų keisti naudojant pratekamojo srauto sistemą arba bent kartą per savaitę rankiniu būdu. Mažesnes žieduotąsias kirmėles galima laikyti kambario temperatūroje, palaikant apšvietimo režimą, pagal kurį būtų 16 val. šviesos (100–1 000 lx stiprio) ir 8 val. tamsos. Pusiau stacionariojoje sistemoje (kurioje vanduo keičiamas kartą per savaitę) kirmėlės du kartus per savaitę šeriamos „TetraMin“ pašaru (pvz., 1 cm² nuosėdų paviršiaus plotui dedama 0,6–0,8 mg pašaro), kurį galima įpilti kaip suspensiją – 50 mg „TetraMin“/1 ml dejonizuoto vandens.

Lumbriculus variegatus iš kultūros auginimo indų galima išimti, pvz., į atskirą laboratorinę stiklinę perkelti dalį substrato, naudojant mažų akučių tinklėlį, arba išrenkant atskirus organizmus plačiaange (maždaug 5 mm skersmens) grūdinto stiklo pipete. Jeigu kirmėlės į laboratorinę stiklinę perkeliamos kartu su substratu, tuomet ši stiklinė su kirmėlėmis ir substratu paliekama per naktį nuolatinės vandens tėkmės sąlygomis. Taip iš stiklinės išplaunamas substratas, o kirmėlės lieka indo dugne. Tada jas galima įleisti į naujoms kultūroms auginti paruoštas talpas arba toliau tvarkyti per bandymą, kaip aprašyta literatūroje (3), (4) arba toliau.

Naudojant *L. variegatus* bandymams dugninėse nuosėdose, reikia kritiškai apsvarstyti jų dauginimosi būdą (architomija arba morfalaksis, pvz., (6)) klausimą. Taip nelytiškai daugindamosi kirmėlės pasidalija į dvi dalis, kurios tam tikrą laiką nesimaitina, kol atauga trūkstanta galvos arba uodegos pusė (pvz., (7), (8)). Tai reiškia, kad *L. variegatus* ne visą laiką patiria bandomosios medžiagos poveikį rydamos ja užterštas nuosėdas.

Todėl kirmėlių kultūrą reikėtų sinchronizuoti, siekiant kuo labiau sumažinti nekontroliuojamą dauginimąsi ir regeneraciją, dėl kurių bandymo rezultatų kintamumas gali būti labai didelis. Tokį kintamumą gali lemti tai, kad kai kurie pasidaliję individai kurį laiką nesimaitina, todėl patiria mažesnį bandomosios cheminės medžiagos poveikį negu kiti individai, kurie bandymo metu nesidalija (9), (10), (11). Iki bandomosios medžiagos poveikio pradžios likus 10–14 dienų, kirmėlės reikėtų dirbtiniu būdu padalyti (sinchronizuoti). Sinchronizacijai atrenkamos didelės (suaugusios) kirmėlės, geriausia tokios, kurias apžiūrėjus nematyti nesenų morfalaksio požymių. Šias kirmėles galima padėti ant stiklo plokštelės kartu su lašu vandens, kuriame jos augintos, ir padalyti skalpeliu perpjaunant perpus per vidurinę kūno dalį. Reikėtų stengtis, kad atskirtos užpakalinės dalys būtų vienodo dydžio. Atskirtas užpakalinės dalis reikėtų iki bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios laikyti auginimo inde su tuo pačiu substratu,

kuriame auginta kirmėlių kultūra, ir regeneruotu vandeniu, kad ataugtų naujos galvos. Ataugus naujoms galvoms, sinchronizuotos kirmėlės ima rausti substratą (kad galvos ataugo, galima įsitikinti apžiūrėjus reprezentatyvų dalinį ėminį per binokulinį mikroskopą). Po šios procedūros bandomieji organizmai turėtų būti panašios fiziologinės būklės; tai reiškia, kad iš esmės visos sinchronizuotos kirmėlės, vėliau per bandymą besidaugindamos morfologinio būdu, turėtų patirti vienodą bandomąją medžiagą apdorotų nuosėdų poveikį. Sinchronizuotas kirmėles reikėtų pašerti iškart, kai tik jos pradeda rausti substratą, arba po padalijimo praėjus 7 dienoms. Jas šerti reikėtų panašiai, kaip ir įprastai auginamas kultūras, tačiau gali būti patartina sinchronizuotas kirmėles šerti tuo pačiu pašaru, kuris bus naudojamas per bandymą. Kirmėlės reikėtų laikyti bandymo temperatūroje, 20 ± 2 °C. Po regeneracijos bandymui turėtų būti naudojamos sveikos, nepažeistos kirmėlės, kurios, reaguodamos į nestiprų mechaninį dirgiklį, aktyviai plaukia arba šliaužia. Stengiantis nesužeisti kirmėlių ir neišprovokuoti savaiminio dalijimosi (autotomijos), reikėtų, pvz., naudoti pipetės grūdinto stiklo kraštais arba nerūdijančio plieno dantų krapštukus.

***Lumbriculus variegatus* pradinį kultūrų šaltiniai (JAV adresai parengti pagal (4))**

Europoje

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

JAV

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

NUORODOS

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
 - (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
 - (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
 - (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
 - (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
 - (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganization of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
 - (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
 - (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
 - (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
 - (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
 - (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
-

6 priedėlis

Tarplaboratorinio bandymo rezultatų suvestinė
„Toksiškumo *Lumbriculus variegatus* dugninėse nuosėdose bandymas“

1 lentelė.

Atskirų tarplaboratorinio bandymo etapų rezultatai: bandymo pabaigoje kontroliniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose nustatytas vidutinis kirmėlių skaičius; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas.

	vidutinis kirmėlių skai- čius kontrolini- uose bandiniuose	SN	VK (%)	sk.	vidutinis kirmėlių skai- čius tirpiklio kontroliniuose bandiniuose	SN	VK (%)	sk.
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
tarplabora- tori-nis vi- durkis	29,59		20,10		30,61		13,26	
SN	8,32		10,03		7,57		10,48	
sk.	15				15			
min.	16,3				15,0			
maks.	42,0				43,7			
VK (%)	28,1				24,7			

2 lentelė.

Atskirų tarplaboratorinio bandymo etapų rezultatai: bandymo pabaigoje kiekviename kontrolinės grupės ir tirpiklio kontrolinės grupės kartotiniame bandinyje nustatyta vidutinė bendroji kirmėlių sausosios medžiagos masė; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas

	bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė kiekviename kartotiniame (kontroliniame) bandinyje	SN	VK (%)	sk.	bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė kiekviename kartotiniame (tirpiklio kontrolės) bandinyje	SN	VK (%)	sk.
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
tarplaboratorinis vidurkis	25,15		20,36		27,68		17,53	
SN	7,87		12,56		7,41		9,10	
sk.	15				15			
min.	12,9				10,5			
maks.	41,3				41,4			
VK (%)	31,3				26,8			

3 lentelė.

Pentachlorfenolio toksiškumas: tarplaboratorinio bandymo vertinamųjų baigčių suvestinė; tarplaboratoriniai EC₅₀, NOEC ir LOEC vidurkiai; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas

biologinis parametras		Tarplaboratorinis vidurkis (mg/kg)	min.	maks.	Tarplaboratorinis koeficientas	SN	VK (%)	geometr. vidurkis (mg/kg)
bendras kirmėlių skaičius	EC₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MPS (%)	22,5	7,1	39,1				
bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė	EC₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MPS (%)	24,8	10,9	44,7				
gaištamumas / išgyvenimas	LC₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reprodukcija (kirmėlių skaičiaus padidėjimas kiekviename kartotiniame bandinyje)	EC₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MPS (%)	29,7	13,9	47,9				
augimas (biomės padidėjimas kiekviename kartotiniame bandinyje)	EC₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MPS (%)	32,2	13,6	65,2				

MPS – mažiausias pastebimas skirtumas nuo kontrolinių verčių tikrinant hipotezę; naudojamas kaip statistinio patikimumo matas.

NUORODA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36 PLĖŠRIŲJŲ ERKIŲ (*HYPOASPI* (*GEOLAEAPS*) *ACULEIFER*) REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS**ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 226 (2008). Jis skirtas dirvožemyje esančių cheminių medžiagų poveikiui *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*, Canestrini (*Acari: Laelapidae*) rūšies dirvožemio erkių reprodukcijos našumui vertinti, taigi pagal jį galima vertinti savitojo populiacijos augimo greičio slopinimą (1, 2). Reprodukcijos našumas šiuo atveju reiškia bandymo laikotarpio pabaigoje nustatytą jauniklių skaičių. Atliekant bandymus su *H. aculeifer*, tirama dar viena mitybos grandinės grandis kartu su rūšimis, kurių bandymo metodai jau parengti. Pagal šį bandymo metodą tinkamu laikomas reprodukcijos bandymas, atliekamas neskiriant ir kiekybiškai netiriant įvairių reprodukcijos ciklo etapų. Cheminėms medžiagoms, kurių poveikis patiriamas ne per dirvožemį, o pagal kitą poveikio scenarijų, gali būti tinkama taikyti kitus metodus (3).
2. *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* laikoma tipine dirvožemio faunos ir ypač plėšriųjų erkių rūšimi. Šios rūšies erkės yra paplitusios visame pasaulyje (5) ir jas lengva rinkti bei auginti laboratorijoje. *H. aculeifer* rūšies biologinės savybės apibendrintos 7 priedėlyje. Bendra informacija apie šios rūšies erkių ekologiją ir naudojimą ekotoksikologiniams bandymams paskelbta literatūroje (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

3. Suaugusios erkių patelės patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos, kurios įmaišyta į dirvožemį, koncentracijų poveikį. Pradedant bandymą į kiekvieno kartotinio bandinio indą įdedama po 10 suaugusių patelių. Patinėliai bandymui nenaudojami, nes iš patirties žinoma, kad kai yra patinėlių, patelės su jais susiporuoja iškart arba netrukus po to, kai išsineria po deutonimfos fazės. Be to, bandymas su patinėliais trukėtų ilgiau, nes erkės reikėtų skirstyti į įvairias amžiaus grupes, o tai būtų sudėtinga. Taigi, erkės per patį bandymą nesiporuoja. Patelės į bandymo indą įleidžiamos po 28–35 dienų nuo tada, kai sinchronizuotoje kultūroje pradedami dėti kiaušinėliai (žr. 4 priedėlį), nes tuo metu patelės galima laikyti jau susiporavusiomis ir jų pasirengimo dėti kiaušinėlius etapas yra praėjęs. Bandymas 20 °C temperatūroje baigiamas 14 dieną po patelių įdėjimo į indą (0 dienos); per tą laiką pirmieji kontrolinės grupės palikuonys pasiekia deutonimfos vystymosi stadiją (žr. 4 priedėlį). Pagrindinis matuojamas kintamasis yra jauniklių skaičius bandymo induose; taip pat nustatomas per bandymą išgyvenusių patelių skaičius. Priklausomai nuo bandymo plano (žr. 29 skirsnį), siekiant nustatyti EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}) arba nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) (sąvokų apibrėžtis žr. 1 priedėlyje), bandomosios cheminės medžiagos poveikį patyrusių erkių reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės reprodukcijos našumu. 8 priedėlyje pateikta bandymo tvarkaraščio apžvalga.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje, $\log K_{ow}$, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą ir garų slėgį. Patartina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje, kaip antai jos biotinio ir abiotinio skaidymo spartą.
5. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, tačiau nuo tirpumo vandenyje priklauso bandomosios cheminės medžiagos naudojimo būdas. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, t. y. tokioms cheminėms medžiagoms, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vieneta, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.

BANDYMO TINKAMUMAS

6. Bandymo rezultatas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai be bandomosios medžiagos atitinka šiuos kriterijus:
 - suaugusių patelių vidutinis gaištamumas bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 20 %;
 - vidutinis jauniklių skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje (į kurį įdėta 10 suaugusių patelių) bandymo pabaigoje turėtų būti bent 50;
 - apskaičiuotas jauniklių erkių skaičiaus kiekviename kartotiniame bandinyje variacijos koeficientas nustatomojo bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 30 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laboratorinės bandymo sąlygos yra tinkamos ir kad laikui bėgant nesikeičia bandomųjų organizmų atsakas į poveikį, būtina nustatyti etaloninės cheminės medžiagos EC_x ir (arba) NOEC vertes. Tinkama etaloninė cheminė medžiaga yra dimetoatas (CAS Nr. 60-51-5), kurio poveikis populiacijos dydžiui įrodytas (4). Kaip alternatyvią etaloninę cheminę medžiagą galima naudoti boro rūgštį (CAS Nr. 10043-35-3), tačiau naudojant šią medžiagą sukaupia mažiau praktinės patirties. Galimi du bandymo planai:
- per etaloninės cheminės medžiagos bandymą galima kartu nustatyti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą esant vienai jos koncentracijai, kurios poveikis, kaip iš anksto įrodyta atlikus dozės ir atsako tyrimą, yra palikuonių skaičiaus sumažėjimas daugiau kaip 50 %. Šiuo atveju kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse (žr. 29 skirsnį);
 - kitu atveju etaloninės cheminės medžiagos bandymas atliekamas 1–2 kartus per metus kaip dozės ir atsako tyrimas. Priklausomai nuo pasirinkto bandymo plano, koncentracijų bei kartotinių bandinių skaičius ir santykis skiriasi (žr. 29 skirsnį), tačiau gautas atsakas turėtų būti 10–90 % poveikis (koncentracijos turėtų skirtis pastoviu 1,8 santykiu). Pagal jauniklių skaičių nustatyta dimetoato EC_{50} vertė turėtų patekti į intervalą, kuriame 3,0–7,0 mg aktyviosios medžiagos tenka vienam dirvožemio (sausosios medžiagos masės) kilogramui. Remiantis iki šiol naudojant boro rūgštį gautais rezultatais, pagal jauniklių skaičių nustatyta EC_{50} vertė turėtų patekti į intervalą, kuriame 100–500 mg aktyviosios medžiagos tenka vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui.

BANDYMO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir įranga

8. Turėtų būti naudojami 3–5 cm skersmens bandymo indai (dirvožemio sluoksnis juose turėtų būti $\geq 1,5$ cm storio), pagaminti iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos, su sandariu dangteliu. Geriausia naudoti užsukamus dangtelius; tokiu atveju indus galima pravėdinti du kartus per savaitę. Kitu atveju galima naudoti tokius dangtelius (pvz., iš marlės), per kuriuos vykėtų tiesioginė dujų apykaita tarp substrato ir atmosferos oro. Kadangi per bandymą turi būti palaikomas pakankamas drėgnis, itin svarbu bandymo metu tikrinti kiekvieno bandymo indo masę ir, jei reikia, įpilti daugiau vandens. Tai gali būti ypač svarbu tada, kai naudojami indai be užsukamų dangtelių. Jeigu bandymo indas yra nepermatomas, jo dangtelis turėtų būti pagamintas iš šviesai pralaidžios medžiagos (pvz., perforuotas skaidrus dangtelis), tačiau toks, kad per jį neišropotų erkės. Bandymo indų dydis ir rūšis priklauso nuo to, koku metodu bus surenkamos erkės (apie tai išsamiau skaitykite 5 priedėlyje). Jeigu erkės surenkamos tiesiogiai kaitinant bandymo indą, indo dugnas gali būti su įdėtu tinkamo dydžio tinkleliu (kuris iki erkių surinkimo laikomas uždengtas), o dirvožemio sluoksnis turėtų būti pakankamai storas, kad temperatūra ir drėgnio lygis jame keistųsi laipsniškai.
9. Bandymui reikalinga standartinė laboratorinė įranga, visų pirma:
- geriausia naudoti stiklinius indus su užsukamais dangteliais;
 - džiovavimo spinta;
 - stereomikroskopas;
 - šepetėliai, naudojami erkėms perkelti;
 - pH matuoklis ir liuksmetras;
 - tinkamos tikslios svarstyklės;
 - tinkama temperatūros kontrolės įranga;
 - tinkama oro drėgnio kontrolės įranga (nebūtinai, jeigu bandymo indai uždengiami dangteliais);
 - reguliuojamos temperatūros inkubatorius arba maža patalpa;
 - įranga erkėms surinkti (žr. 5 skirsnį) (13);
 - virš galvos įrengta reguliuojamos šviesos lempa;
 - stiklainiai, į kuriuos dedamos surinktos erkės.

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

10. Per šį bandymą naudojamas dirbtinis dirvožemis. Šis dirbtinis dirvožemis ruošiamas iš tokių sudedamųjų dalių (visos vertės nurodytos sausosios medžiagos mase):

- 5 % samaninių durpių, ore išdžiovintų ir smulkiai sumaltų (tinkamas dalelių dydis yra 2 ± 1 mm);
- 20 % kaolino (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);
- apie 74 % ore išdžiovinto pramoninio smėlio (priklausomai nuo reikiamo CaCO_3 kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio. Tikslus smėlio kiekis priklauso nuo CaCO_3 kiekio (žr. toliau), kartu jie turėtų sudaryti iki 75 % dirbtinio dirvožemio;
- < 1,0 % kalcio karbonato (analiziškai gryną CaCO_3 miltelių), kad būtų gautas $6,0 \pm 0,5$ pH; dedamo kalcio karbonato kiekis gali daugiausia priklausyti nuo durpių kokybės ir (arba) rūšies (žr. 1 pastabą).

1 pastaba. Reikiamas CaCO_3 kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato sudedamųjų dalių ir turėtų būti nustatytas prieš pat bandymą išmatuojant dalinių dirvožemio ėminių pH (14).

2 pastaba. Durpių kiekis dirbtiniame dirvožemyje skiriasi nuo kiekio, naudojamo pagal kitus dirvožemio organizmų bandymų metodus, kai daugeliu atvejų naudojama 10 % durpių (pvz., (15)). Tačiau, EPPO duomenimis (16), įprastame žemės ūkio paskirties dirvožemyje yra ne daugiau kaip 5 % organinės medžiagos, taigi, mažinant durpių kiekį, sumažinama natūraliam dirvožemiui būdinga tikimybė, kad bandomoji cheminė medžiaga įsisigers į organinę anglį.

3 pastaba. Kai reikia, pvz., konkretiems bandymo tikslams pasiekti, kaip bandymo ir (arba) kultūrų auginimo substratą taip pat galima naudoti natūralų dirvožemį, paimtą iš neužterštų vietų. Tačiau jeigu naudojamas natūralus dirvožemis, jį apibūdinant reikėtų nurodyti bent jo kilmę (surinkimo vietą), pH, struktūrą (granulio-metrinę sudėtį) ir organinės anglies kiekį jame. Jeigu žinoma, reikėtų nurodyti dirvožemio rūšį ir pavadinimą pagal dirvožemio klasifikaciją. Dirvožemyje neturėtų būti jokių teršalų. Tuo atveju, jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra metalas arba organinis metalo junginys, taip pat reikėtų nustatyti katijonų mainų talpą. Ypač daug dėmesio reikėtų skirti tam, kad būtų tenkinami bandymo tinkamumo kriterijai, nes bendros informacijos apie natūralius dirvožemius paprastai yra nedaug.

11. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., naudojant didelį laboratorinį maišytuvą); tinkamai pH vertei nustatyti naudojamas dirvožemio ir 1 M kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalas santykiu 1:5 (žr. (14) ir 3 priedėlį). Jeigu dirvožemio rūgštumas viršija tinkamą intervalą (žr. 10 skirsnį), jį galima pakoreguoti įdedant tinkamą CaCO_3 kiekį. Jeigu dirvožemis yra pernelyg kalkingas, jį galima pataisyti įdedant daugiau mišinio, į kurį dėta pirmųjų trijų 10 skirsnyje nurodytų sudedamųjų dalių, bet nedėta CaCO_3 .
12. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras. Iki bandymo pradžios likus 2–7 dienoms, sausas dirbtinis dirvožemis iš pradžių sudrėkinamas įpilant pakankamai distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad jame būtų maždaug pusė galutinio vandens kiekio (40–60 % didžiausio vandens įmirkio). Dirvožemio drėgnis patikslinamas iki 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo ir (arba) papildomai įpilant distiliuoto ar dejonizuoto vandens (žr. 16–18 skirsnius). Dirvožemio drėgnį galima papildomai apytikriai nustatyti nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio – jei drėgnis yra tinkamas, tarp pirštų turėtų pasirodyti smulkių vandens lašelių.
13. Dirvožemio drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant bandymą, išdžiovinus jį iki pastovios masės 105 °C temperatūroje pagal standartą ISO 11465 (17), o dirvožemio pH – pagal 3 priedėlį arba standartą ISO 10390 (14). Šiuos matavimus reikėtų atlikti papildomai paimtuose tiek kontrolinės grupės, tiek kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos dirvožemio bandiniuose be erkių. Dirvožemio pH neturėtų būti koreguojamas atliekant rūgštinių arba šarminių cheminių medžiagų bandymus. Dirvožemio drėgnį reikėtų stebėti per visą bandymą, reguliariai pasveriant indus (žr. 20 ir 24 skirsnius).

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

14. Šiam bandymui naudojami *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883) rūšies gyvūnai. Pradedant bandymą imamos suaugusios erkių patelės iš sinchronizuotos vados. Erkės bandymui turėtų būti imamos, pvz., praėjus 7–14 dienų nuo subrendimo ir 28–35 dienoms nuo tada, kai sinchronizuotoje grupėje pradeda dėti kiaušinėlius (žr. 3 skirsnį ir 4 priedėlį). Turėtų būti nurodytas šaltinis, iš kurio gautos erkės, arba, jeigu erkių kultūra auginama laboratorijoje, – jos tiekėjas ir priežiūra. Laboratorijoje auginant erkių kultūrą, rekomenduojama bent kartą per metus pakartotinai identifikuoti jos rūšį. Rūšiai identifikuoti skirta lentelė pateikta 6 priedėlyje.

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

15. Bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į dirvožemį. Organinius tirpiklius, kurie naudojami dirvožemio apdorojimui bandomąja chemine medžiaga palengvinti, reikėtų parinkti atsižvelgiant į nedidelį jų toksiškumą erkėms; bandymo plane turi būti numatyta tinkama tirpiklio kontrolė (žr. 29 skirsnį).

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

16. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalo dejonizuotame vandenyje paruošiama tiek, kad jo pakaktų visiems vienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Patartina naudoti tinkamą vandens kiekį reikiamam drėgniui, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, pasiekti (žr. 12 skirsnį). Kiekvienas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas prieš dedant į bandymo indą gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio porcija.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

17. Bandomąsias chemines medžiagas, kurios yra netirpios vandenyje, tačiau tirpios organiniuose tirpikliuose, galima ištirpinti minimaliame tinkamo nešiklio (pvz., acetono) kiekyje. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Naudojant tokius nešiklius, visuose bandymui pasirinktų koncentracijų ir kontroliniuose bandiniuose turėtų būti vienodas minimalus nešiklio kiekis. Nešiklis užpurškiamas ant nedidelio smulkaus kvarcinio smėlio kiekio, pvz., 10 g, arba su juo sumaišomas. Atitinkamai reikėtų patikslinti bendrą substrate esančio smėlio kiekį. Nešiklis pašalinamas bent vieną valandą garinant po traukos gaubtu. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys sudedamas į bandymo indus. Atminkite, kad kai kurie tirpikliai gali būti nuodingi erkėms. Todėl, jeigu tirpiklio toksiškumas erkėms nežinomas, rekomenduojama naudoti papildomą kontrolinį bandinį su vandeniu, bet be nešiklio. Jeigu patikimai įrodyta, kad tirpiklis (tokios koncentracijos, kokios bus naudojamas) neturi poveikio erkėms, vandens kontrolinių bandinių galima neruošti.

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose mažai tirpi bandomoji cheminė medžiaga

18. Kai cheminės medžiagos yra mažai tirpios vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, kiekvienam bandymo indui imama po 2,5 g smulkiai sumalto kvarcinio smėlio (pvz., keturiems kartotiniams bandiniams imama 10 g smulkaus kvarcinio smėlio), kuris sumaišomas su tinkamu bandomosios cheminės medžiagos kiekiu, kad būtų gauta bandymui reikiama jos koncentracija. Atitinkamai reikėtų patikslinti bendrą substrate esančio smėlio kiekį. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys išskirstomas į bandymo indus. Ta pati procedūra kartojama ruošiant kiekvienos koncentracijos bandinius, taip pat paruošiama tinkama kontrolinių bandinių grupė.

PROCEDŪRA**Bandomosios ir kontrolinės grupės**

19. Į kiekvieną kontrolinės ir bandomosios grupių indą rekomenduojama įdėti po 10 suaugusių patelių ir 20 g dirbtinio dirvožemio (sausosios medžiagos masės). Bandomuosius organizmus reikėtų įdėti per dvi valandas po galutinio bandymui naudojamo substrato paruošimo (t. y. po to, kai įdedama bandomoji medžiaga). Konkrečiais atvejais (pvz., kai brandinimas laikomas lemiamu veiksniu), galima pailginti laiko tarpą nuo galutinio substrato paruošimo bandymui iki erkių įdėjimo (daugiau apie tokį brandinimą skaitykite literatūroje (18)). Tačiau tokiais atvejais būtina pateikti mokslinį pagrindimą.

20. Sudėjus į dirvožemį erkes, joms įdedama pašaro ir reikėtų išmatuoti pradinę kiekvieno bandymo indo masę, kuria remiantis bus galima stebėti dirvožemio drėgnį per visą bandymą, kaip aprašyta 24 skirsnyje. Tada bandymo indai uždengiami, kaip aprašyta 8 skirsnyje, ir įdedami į bandymo kamerą.
21. Tinkami kontroliniai bandiniai paruošiami pagal kiekvieną iš 15–18 skirsniuose aprašytų bandomosios cheminės medžiagos naudojimo metodų. Ruošiant kontrolinius bandinius, taikomos tos pačios aprašytos procedūros, išskyrus tai, kad į juos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Todėl, kai tinka, į kontrolinius bandinius dedama organinių tirpiklių, kvarcinio smėlio ar kitų nešiklių tomis pačiomis koncentracijomis (kiekiais), kaip ir į bandomosios grupės indus. Kai bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant tirpiklį ar kitą nešiklį, jeigu tirpiklio toksiškumas nežinomas, taip pat reikėtų paruošti ir išbandyti papildomą kontrolinį bandinį be nešiklio ir be bandomosios cheminės medžiagos (žr. 17 skirsnį).

Bandymo sąlygos

22. Per bandymą turėtų būti palaikoma 20 ± 2 °C temperatūra. Temperatūrą reikėtų išmatuoti ir užrašyti bent kartą per dieną ir, jei reikia, patikslinti. Atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir bandymo indų vietoje palaikomas apšvietimas 400–800 lx šviesa. Siekiant palyginamumo, šios sąlygos yra tokios pačios, kaip ir per kitus dirvožemio ekotoksikologinius bandymus (pvz., (15)).
23. Reikėtų užtikrinti dujų apykaitą, aeruojant bandymo indus bent dukart per savaitę, jeigu naudojami užsukami dangteliai. Jeigu naudojami marlės dangteliai, reikėtų skirti daugiau dėmesio tam, kad būtų palaikomas reikiamas dirvožemio drėgnis (žr. 8 ir 24 skirsnius).
24. Per visą bandymą palaikomas reikiamas vandens kiekis dirvožemio substrate, bandymo indus reguliariai pasveriant ir, jei reikia, įpilant daugiau vandens (pvz., kartą per savaitę). Sumažėjęs drėgnis, kai reikia, atkuriamas įpilant dejonizuoto vandens. Dirvožemio drėgnis per bandymą neturėtų daugiau kaip 10 % nukrypti nuo pradinės vertės.

Šėrimas

25. Įrodyta, kad tinkamas pašaras yra sūrinės erkutės *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781). Taip pat gali tikti mažos kolembolos (pvz., jauniklės *Folsomia candida* Willem, 1902 arba *Onychiurus fimationis* (19), (20)), enchiitrėjai (pvz., *Enchytraeus crypticus*, Westheide ir Graefe, 1992) arba nematodai (pvz., *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) (21). Rekomenduojama patikrinti pašarą prieš naudojant jį bandymui. Pašaro turėtų būti dedama tokios rūšies ir tiek, kad erkių jauniklių skaičius būtų pakankamas pagal bandymo tinkamumo kriterijus (6 skirsnis). Išrenkant tinkamą grobį erkėms, reikėtų atsižvelgti į bandomosios medžiagos veikimo būdą (pvz., akaricidas gali būti toksiškas ir maistinėms erkutėms, žr. 26 skirsnį).
26. Pašaro turėtų būti dedama *ad libitum* (t. y. kaskart dedamas mažas kiekis (ant mentelės galo)). Šiuo tikslu taip pat galima naudoti nestiprų siurbliuką, kaip tai siūloma daryti per kolembolų bandymą, arba ploną teptuką. Paprastai pakanka įdėti pašaro bandymo pradžioje ir vėliau du arba tris kartus per savaitę. Jeigu atrodo, kad bandomoji medžiaga yra toksiška erkių grobiui, reikėtų apsvarstyti galimybę dėti pašaro dažniau ir (arba) pasirinkti kitą pašaro šaltinį.

Tinkamų bandomosios medžiagos koncentracijų pasirinkimas

27. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, pvz., atlikus intervalo nustatymo tyrimus, turėtų būti lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas nuo 0,1 iki 1 000 mg vienam sauso dirvožemio kilogramui, bandomosiose grupėse ir kontrolinėje grupėje paruošiant bent po vieną kartotinį bandinį. Intervalo nustatymo bandymas trunka 14 dienų, po kurių nustatomas suaugusių erkių gaištamumas ir jauniklių skaičius. Galutinio bandymo koncentracijos verčių intervalą geriausia pasirinkti tokį, kad jame esančios koncentracijos paveiktų jauniklių skaičių, bet ne motininės kartos patelių išgyvenimą. Tačiau tai gali būti neįmanoma, kai mirtiną ir nemirtiną poveikį sukelia beveik vienodos bandomosios medžiagos koncentracijos. Efektyviosios koncentracijos vertės (pvz., EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) ir koncentracijų, kurioms esant patiriamas reikšmingas bandomosios cheminės medžiagos poveikis, intervalas turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą. Ekstrapoliuoti iki kur kas mažesnių negu mažiausioji poveikį bandomiejiems organizmams daranti koncentracija arba kur kas didesnių nei didžiausioji bandomoji koncentracija verčių reikėtų tik išimtiniais atvejais ir reikėtų išsamiai tai paaiškinti bandymo ataskaitoje.

Bandymo planas

Dozės ir atsako bandymai

28. Remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus kitą tarplaboratorinį bandymą (enchitrėjų reprodukcijos bandymas, (22)), siūlomi trys bandymo planai. Kad visi šie planai apskritai yra tinkami, įsitikinta gavus *H. aculeifer* tinkamumo patvirtinimo rezultata.
29. Nustatant koncentracijų intervalą būtina turėti omenyje šiuos dalykus:
- nustatant EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}) reikėtų bandymui rinktis mažiausiai dvylika koncentracijų. Rekomenduojama paruošti bent po du kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir šešis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;
 - nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2,0;
 - NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal bendrą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8.

Ribų nustatymo bandymas

30. Jeigu jokio bandomosios medžiagos poveikio nenustatoma esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės) per intervalo nustatymo bandymą, nustatomąją reprodukcijos bandymą galima atlikti kaip ribų nustatymo bandymą, pasirinkus bandomosios medžiagos koncentraciją, lygią 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės. Per ribų nustatymo bandymą bus galima įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC arba EC_{10} viršija ribinę koncentraciją, ir kartu bandymui panaudoti minimalų erkių kiekį. Reikėtų paruošti po aštuonis tiek bandomąją medžiaga apdoroto dirvožemio, tiek kontrolinius kartotinius bandinius.

Bandymo trukmė ir matavimai

31. Reikėtų užrašyti bet kokius pastebėtus elgsenos ir morfologinius erkių kontroliniuose ir bandomųjų grupių induose skirtumus.
32. 14 dieną likusios gyvos erkės išrenkamos iš dirvožemio naudojant surinkimo kaitinant ar veikiant šviesa ar bet kurį kitą tinkamą metodą (žr. 5 priedėlį). Jauniklės erkės (t. y. lervos, protonimfos ir deutonimfos) ir suaugusios erkės atskirai suskaičiuojamos. Visos tuo metu nerastos suaugusios erkės užrašomos kaip negyvos, darant prielaidą, kad šios erkės žuvo ir suiro iki vertinimo. Surinkimo efektyvumas turi būti kartą ar dukart per metus patvirtinamas naudojant kontrolinius bandinius, kuriuose suaugusių ir jauniklių erkių skaičius žinomas. Vidutinis visų vystymosi stadijų erkių surinkimo efektyvumas turėtų viršyti 90 % (žr. 5 priedėlį). Suaugusių ir jauniklių erkių skaičius, atsižvelgiant į surinkimo efektyvumą, netikslinamas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

33. 36–41 skirsniuose pateikta informacijos apie statistinius metodus, kuriuos galima taikyti analizuojant bandymo rezultatus. Taip pat reikėtų remtis EBPO dokumentu Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“ (Dabartiniai ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės metodai. Jų taikymo gairės) (31).
34. Pagrindinė bandymo vertinamoji baigtis yra reprodukcijos našumas, šiuo atveju – kiekviename kartotiniame bandymo inde (į kurį įleista 10 suaugusių patelių) atsivestų jauniklių skaičius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės aritmetinį vidurkį ($\bar{X}$) ir dispersiją (s^2). $\bar{X}$ ir s^2 vertės naudojamos per ANOVA procedūras, kaip antai taikant Stjudento t kriterijų, Dunnett kriterijų arba Williams kriterijų, taip pat apskaičiuojant 95 % pasikliautinuosius intervalus.

Pastaba. Ši pagrindinė vertinamoji baigtis yra lygiavertė vislumui, kuris apskaičiuojamas kaip gyvų per bandymą atsivestų jauniklių skaičius, padalytas iš bandymo pradžioje į indą įdėtų motininių patelių skaičiaus.

35. Kontroliniuose bandiniuose be bandomosios medžiagos išgyvenusių patelių skaičius yra svarbus tinkamumo kriterijus, kurį reikia užrašyti bandymo dokumentuose. Kaip ir per intervalo nustatymo bandymą, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio požymius.

EC_x

36. EC_x vertės, įskaitant susijusias atitinkamo 34 skirsnyje apibūdinto parametro žemutinę ir viršutinę 95 % pasiskliovimo ribas, apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Kärber metodą arba paprastąją interpoliaciją). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC₅₀ ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių (X) regresinė analizė.

NOEC (LOEC)

37. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC (LOEC), reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Turėtų būti taikomi tinkami statistiniai metodai (pagal EBPO dokumentą Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“). Apskritai bandomosios medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienpusį (mažesnį) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$. Tolesniuose skirsniuose pateikiama pavyzdžių.
38. Galima testuoti normalųjų duomenų skirstinį taikant, pvz., Kolmogorov-Smirnov suderinamumo kriterijų, intervalo ir standartinio nuokrypio santykio kriterijų (R/s kriterijus) arba Shapiro-Wilk kriterijų (dvipusį, $p \leq 0,05$). Cochran kriterijus, Levene kriterijus arba Bartlett kriterijus (dvipusis, $p \leq 0,05$) gali būti taikomas testuojant dispersijos vienalytiškumą. Jei tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, dispersijos vienalytiškumo) sąlygos, galima atlikti vienpusę dispersinę analizę (ANOVA) ir vėlesnius daugiopio palyginimo testus. Galima, atliekant daugiopio palyginimus (pvz., pagal Dunnett t kriterijų) arba taikant žingsnio žemyn trendo kriterijus (pvz., Williams kriterijų monotoniško dozės ir atsako santykio atveju), apskaičiuoti, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų (rekomenduojamas kriterijus pasirenkamas pagal EBPO dokumentą Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“). Kitu atveju NOEC ir LOEC reikėtų nustatyti neparametriniais metodais (pvz., taikant Bonferroni U kriterijų pagal Holm arba Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų).

Ribų nustatymo bandymas

39. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas (kontrolinė grupė palyginta su vienintelės koncentracijos bandiniais) ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, homogeniškumo) sąlygos, metrinis atsakas galima įvertinti pagal Studento kriterijų (t kriterijus). Jeigu šie reikalavimai netenkinami, galima taikyti nelygios dispersijos t kriterijų (Welch t kriterijus) arba neparametrinį kriterijų, kaip antai Mann-Whitney U kriterijų.
40. Siekiant nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių (kontrolės ir tirpiklio kontrolės) grupių, kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima testuoti ta pačia tvarka, kaip nurodyta per ribų nustatymo bandymą. Jeigu šiais testais nenustatoma reikšmingų skirtumų, galima sujungti visus kontrolinės ir tirpiklio kontrolinės grupių kartotinius bandinius. Kitu atveju visas bandomąsias grupes reikėtų lyginti su tirpiklio kontrolės grupe.

Bandymo ataskaita

41. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta bent toliau nurodyta informacija:

— *Bandomoji cheminė medžiaga*

— Bandomosios cheminės medžiagos tapatybė, pavadinimas, partija, siunta ir CAS numeris, grynumas.

— Bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., log K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsnio konstanta ir (H) ir, pageidautina, informacija apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje).

— *Bandomieji organizmai*

— Bandomųjų organizmų identifikacija ir tiekėjas, jų kultūros auginimo sąlygų apibūdinimas.

— Bandomųjų organizmų amžiaus grupė.

- *Bandymo sąlygos*
 - Bandymo plano ir eigos aprašymas.
 - Informacija apie bandomojo dirvožemio paruošimą; jeigu naudotas natūralus dirvožemis – išsamus jo aprašymas (kilmė, istorija, granulometrinė sudėtis, pH, organinės anglies kiekis ir, jei žinoma, dirvožemio klasifikacija).
 - Didžiausias dirvožemio vandens įmirkis.
 - Dirvožemio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga metodo aprašymas.
 - Informacija apie kartu su bandomąja chemine medžiaga naudojamąs pagalbines chemines medžiagas.
 - Bandymo indų dydis ir bandomojo dirvožemio sausosios medžiagos masė kiekviename inde.
 - Bandymo sąlygos: šviesos stipris, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra.
 - Šėrimo tvarkos aprašymas, bandymui naudojamo pašaro rūšis ir kiekis, šėrimo dienos.
 - Dirvožemio (kontrolinių ir kiekvienos bandomosios grupės bandinių) pH ir drėgnis bandymo pradžioje ir bandymo metu.
 - Išsamus erkių surinkimo metodo aprašymas ir surinkimo efektyvumas.
- *Bandymo rezultatai*
 - Bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde nustatytas jaunikių skaičius.
 - Suaugusių patelių skaičius ir suaugusių erkių gaištamumas (%), nustatytas bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde.
 - Pastebimų simptomų arba akivaizdžių elgsenos pokyčių aprašymas.
 - Bandymui naudojant etaloninę cheminę medžiagą gauti rezultatai.
 - suvestiniai statistiniai (EC_x ir (arba) NOEC) duomenys, įskaitant 95 % pasiklivimo ribas ir apskaičiavimo metodo aprašymą.
 - Koncentracijos ir atsako santykio grafikas.
 - Nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS – Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanysidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.
- (15) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneva.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Šio priedo C.32 skyrius. Enchitrėjų reprodukcijos bandymas.
- (23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneva.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes“ in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

-
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18.
-

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys (atliekant šį bandymą visos efektyviosios koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadarą statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri per nustatytą veikimo laikotarpį padaro statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

EC_x (x % poveikį sukelianti efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Didžiausio dirvožemio vandens įmirkio nustatymas

Nustatyta, kad didžiausiam dirvožemio vandens įmirkiui įvertinti tinka šis metodas, apibūdintas standarto ISO DIS 11268-2 C priede („Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction“ (23)).

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami ėminiams imti tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu, pripildę jį vandens, ir pastatykite jį ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras įsigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų paimti dirvožemio ėminį dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminį reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S = vandeniui sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T = tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D = sauso substrato masė

*3 priedėlis***Dirvožemio pH nustatymas**

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO DIS 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu (16).

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma, po to paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

4 priedėlis

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* bei maistinių erkių auginimas ir kultūros sinchronizavimas**Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* auginimas**

Auginamas erkių kultūras galima prižiūrėti plastikiniuose induose arba stiklainiuose, pripildytuose gipso ir medžio anglių miltelių mišinio (santykiu 9:1). Gipso drėgnį galima palaikyti, kai reikia, įlašinant kelis distiliuoto arba dejonizuoto vandens lašus. Erkėms auginti optimali temperatūra yra 20 ± 2 °C, o šviesos ir tamsos periodų kaita šiai rūšiai nėra svarbi. Šių erkių grobiu gali būti *Tyrophagus putrescentiae* arba *Caloglyphus* sp. erkės (maistinės erkės reikėtų tvarkyti atsargiai, nes jos gali žmonėms sukelti alergijas), tačiau taip pat tinka nematodai, enchitrėjai ir kolembolos. Reikėtų nurodyti, iš kokio šaltinio gauti šie gyvūnai. Populiacijai pradėti veisti pakanka vienos patelės, nes patinėliai išsirita iš neapvaisintų kiaušinėlių. Populiacijoje paprastai vienu metu vystosi kelios erkių kartos. Patelė trumpiausiai gyvena 100 dienų ir per gyvenimą padėti apie 100 kiaušinėlių. Sparčiausiai patelės kiaušinėlius deda būdamos 10–40 dienų amžiaus (po to, kai tampa suaugusios); tuo metu kiaušinėlių dėjimo sparta yra 2,2 kiaušinėlio patelei⁻¹ per parą⁻¹. Vystymosi laikas nuo kiaušinėlio iki suaugusios patelės, esant 20 °C temperatūrai, trunka apie 20 parų. Vienu metu reikėtų prižiūrėti ir iš anksto paruošti ne vieną, o daugiau erkių kultūrų.

***Tyrophagus putrescentiae* auginimas**

Šios erkės laikomos stikliniame inde, pripildytame smulkių alaus mielių miltelių. Šis indas įdedamas į plastikinį kibirą, į kurį įpilta KNO₃ tirpalo, kad erkės nepabėgtų. Maistinės erkės padedamos ant šių miltelių, po to atsargiai mentele įmaišomos į miltelius (kuriuos reikia dukart per savaitę keisti).

Kultūros sinchronizavimas

Bandymui turėtų būti naudojami to paties amžiaus egzemplioriai (pvz., praėjus 7 dienoms po to, kai erkės tampa suaugusios). Auginant erkes 20 °C temperatūroje, tai pasiekama toliau aprašytu būdu.

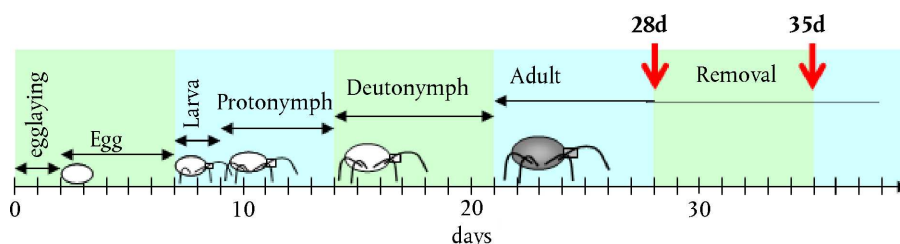
Perkelkite pateles į švarų auginimui skirtą indą ir įdėkite pakankamai pašaro;

— palikite dviem arba trimis dienoms, kad padėtų kiaušinėlius, tada pateles išimkite;

— bandymui imkite suaugusias pateles po 28–35 parų nuo pradžios, įdėdami suaugusias pateles į švarius auginimui skirtus indus.

Suaugusias pateles lengva atskirti nuo patinėlių ir kitų vystymosi etapų individų iš to, kad jos yra didesnės ir išsipūtusios, su rudu nugaros skydeliu (patinėliai yra plonesni ir plokščios formos), o nesubrendę individai yra baltos arba kreminės spalvos. Esant 20 °C temperatūrai, erkių vystymasis maždaug atitinka tolesniame paveiksle parodytą modelį: kiaušinėlis – 5 d., lerva – 2 d., protonimfa – 5 d., deutonomfa – 7 d., patelės pasirengimo dėti kiaušinėlius periodas – 2 d. Po to erkės tampa suaugusios.

Paveikslas.

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* vystymasis 20 °C temperatūroje („Išėmimas“ –išimamos patelės, kurios bus naudojamos bandymui)**

Suaugę bandomieji gyvūnai išimami iš sinchronizuotos kultūros indo ir įleidžiami į bandymo indus praėjus 28–35 dienoms nuo tada, kai motininės patelės pradeda dėti kiaušinėlius (t. y. po 7–14 parų nuo tada, kai erkės tampa suaugusios). Taip užtikrinama, kad bandomųjų gyvūnų pasiruošimo dėti kiaušinėlius periodas būtų jau pasibaigęs ir patelės būtų susiporavusios su taip pat kultūros auginimo inde esančiais patinėliais. Iš laboratorijose auginamų kultūrų stebėjimų žinoma, kad jeigu yra patinėlių, patelės su jais susiporuoja iškart arba netrukus po to, kai tampa suaugusios, (Ruf, Vaninnen, asmeninių stebėjimų duomenys). Septynių parų periodas pasirenkamas tam, kad būtų lengviau prisitaikyti prie laboratorijos darbo tvarkaraščio ir individualaus erkių vystymosi kintamumas būtų mažesnis. Prasidėjus kiaušinėlių dėjimo etapui, patelių turėtų būti mažų mažiausiai tiek pat, kiek jų galiausiai reikės bandymui (jeigu, pvz., bandymui reikia 400 patelių, tai mažiausiai 400 patelių reikėtų leisti dėti kiaušinėlius dvi–tris dienas. Sinchronizuotai populiacijai pradėti reikėtų bent 1 200 kiaušinėlių (lyčių santykis apie 0,5, gaisamumas apie 0,2). Kad nebūtų kanibalizmo, geriau viename inde laikyti ne daugiau kaip 20–30 kiaušinėlius dedančių patelių.

5 priedėlis

Erkių surinkimo metodai

Siekiant atskirti individus nuo dirvožemio arba substrato, kuriame jie laikyti, mikroskopiniams nariuotakojams tinkamas metodas yra surinkimas kaitinant (žr. tolesnę schemą). Šis metodas pagrįstas organizmų aktyvumu, todėl įmanoma suskaičiuoti tik judrius individus. Surinkimo kaitinant esmė yra laipsniškai sudaryti ėminyje esantiems organizmams vis mažiau pakenčiamas sąlygas, kad jie išlįstų iš substrato ir sukristų į skystą fiksiatorių (pvz., etanolį). Svarbiausi aspektai yra surinkimo procedūros trukmė ir tai, kad nuo organizmams palankių iki pakenčiamų ir, vėliau, nebepakenčiamų sąlygų būtų pereita laipsniškai. Surinkti gyvūnus po ekotoksikologinių bandymų reikia kuo greičiau, nes jeigu per tą laiką, kol jie renkami, jų populiacija bent kiek padidėtų, būtų gauti klaidingi bandymo rezultatai. Kita vertus, temperatūros ir drėgmės sąlygos ėminyje visada turi būti tokios, kad erkės galėtų judėti. Kaitinant dirvožemio ėminį, substratas išdžiūsta. Jei jis džiūsta per greitai, kai kurios erkės taip pat gali sudžiūti, nespėjusios iš jo ištrūkti.

Todėl siūloma taikyti toliau nurodytą procedūrą (24), (25).

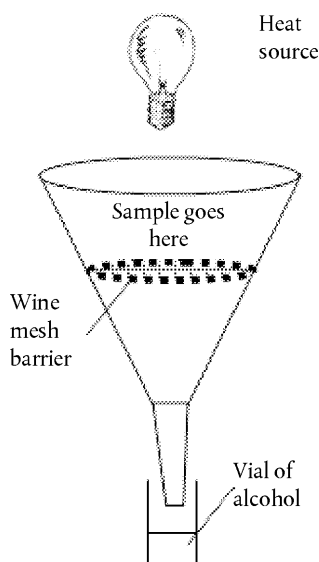
Aparatūra. Naudojamas Tulgreno piltuvai arba taikomi panašūs metodai, pvz., pagal McFadyen (kaitinama iš viršaus, ėminys padedamas virš piltuvo).

Kaitinimo režimas: 12 val. – 25 °C, 2 val. – 35 °C, 24 val. – 45 °C temperatūra (iš viso 48 val.). Temperatūrą reikėtų matuoti substrate.

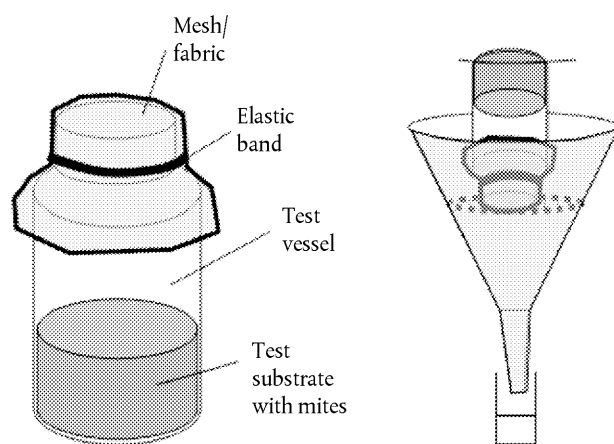
Naudojamas skystas fiksiatorius – 70 % etanolis.

Procedūros aprašymas: paimkite bandymui naudotą stiklinį indą. Nuimkite jo dangtelį ir angą uždenkite tinkleliu arba audinio atražiža. Audinyje esantys tarpeliai turėtų būti 1,0–1,5 mm dydžio. Audinį pritvirtinkite prie indo gumine juoste. Indą atsargiai apverskite ir įstatykite į aparatą, skirtą erkėms rinkti. Audinys sulaiko substratą, kad šis nebyrėtų į skystą fiksiatorių, tačiau erkės per jį gali išlįsti iš ėminio. Kaitinti pradėkite tada, kai į aparatą įstatysite visus indus. Erkių rinkimą baikite po 48 valandų. Paimkite indus su skystu fiksiatoriumi ir suskaičiuokite jame esančias erkės per stereomikroskopą.

Būtina 1–2 kartus per metus įrodyti erkių rinkimo pasirinktu metodu efektyvumą, tam naudojant indus, kuriuose yra tam tikras žinomas jauniklių bei suaugusių erkių, laikomų bandymui naudojamame substrate be bandomosios medžiagos, skaičius. Bendras erkių (įskaitant visų vystymosi pakopų individus) surinkimo efektyvumas turėtų būti $\geq 90\%$.

Tulgreno piltuvo tipo erkių surinkimo prietaisas

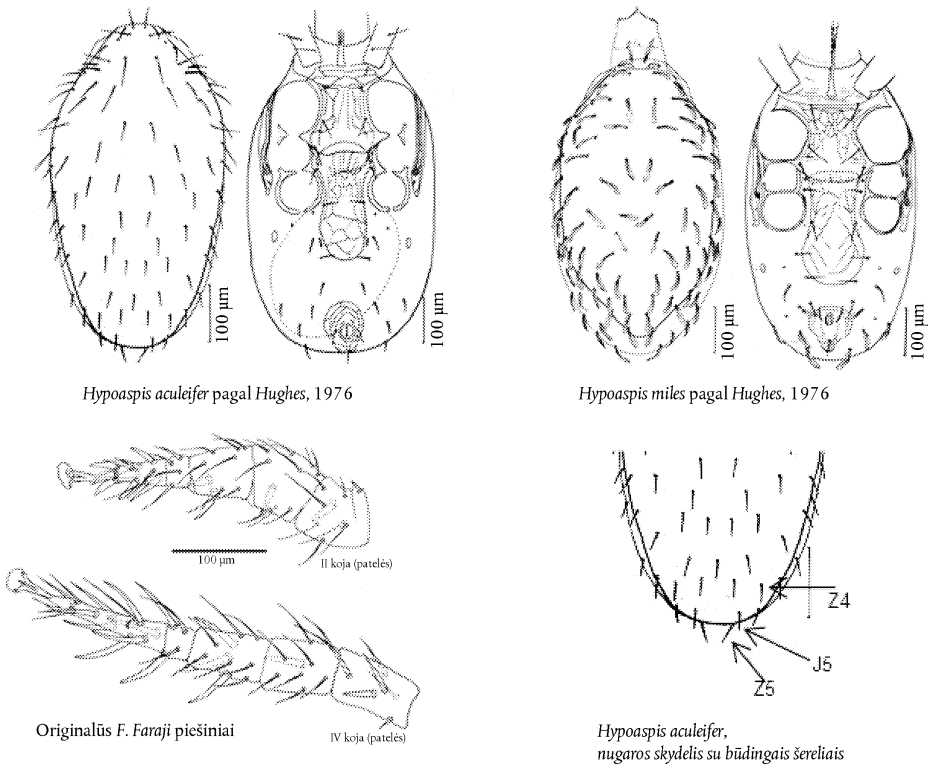
Bandymo indo paruošimas baigus bandymą, prieš surenkant erkes



6 priedėlis

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer rūšies identifikavimas

Poklasis, būrys, pobūris	Šeima	Gentis, pogentis, rūšis
Acari / Parasitiformes / Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Autorius ir data	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 2007 m. sausio 23 d.	
Naudojama literatūra:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9, p. 400. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., p. 509.	
Rūšies identifikaciniai požymiai:	Iškyša (lot. <i>tectum</i>) suapvalintu dantytu kraštu; hipostomos grioveliai su daugiau kaip 6 danteliais; uodegos dorsaliniai Z4 šereliai nelabai ilgi; nugaros šereliai setiforminiai; genitalinis skydelis normalus, ne per daug padidėjęs ir nesiekia analinio skydelio; nugaros skydelio užpakalinė dalis be neporinių šerelių; ant II ir IV kojų yra storų makrošerelių; nugaros Z5 šerelis maždaug du kartus ilgesnis negu J5; cheliceros pamatinis narelis su 12–14 danteliais, o judantysis narelis su 2 danteliais; idiosomos ilgis 520–685 µm. <i>Hypoaspis miles</i> rūšies erkės taip pat naudojamos biologinei kontrolei ir gali būti supainiotos su <i>H. aculeifer</i> . Pagrindinis skirtumas yra toks: <i>H. miles</i> priklauso <i>Cosmolaelaps</i> pogenčiui, jų nugaros šereliai peilio formos, o <i>H. aculeifer</i> priklauso <i>Geolaelaps</i> pogenčiui, nugaros šereliai setiforminiai.	

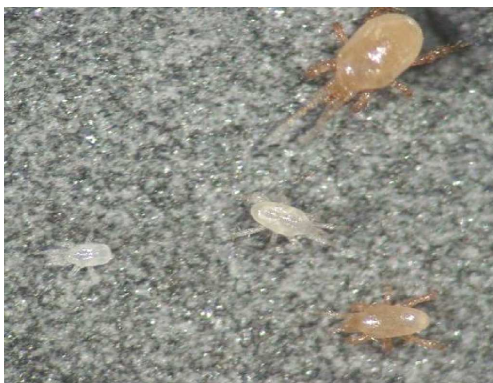


7 priedėlis

Pagrindinė informacija apie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* biologines savybes

Hypoaspis aculeifer priklauso *Lealapidae* šeimai, *Acari* (erkių) būriui, *Arachnida* klasei, *Arthropoda* tribai. Šios erkės gyvena visų rūšių dirvožemyje ir maitinasi kitomis erkėmis, nematodais, enchitrėjais ir kolembolomis (26). Trūkstant maisto, jos yra linkusios į kanibalizmą (27). Plėšriųjų erkių kūnas susideda iš idiosomos ir gnatosomos. Prosomos (galvos) ir opistosomos (pilvo) dalys idiosomoje nėra aiškiai diferencijuotos. Gnatosomoje (galvos skydelyje) yra tokie mitybos organai kaip čiuptuvėliai ir chelicera. Cheliceros yra trišakės, su įvairių formų danteliais. Patinėliai cheliceras naudoja ne tik rydami grobį, bet ir daugiausia perduodami spermatoforus patelėms. Nugaros skydelis dengia beveik visą idiosomą. Didelę patelių idiosomos dalį užima dauginimosi organai, kurie yra itin išryškėja prieš pat dedant kiaušinėlius. Pilvo pusėje aptinkami du skydeliai – prieškrūčio ir genitalinis. Visos kojos yra apaugusios šereliais ir dygliukais. Šie šereliai atlieka atraminę funkciją erkėms judant dirvožemyje ar jo paviršiuje. Pirmoji kojų pora daugiausia atlieka čiuptuvėlių funkciją. Antroji kojų pora naudojama ne tik judėjimui, bet ir grobiui sugriebti. Ketvirtosios kojų poros dygliukai gali atlikti apsauginę ir „judėjimo atspirties“ funkciją (28). Patinėliai yra 0,55–0,65 mm ilgio ir 10–15 µg svorio. Patelės yra 0,8–0,9 mm ilgio ir sveria 50–60 µg (8), (28) (1 pav.).

1 pav.

***H. aculeifer* patelė, patinėlis, protonimfa ir lervos.**

23 °C temperatūroje erkių patelės lytiškai subręsta per 16, patinėliai – per 18 parų (6). Patelės perima iš patinėlių spermatozoidus solenostomomis ir iš ten jie patenka į kiaušides. Kiaušidėse spermatozoidai subręsta ir saugomi iki apvaisinimo, kuris įvyksta tik kiaušidėse subrendus spermatozoidams. Apvaisintus arba neapvaisintus kiaušinėlius patelės padeda grupėmis arba atskirai, daugiausia į dirvožemyje esančius plyšius ar duobeles. Iš susiporavusių patelių kiaušinėlių gali išsiriti abiejų lyčių jaunikliai, o iš nesusiporavusių patelių kiaušinėlių išsiriti tik patinėliai. Iki tampa suaugusiais, individai pereina keturias vystymosi pakopas (kiaušinėlis – lerva, lerva – protonimfa, protonimfa – deutonimfa, deutonimfa – suaugusi erkė).

Kiaušinėliai yra pieno baltumo spalvos, permatomi, elipsės formos ir maždaug 0,37 mm ilgio, su kietu kevalu. Kaip rašoma (8), lervos yra 0,42–0,45 mm dydžio. Jos turi tik tris kojų poras. Galvos regione yra susiformavę čiuptuvėliai ir cheliceros. Cheliceros su keliais smulkiais danteliais reikalingos tam, kad lervos galėtų išsiriti iš kiaušinėlių. Praėjus 1–2 dienoms po to, kai lervos išsiriti iš kiaušinėlių, po pirmojo nėrimosi, susiformuoja protonimfos. Jos taip pat yra baltos spalvos, 0,45–0,62 mm dydžio (8), su keturiomis kojų poromis. Cheliceros yra su visais dantimis. Nuo šios stadijos erkės ima ieškoti pašaro. Jos praduria chelicerosmis grobio kutikulę ir išvirkščia sekreto, reikalingo išoriniam virškinimui, o tada susiurbia apvirškintas maistines medžiagas. Cheliceros taip pat gali būti naudojamos stambesnėms dalelėms nuo pašaro gabalėlių atskirti (28). Po dar vieno nėrimosi susiformuoja deutonimfos. Jos yra 0,60–0,80 mm (8) dydžio, nuo geltonos iki šviesiai rudos spalvos. Nuo šio etapo jau galima atskirti pateles ir patinėlius. Po dar vieno nėrimosi, per kurį gyvūnai yra neaktyvūs ir formuojasi rudasis skydelis, (maždaug po 14 parų) erkės tampa suaugusios (28), (29), (30). Jų gyvenimo trukmė, esant 25 °C temperatūrai, yra nuo 48 iki 100 dienų (27).

8 priedėlis

Pagrindinių veiksmų, reikalingų atliekant bandymą su *Hypoaspis*, santrauka ir tvarkaraštis

Laikas (dienomis) bandymo pradžia = 0 diena	Veikla / užduotis
-35 d. iki -28 d.	Perkelkite pateles iš pradinės kultūros į švarius indus, kad būtų galima pradėti sinchronizaciją Po 2 parų išimkite pateles du ar tris kartus per savaitę įdėkite pakankamai pašaro
-5 d. (+/- 2)	Paruoškite dirbtinį dirvožemį
-4 d. (+/- 2)	Nustatykite dirbtinio dirvožemio vandens įmirkį Per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite ėminius ir apskaičiuokite vandens įmirkį
-4 d. (+/- 2)	Iš anksto sudrėkinkite dirbtinį dirvožemį, kad būtų pasiektas 20–30 % vandens įmirkis
0 d.	Pradėkite bandymą – į dirbtinį dirvožemį įdėkite bandomosios cheminės medžiagos Į kiekvieną kartotinį bandinį įdėkite 10 patelių Pasverkite kiekvieną kartotinį bandinį Paruoškite abiotinius kontrolinius bandinius drėgniui ir pH matuoti, taip pat po du kiekvienos koncentracijos bandomosios grupės kartotinius bandinius Drėgniui matuoti skirtus kontrolinius bandinius per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite drėgniui matuoti skirtus kontrolinius bandinius Kitą dieną išmatuokite išdžiovintų abiotinių kontrolinių bandinių pH
(maždaug) 3, 6, 9, 12 d.	Į kiekvieną kartotinį bandinį įdėkite pakankamą pašarui skirtų organizmų kiekį Pasverkite kiekvieną kartotinį bandinį ir galiausiai papildykite išgaravusį vandenį
14 d.	Nutraukite bandymą, pasiruoškite surinkti erkes iš visų kartotinių bandinių, taip pat erkių surinkimo efektyvumo kontrolei Drėgnio kontrolinius bandinius per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite drėgnio kontrolinius bandinius Kitą dieną išmatuokite išdžiovintų kontrolinių bandinių pH
16 d.	Baikite rinkti erkes
16+ d.	Užrašykite surinktų suaugusių ir jauniklių erkių skaičių Surašykite rezultatus į standartinės formos lenteles Aprašykite bandymo procedūrą bandymo protokolo lakštuose

C.37. 21 DIENOS TRUKMĖS ŽUVŲ TYRIMAS. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIO BEI ANDROGENINIO VEIKIMO IR AROMATAZĖS SLOPINIMO ATRANKOS TYRIMAS**ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 230 (2009). Poreikis parengti ir patvirtinti žuvų tyrimo, kuriuo galima nustatyti tam tikras endokrininę sistemą veikiančias chemines medžiagas, metodiką atsirado susirūpinus, kad aplinkos užterštumas cheminėmis medžiagomis gali kelti neigiamą poveikį ir žmonėms, ir laukinei gyvūnijai, nes šios cheminės medžiagos sąveikauja su endokrine sistema. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galbūt ardančių medžiagų atrankos ir bandymų gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti žuvų endokrininę sistemą veikiančių cheminių medžiagų atrankos bandymų gaires. Įgyvendinta 21 dienos trukmės poveikio žuvų endokrininei sistemai atrankos tyrimo patikimumo vertinimo programa – ją sudarė su parinktomis cheminėmis medžiagomis atlikti tarplaboratoriniai tyrimai, kuriais siekta įrodyti tyrimo aktualumą ir patikimumą nustatant estrogeninį poveikį turinčias ir aromatazę slopinančias chemines medžiagas (1, 2, 3, 4, 5) trijų tiriamų rūšių žuvų (juodosios drūtagalvės rainės, japoninės medakos ir zebrinės danijos) organizmuose; nustatyti androgeninį veikimą galima juodosios drūtagalvės rainės ir medakos, bet ne zebrinės danijos organizme. Šiuo bandymo metodu negalima nustatyti antiandrogeninį poveikį turinčių cheminių medžiagų. Patikimumo vertinimo darbo rezultatus peržiūrėjo EBPO bandymų gairių programos nacionalinių koordinatorių paskirtų ekspertų grupė (6). Tyrimas nėra skirtas konkretiems hormonų veiklos sutrikimo mechanizmomams nustatyti, nes tiriamieji gyvūnai turi sveiką pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų (PHL) ašį, kuri gali reaguoti į PHL ašį įvairiais lygmenimis veikiančias chemines medžiagas. Atliekant trumpalaikį žuvų gebėjimo daugintis tyrimą (EBPO TG Nr. 229), vertinamas juodosios drūtagalvės rainės vaisingumas ir prireikus lytinių liaukų histopatologija, taip pat visos į šį bandymo metodą įtrauktos vertinamosios baigtys. EBPO TG Nr. 229 suteikia galimybę nustatyti chemines medžiagas, veikiančias dauginimąsi per įvairius, įskaitant endokrininius, mechanizmus. Į šiuos skirtumus reikėtų atkreipti dėmesį, kad būtų pasirinktas tinkamiausias bandymo metodas.
2. Šiame bandymo metode aprašomas *in vivo* atrankos tyrimas, per kurį lytiškai subrendęs žuvies patinas ir neršianti patelė tam tikrą jų gyvenimo ciklo dalį (21 dieną) laikomi kartu ir veikiami tam tikra chemine medžiaga. Pasibaigus 21 dienos veikimo chemine medžiaga laikotarpiui, atsižvelgiant į naudotą žuvų rūšį, kaip tiriamosios cheminės medžiagos estrogeninio veikimo, aromatazės slopinimo ar androgeninio veikimo rodikliai vertinamos viena arba dvi patinų ir patelių biologinių žymenų vertinamosios baigtys; šios vertinamosios baigtys yra vitelogeninas ir antriniai lytiniai požymiai. Vitelogeninas matuojamas juodosios drūtagalvės rainės, japoninės medakos ir zebrinės danijos, o antriniai lytiniai požymiai – tik juodosios drūtagalvės rainės ir japoninės medakos organizme.
3. Šis biologinis tyrimas yra tam tikrų endokrininio pobūdžio veikimo mechanizmų *in vivo* atrankos tyrimas ir jo taikymą reikėtų vertinti atsižvelgiant į konceptualią EBPO parengtą endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (28).

PIRMINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Vitelogeninas, kaip atsakas į cirkuliuojantį endogeninį estrogeną, paprastai gaminamas kiaušinius dedančių stuburinių gyvūnų patelių kepenyse. Tai yra kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris, pasigaminęs kepenyse, per kraujotaką patenka į kiaušides, o ten yra panaudojamas ir modifikuojamas besivystančių kiaušinėlių. Nesubrendusių žuvų patelių ir patinų plazmoje vitelogenino beveik neįmanoma aptikti, nes jų organizme nepakanka cirkuliuojančio estrogeno, tačiau kepenys gali sintezuoti ir išskirti vitelogeniną reaguodamos į egzogeninio estrogeno poveikį.
5. Matuojant vitelogenino kiekį, galima nustatyti įvairias chemines medžiagas, turinčias įvairaus pobūdžio estrogeninį poveikį. Estrogenines chemines medžiagas galima aptikti matuojant vitelogenino indukciją žuvies patino organizme – tai išsamiai aprašyta ekspertų įvertintoje literatūroje (pvz. (7)). Taip pat nustatyta, kad vitelogenino indukciją sukelia aromatizuojamų androgenų poveikis (8, 9). Sumažėjus patelių organizme cirkuliuojančiam estrogenų kiekiui, pavyzdžiui, dėl aromatazės – fermento, kuris endogeninį androgeną paverčia natūraliu estrogenu (17β-estradioliu), slopinimo, sumažėja vitelogenino, naudojamo cheminėms medžiagoms, turinčioms aromatazės slopinimo savybių, aptikti, kiekis (10, 11). Biologinė vitelogenino atsako į estrogenų ar aromatazės slopinimą svarba yra gerai žinoma ir plačiai pagrįsta dokumentais. Tačiau VTG gamybai patelių organizme įtakos taip pat gali turėti bendrasis toksiškumas ir medžiagų, kurioms būdingas ne endokrininis toksiškumas (pvz., toksinis poveikis kepenims), poveikis.

6. Įprastam naudojimui yra sėkmingai sukurti ir standartizuoti keli matavimo metodai. Tokie yra konkrečioms gyvūnų rūšims skirti imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodai, kuriais imunocheminiu būdu nustatomas mažuose iš atskirų žuvų paimtuose kraujo ar kepenų mėginiuose pagamintas vitelogenino kiekis (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). VTG kiekiui išmatuoti imami juodosios drūtagalvės rainės kraujo, zebrinės danijos kraujo arba galvos ir (arba) uodegos homogenato ir medakos kepenų mėginiai. Medakos kraujyje ir kepenyse nustatomi panašūs VTG kiekiai (19). 6 priedėlyje pateiktos rekomenduojamos mėginių ėmimo vitelogenino analizei atlikti procedūros. Vitelogenino matavimo priemonių rinkiniai yra plačiai prieinami; tokie priemonių rinkiniai turėtų būti sudaromi remiantis patvirtintu konkrečioms gyvūnų rūšims skirtu IFA metodu.
7. Tam tikrų rūšių žuvų patinų antriniai lytiniai požymiai yra išoriškai matomi, kiekybiškai įvertinami ir reaguoja į cirkuliuojančius endogeninių androgenų kiekius; tai taikytina juodajai drūtagalvei rainei ir medakai, bet ne zebrinei danijai, kuri neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių. Patelės išlaiko gebėjimą išvystyti vyriškuosius antrinius lytinius požymius, kai yra paveikiamos androgeninėmis cheminėmis medžiagomis vandenyje. Tokiai juodosios drūtagalvės rainės (20) ir medakos (21) organizmo reakcijai dokumentais pagrįsti mokslinėje literatūroje pateikiami keli tyrimai. Patinų antrinių lytinių požymių sumažėjimą dėl mažos statistinės galios reikėtų vertinti atsargiai, be to, jis turėtų būti pagrįstas ekspertų vertinimais ir įtikinamais įrodymais. Kadangi zebrinė danija neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių, kurie reaguotų į androgeninį poveikį turinčias chemines medžiagas, jos naudojimas šiame tyrime yra ribotas.
8. Kalbant apie juodąją drūtagalvę rainę, pagrindinis egzogeninio androgeno poveikio rodiklis yra poravimosi gumburėlių skaičius priekinėje patelės galvos dalyje. Kalbant apie medaką, pagrindinis egzogeninio androgeninių cheminių medžiagų poveikio patelei žymuo yra spenelių ataugų skaičius. 5A ir 5B priedėliuose nurodytos rekomenduojamos procedūros, skirtos atitinkamai juodosios drūtagalvės rainės ir medakos lyties požymiams įvertinti.
9. Šiame bandymo metode vartojamos apibrėžtyje pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO METODO ESMĖ

10. Atliekant tyrimą, chemine medžiaga veikiami kartu į bandymo indus įleisti reprodukcinio amžiaus žuvų patinai ir patelės. Tyrime naudojamos suaugusios reprodukcinio amžiaus žuvys, todėl jas galima aiškiai atskirti pagal lytį, taigi ir atlikti su lytimi susijusią kiekvienos vertinamosios baigties analizę, be to, taip užtikrinamas jų jautrumas egzogeninėms cheminėms medžiagoms. Baigus bandymą, lytis patvirtinama makroskopiniu lytinių liaukų tyrimu atvėrus pilvo ertmę žirklėmis. Atitinkamų biologinio tyrimo sąlygų apžvalga pateikta 2 priedėlyje. Tyrimas paprastai pradedamas atrenkant žuvis iš neršiančių žuvų populiacijos; tyrime neturėtų būti naudojami senstantys gyvūnai. Rekomendacijos dėl žuvų amžiaus ir reprodukcinės būklės pateiktos skirsnyje „Žuvų atranka“. Tyrimas atliekamas naudojant tris cheminės medžiagos bandomąsias koncentracijas, taip pat vandens kontrolinę grupę ir prareikusių tirpiklio kontrolinę grupę. Tiriant medaką ir zebrinę daniją, kiekvienoje doze veikiamoje grupėje naudojama po du indus arba kartotinius bandinius (kiekviename inde yra po penkis patinus ir penkias pateles), o tiriant juodąją drūtagalvę rainę – po keturis indus arba kartotinius bandinius (kiekviename inde yra po du patinus ir keturias pateles). Taip atsižvelgiama į teritorinį juodosios drūtagalvės rainės patino elgesį, tačiau išlaikoma pakankama statistinė tyrimo galia. Bandomąja medžiaga žuvis veikiama 21 dieną, o mėginiai iš žuvų taip pat paimami 21-ą veikimo dieną.
11. 21-ą dieną po mėginių paėmimo visi gyvūnai humaniškai numarinami. Įvertinami juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antriniai lytiniai požymiai (žr. 5A ir 5B priedėlius); iš zebrinės danijos ir juodosios drūtagalvės rainės vitelogenino kiekiui nustatyti paimami kraujo mėginiai, kaip alternatyvą vitelogenino kiekiui nustatyti galima paimti zebrinių danijų galvą ir (arba) uodegą (6 priedėlis); iš medakos VTG analizei atlikti paimamos kepenys (6 priedėlis).

BANDYMO PRIIMTINUMO KRITERIJAI

12. Kad bandymo rezultatai būtų priimtini, turi būti įvykdytos šios sąlygos:
 - gaištamumas kontroliniame inde su vandeniu (arba tirpikliu) veikimo laikotarpio pabaigoje neturėtų viršyti 10 %;
 - ištirpusio deguonies koncentracija per visą veikimo laikotarpį turėtų sudaryti bent 60 % oro soties vertės (OSV);

- bet kuriuo veikimo laikotarpio momentu bandymo indų vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip $\pm 1,5$ °C ir turėtų būti palaikoma 2 °C intervale bandomajai rūšiai nurodytame diapazone (2 priedėlis);
- turi būti įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai išlaikytos išmatuotų vidutinių verčių ± 20 % intervalo ribose.

METODO APRAŠYMAS

Prietaisas

13. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

- a) deguonies ir pH matuokliai;
- b) įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti;
- c) atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra;
- d) iš chemiškai inertiškos medžiagos pagaminti rekomenduojamą įkrovą bei gyvūnų laikymo tankį atitinkančios talpos rezervuarai (žr. 2 priedėlį);
- e) neršto substratas juodajai drūtagalvei rainei ir zebrinei danijai – 4 priedėlyje pateikiama reikalinga išsami informacija;
- f) reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. $\pm 0,5$ % tikslumo).

Vanduo

14. Galima naudoti bet koki vandenį, kuriame bandomoji rūšis gali ilgai gyventi ir augti. Jo kokybė turėtų išlikti pastovi visą bandymo laiką. Vandens pH vertė turi būti 6,5–8,5, tačiau, atliekant konkretų bandymą, pH vertė neturi kisti daugiau kaip $\pm 0,5$ pH vieneto. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo netinkamai nepaveiktų bandymo rezultatų (pvz., sudarydamas kompleksus su bandomąja chemine medžiaga), tam tikrais intervalais turėtų būti imami mėginiai analizei atlikti. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ir Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- ir SO_4^{2-}), pesticidų (pvz., fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų bendro kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jeigu žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jeigu būtų įrodyta, kad vandens kokybė išlieka pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai – padidinti (pvz., kas šešis mėnesius). Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės pateiktos 3 priedėlyje.

Bandymo tirpalai

15. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai paruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą geriau ruošti tiesiog maišant ar plakant bandomąją cheminę medžiagą skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles). Nerekomenduojama naudoti tirpaus nešiklio. Tačiau, jeigu tirpiklis būtinas, kontrolinį bandymą su tirpikliu reikia atlikti tuo pačiu metu ir naudojant tą pačią, kaip ir bandymuose su chemine medžiaga, tirpiklio koncentraciją. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos sunkiai tirpsta, tirpiklis gali būti geriausias sprendimas; reikėtų susipažinti su EBPO sunkiai naudojamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų rekomendaciniu dokumentu (22). Tirpiklis bus pasirinktas pagal cheminės medžiagos chemines savybes. EBPO rekomendaciniame dokumente 100 µl/l yra rekomenduojama didžiausia tirpiklio koncentracija ir jos turėtų būti laikomasi. Tačiau neseniai atliktoje peržiūroje (23) atkreiptas dėmesys į papildomas problemas, kylančias naudojant tirpiklius poveikiui endokrininei sistemai tirti. Todėl rekomenduojama prireikus kuo labiau mažinti tirpiklio koncentraciją visais techniškai įmanomais atvejais (atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes).
16. Bus naudojama pratekamojo srauto bandymo sistema. Naudojant tokią sistemą (pvz., dozavimo siurbį, proporcinį skiestuvą, prisotinimo sistemą), pradinis bandomosios cheminės medžiagos tirpalas nenutrūksta ir dozuojamas ir skiedžiamas, kad bandymo akvariumuose būtų užtikrintos atitinkamos koncentracijos. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Reikėtų vengti naudoti nekokybiškus plastmasinius vamzdelius ar kitas medžiagas, kurių sudėtyje gali būti biologiškai aktyvių cheminių medžiagų. Renkantis pratekamojo srauto bandymo sistemai tinkamą medžiagą, reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos įgertį į šią medžiagą.

Žuvų laikymas

17. Pasirenkamos vienos laboratorinės populiacijos ir geriau tos pačios rūšies žuvis, kurios, kad aklimatizuotųsi, bent dvi savaites prieš bandymą buvo laikomos tokios kokybės vandenyje ir tokiomis apšvietimo sąlygomis, kurios panašios į bandymo sąlygas. Svarbu, kad įkrova ir gyvūnų laikymo tankis (apibrėžtis galima rasti 1 priedėlyje) būtų tinkami naudojamai bandomajai rūšiai (žr. 2 priedėlį).
18. Po 48 valandų stabilizacijos periodo, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:
 - populiacijos gaištamumas per septynias paras yra didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama;
 - populiacijos gaištamumas yra 5–10 %: aklimatizacija papildomas septynias paras; jeigu per kitas septynias paras gaištamumas yra didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama;
 - populiacijos gaištamumas per septynias paras yra mažesnis kaip 5 %: partija priimama.
19. Aklimatizacijos, paruošiamuoju arba veikimo chemine medžiaga laikotarpiu žuvis neturėtų būti gydomos nuo ligų.

Paruošiamasis laikotarpis ir žuvų atranka

20. Rekomenduojama paruošiamojo laikotarpio trukmė – viena savaitė, šiuo metu gyvūnai patalpinami į indus, panašius į tuos, kurie bus naudojami atliekant bandymą. Visą laikymo laikotarpį ir veikimo chemine medžiaga etape žuvis turėtų būti šeriamos iki soties. Veikimo chemine medžiaga etapas pradedamas iš laboratorijos turimų poravimuisi subrendusių gyvūnų atsargų atrenkant lytiškai dimorfiškas (pvz., turinčias aiškius antrinius lytinius požymius, kurie juodosios drūtagalvės rainės ir medakos atveju yra matomi) ir aktyviai neršiančias suaugusias žuvis. Toliau pateikti kriterijai yra tik rekomendacinio pobūdžio (jie negali būti svarstomi atskirai nuo stebimos konkrečios žuvų partijos tikrosios reprodukcinės būklės): juodosios drūtagalvės rainės turėtų būti maždaug 20 ($\pm$ 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 25 $\pm$ 2 °C temperatūroje. Japoninės medakos turėtų būti maždaug 16 ($\pm$ 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 25 $\pm$ 2 °C temperatūroje. Zebrinės danijos turėtų būti maždaug 16 ($\pm$ 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 26 $\pm$ 2 °C temperatūroje.

BANDYMO PLANAS

21. Naudojamos trys bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, taip pat atliekama viena (vandens) kontrolė ir prireikus viena tirpiklio kontrolė. Duomenys gali būti analizuojami, kad būtų nustatyti statistškai reikšmingi veikimo chemine medžiaga ir kontrolės atsako skirtumai. Atlikus šias analizes, galima susidaryti išpūdį apie tai, ar reikia atlikti papildomą ilgesnės trukmės bandymą siekiant nustatyti nepageidaujamą cheminės medžiagos poveikį (konkrečiai: išgyvenimui, vystymuisi, augimui ir dauginimuisi), o ne naudoti šiuos duomenis rizikos vertinime (24).
22. 21-ą bandymo dieną iš zebrinės danijos ir medakos patinų ir patelių, priklausančių kiekvienai doze veikiamai grupei (po penkis patinus ir penkias pateles abiejuose kartotinio bandymo induose) ir kontrolinei (-ėms) grupei (-ėms), paimami mėginiai vitelogenino kiekiui ir, jeigu taikytina, antriniam lytiniam požymiams nustatyti. 21-ą veikimo dieną iš juodosios drūtagalvės rainės patinų ir patelių, priklausančių kiekvienai doze veikiamai grupei (po du patinus ir keturias pateles kiekviename iš keturių kartotinio bandymo indų) ir kontrolinei (-ėms) grupei (-ėms), paimami mėginiai vitelogenino kiekiui ir antriniam lytiniam požymiams nustatyti.

Bandomųjų koncentracijų parinkimas

23. Šiame bandyme didžiausia bandomoji koncentracija turėtų atitikti didžiausią toleruojamą koncentraciją (DTK), nustatytą per anksčiau atliktą ribų paieškos bandymą ar pagal kitus toksiškumo duomenis, būti prilyginta 10 mg/l arba būti nustatyta remiantis didžiausiu tirpumu vandenyje, atsižvelgiant į tai, kuri iš jų yra mažiausia. DTK apibrėžiama kaip didžiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kurios sukeltas žuvų gaištamumas yra mažesnis nei 10 %. Taikant tokį metodą, daroma prielaida, kad yra empiriniai ūmaus ar kitokio toksiškumo duomenys, pagal kuriuos galima apskaičiuoti DTK. DTK gali būti sunku tiksliai nustatyti, todėl paprastai specialistams šiuo klausimu reikia pasitarti.
24. Reikalingos trys bandomosios koncentracijos, kurių vertė skiriasi pastoviu koeficientu, neviršijančiu 10, ir viena praskiesto vandens kontrolė (o prireikus ir tirpiklio kontrolė). Rekomenduojama pasirinkti atskyrimo koeficientą nuo 3,2 iki 10.

PROCEDŪRA

Bandomųjų žuvų atranka ir svėrimas

25. Svarbu, kad žuvų svorio skirtumas tyrimo pradžioje būtų kuo mažesnis. Įvairioms gyvūnų rūšims tinkamos dydžių ribos, kuriomis rekomenduojama vadovautis atrenkant šių rūšių gyvūnus, pateiktos 2 priedėlyje. Visoje bandyme naudojamoje žuvų partijoje patinų ir patelių individualus svoris bandymo pradžioje, jeigu galima, neturėtų patekti už aritmetinio tos pačios lyties svorio vidurkio ± 20 % intervalo ribų. Vidutiniam svoriui nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų poėminio dalį.

Veikimo sąlygos*Trukmė*

26. Bandymo trukmė po paruošiamojo laikotarpio – 21 diena. Rekomenduojama paruošiamojo laikotarpio trukmė – viena savaitė.

Šėrimas

27. Žuvis turėtų būti šeriamos tinkamu pašaru iki soties (2 priedėlis) ir pakankamai dažnai gerai fizinei būklei palaikyti. Reikėtų stengtis išvengti mikrobų dauginimosi ir vandens drumstumo. Šie nurodymai yra rekomendacinio pobūdžio: paros davinyje gali būti padalytas į dvi ar tris lygias dalis, kurios būtų duodamos kelis kartus per parą, darant bent trijų valandų pertrauką tarp šėrimų. Galimas vienas didesnis davinys – ypač savaitgaliais. Žuvis neturėtų būti šeriamos 12 valandų iki mėginių ėmimo ar nekropsijos.
28. Reikėtų patikrinti, ar žuvų pašare nėra teršalų, pvz., chloro organinių pesticidų, policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) ar polichlorintųjų bifenilų (PCB). Reikėtų vengti pašaro, kuriame yra padidintas fitoestrogenų kiekis, nes taip būtų paveiktas tyrimo atsakas į žinomą estrogenų agonistą (pvz., 17-beta estradiolį).
29. Nesuėstas pašaras ir išmatos iš bandymo indų turėtų būti pašalinami bent du kartus per savaitę, pvz., kruopščiai išvalant kiekvieno rezervuaro dugną sifonu.

Šviesa ir temperatūra

30. Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turėtų būti tinkami bandomųjų gyvūnų rūšiai (žr. 2 priedėlį).

Analitinių tyrimų ir matavimų dažnis

31. Prieš pradėdant veikimo chemine medžiaga etapą, reikėtų įsitikinti, kad cheminės medžiagos padavimo sistema veikia tinkamai. Turėtų būti nustatyti visi reikalingi analizės metodai, taip pat reikėtų pakankamai žinoti apie cheminės medžiagos stabilumą bandymo sistemoje. Atliekant bandymą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų vertės reguliariais intervalais nustatomos taip: skiestų ir toksiška chemine medžiaga paveiktų pradinį tirpalų srautų greitis turėtų būti tikrinamas geriau kasdien, bet ne mažiau kaip du kartus per savaitę, ir visą bandymo laiką neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Rekomenduojama faktines bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas visuose induose matuoti bandymo pradžioje ir vėliau kas savaitę.
32. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau, jeigu visą bandymo laiką bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai išlaikytos nominaliosios koncentracijos vertės ± 20 % intervalo ribose, rezultatai gali būti grindžiami nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis.
33. Mėginius gali tekti filtruoti (pvz., pro 0,45 μ m aktytumo filtrą) arba centrifuguoti. Jeigu reikalingas centrifugavimas, tai ir yra rekomenduojama procedūra. Tačiau, jeigu filtru neabsorbuoja bandomosios medžiagos, būtų priimtinas ir filtravimas.

34. Atliekant bandymą, visuose bandymo induose bent kartą per savaitę turėtų būti matuojami ištirpęs deguonis, temperatūra ir pH. Bendrasis kietumas ir šarmingumas kontroliniuose induose ir viename inde su didžiausia cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti matuojami bent kartą per savaitę. Temperatūrą bent viename bandymo inde geriau kontroliuoti nuolatos.

Pastabos

35. Tyrimo laikotarpiu arba jam pasibaigus įvertinamos tam tikros bendrosios (pvz., išgyvenimo) ir pagrindinės biologinės reakcijos (pvz., vitelogenino kiekis). Šių vertinamųjų baigčių ir jų naudingumo matavimas ir vertinimas aprašyti toliau.

Išgyvenimas

36. Bandymo laikotarpiu žuvis turėtų būti tiriamos kasdien, gaištamumas turėtų būti registruojamas, o nugaišusios žuvis kuo greičiau pašalinamos. Nei kontroliniuose, nei chemine medžiaga veikiamuose induose nugaišusios žuvis neturėtų būti pakeičiamos naujomis. Per bandymą nugaišusių žuvų lytis turėtų būti nustatyta atliekant makroskopinį lytinių liaukų patikrinimą.

Elgesys ir išvaizda

37. Reikėtų atkreipti dėmesį į bet kokias elgesio anomalijas (palyginti su kontrolinių grupių gyvūnais); tai gali būti bendro apsinuodijimo požymiai, įskaitant hiperventiliaciją, nekoordinuotą plaukimą, pusiausvyros praradimą ir netipiską nejudamumą ar mitybą. Taip pat reikėtų atkreipti dėmesį į papildomas išorines anomalijas (pvz., kraujavimą, spalvos pakeitimą). Tokie apsinuodijimo požymiai turėtų būti atidžiai apsvarstyti atliekant duomenų vertinimą, nes gali rodyti, kad, esant tokioms koncentracijoms, poveikio endokrinei sistemai biologiniai žymenys nėra patikimi. Iš tokių elgesio stebėsenos rezultatų taip pat galima pasisemti naudingos kokybinės informacijos, kuria remiantis bus nustatomi galimi bandymų su žuvimis reikalavimai ateityje. Pavyzdžiui, stebint juodąsias drūtagalves raines, pastebėta, kad, paveiktiems androgenų normaliems patinams arba patino požymių įgijusioms patelėms pasireiškia teritorinė agresija; stebint zebrines danijas, nustatyta, kad dėl estrogeninio arba antiandrogeninio poveikio sumažėja joms būdingo su pirmais saulės spinduliais prasidedančio poravimosi ir neršto aktyvumas.
38. Kai kurie išvaizdos aspektai (visų pirma, spalva), perkelti žuvis iš vienos aplinkos į kitą, gali greitai keistis, todėl kokybines pastabas svarbu užfiksuoti prieš pašalinant gyvūnus iš bandymo sistemos. Ligšiolinė juodųjų drūtagalvių raišių stebėsenos patirtis rodo, kad kai kurios endokrininė sistema veikiančios cheminės medžiagos iš pradžių gali sukelti šių išorės savybių pokyčius: kūno spalvos (pašviesėjimas arba patamsėjimas), spalvos tolygumo (vertikalių dryžių buvimas) ir kūno formos (galvos ir krūtinės srityje). Todėl žuvų fizinę išvaizdą reikia stebėti viso bandymo metu ir jo pabaigoje.

Humaniškas žuvų numarinimas

39. 21-ą dieną, t. y. pasibaigus veikimo chemine medžiaga laikotarpiui, žuvis reikia numarinti atitinkamu kiekiu 100–500 mg/l koncentracijos trikaino (trikaino metansulfonatas, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), buferizuoto 300 mg/l NaHCO₃ (natrio bikarbonatas, CAS 144-55-8), skirto gleivinės dirginimui sumažinti; paskui, kaip paaiškinta skirsnyje „Vitelogeninas“, vitelogenino kiekiui nustatyti imami kraujo ar audinių mėginiai.

Antrinių lytinių požymių stebėseną

40. Kai kurios endokrininė sistema veikiančios cheminės medžiagos gali sukelti specializuotų antrinių lytinių požymių (juodosios drūtagalvės rainės patino poravimosi gumburėlių, medakos patino spenelinių ataugų skaičiaus) pokyčius. Visų pirma, veikiant tam tikrus veikimo mechanizmus turinčioms cheminėms medžiagoms, priešingos lyties gyvūnams gali pasireikšti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., dėl androgenų receptorių agonistų, kaip antai trenbolono, metiltestosterono ir dihidrotestosterono, poveikio juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti aiškiai išreikšti poravimosi gumburėliai, o medakos patelėms – spenelinės ataugos (11, 20, 21). Taip pat pranešta, kad estrogenų receptorių agonistai gali sumažinti suaugusių patinų poravimosi gumburėlių skaičių ir sprando pagalvėlės dydį (25, 26). Atliekant tokius bendruosius morfologinius stebėjimus, galima gauti naudingos kokybinės ir kiekybinės informacijos, kuria būtų galima remtis ateityje nustatant galimus žuvų tyrimo reikalavimus. Juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių ir medakos spenelinių ataugų skaičių ir dydį galima nustatyti tiesiogiai, atliekant bandymą, arba – ne taip tiksliai – iš išsaugotų pavyzdžių. Rekomenduojamos juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antrinių lytinių požymių vertinimo procedūros pateiktos atitinkamai 5A ir 5B priedėliuose.

Vitelogeninas (VTG)

41. Kraujas paimamas iš uodegos arterijos ar venos, naudojant heparinizuotą kapiliarinį mikrohematokrito vamzdelį, arba švirkštu atliekant širdies punkciją. Atsižvelgiant į žuvies dydį, iš kiekvienos juodosios drūtagalvės rainės paprastai paimama po 5–60 µl, o iš kiekvienos zebrinės danijos – po 5–15 µl kraujo. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant ir iki vitelogenino nustatymo analizės kartu su proteazės inhibitoriais laikoma – 80 °C temperatūroje. Taip pat, kaip audinių šaltinis vitelogenino kiekiui nustatyti, medakos atveju bus naudojamos kepenys, o zebrinės danijos atveju gali būti naudojamas galvos ir (arba) uodegos homogenatas (6 priedėlis), VTG matavimas turėtų būti atliekamas taikant patvirtintą homologinį ELISA metodą, naudojant homologinius VTG standartus ir homologinius antikūnus. Rekomenduojama taikyti metodą, kuriuo VTG kiekį plazmoje galima nustatyti ng/ml lygmeniu (arba audiniuose ng/mg lygmeniu) – tai yra foninis lygmuo cheminių medžiagų poveikio nepatyrusio žuvies patino organizme.
42. Vitelogenino analizės kokybės kontrolė bus atliekama naudojant standartinius cheminių medžiagų rinkinius, atliekant tuščiuosius bandymus ir analizę atliekant bent dukart. Kiekvienam ELISA metodui reikėtų atlikti matricos efekto (mėginio skiedimo efekto) tyrimą mažiausiam mėginio skiedimo koeficientui nustatyti. Kiekvienoje VTG tyrimams naudojamoje IFA plokštelėje turėtų būti šie kokybės kontrolės mėginiai: bent šeši kalibravimo etalonai, apimantys numatomų vitelogenino koncentracijų diapazoną, ir bent vienas tuščiasis nespecifinio surišimo bandymas (kiekvieno iš jų tyrimas atliekamas po du kartus). Šių tuščiojo bandymo sugerties geba turėtų būti mažesnė nei 5 % didžiausios kalibravimo etalono sugerties gebos. Bus išanalizuotos bent dvi alikvotinės kiekvieno praskiesto mėginio dalys (kartotiniai bandiniai). Kartotinių bandinių, kurie skiriasi daugiau kaip 20 %, analizę reikėtų pakartoti.
43. Kalibravimo kreivių koreliacijos koeficientas (R^2) turėtų būti didesnis kaip 0,99. Tačiau didelės koreliacijos nepakanka tiksliai koncentracijos visuose diapazonuose prognozei užtikrinti. Turėtų būti ne tik užtikrinta pakankamai didelė kalibravimo kreivės verčių koreliacija, bet ir pagal kalibravimo kreivę apskaičiuota kiekvieno etalono koncentracija turėtų būti 70–120 % jo nominaliosios koncentracijos vertės ribose. Jeigu nominaliosios koncentracijos yra išsidėsčiusios toli nuo kalibravimo kreivės regresijos linijos (pvz., esant mažesnėms koncentracijoms), gali prireikti kalibravimo kreivę padalyti į mažų ir didelių verčių diapazoną arba taikyti nelineinį modelį, kad būtų galima tinkamai panaudoti sugerties gebos duomenis. Jeigu kreivę padalijama, abiejų linijinių segmentų R^2 turėtų būti didesnis kaip 0,99.
44. Aptikimo riba apibrėžiama kaip mažiausio analitinio etalono koncentracija, o kiekybinio nustatymo riba – kaip mažiausio analitinio etalono koncentracija, padauginta iš mažiausio skiedimo koeficiento.
45. Kiekvieną vitelogenino tyrimo atlikimo dieną bus išanalizuojamas sustiprintas mėginys, paruoštas naudojant pamatinį tyrimo etaloną (7 priedėlis). Numatomos ir išmatuotos koncentracijų santykis bus pateiktas kartu su kiekvienos tą dieną atliktų tyrimų grupės rezultatais.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Biologinių žymenų atsako vertinimas taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą

46. Galimam cheminės medžiagos poveikiui endokrininei sistemai nustatyti atsakas chemine medžiaga veikiamose ir kontrolinėse grupėse palygintas taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Jeigu naudojama tirpiklio kontrolė, reikėtų atlikti atitinkamą visų praskiesto vandens kontrolės ir tirpiklio kontrolės vertinamųjų baigčių statistinį testą. Rekomendacijas, kaip elgtis su praskiesto vandens ir tirpiklio kontrolės duomenimis atliekant tolesnę statistinę analizę, galima rasti EBPO leidinyje (2006c) (27). Visi biologinio atsako duomenys turėtų būti analizuojami ir pateikiami atskirai pagal lytį. Jeigu parametriniams metodams taikyti reikalingos prielaidos (nenormalus pasiskirstymas (pvz., Shapiro-Wilk kriterijus) arba heterogeninė sklaida (Bartlett arba Levene kriterijus) nepasitvirtina, reikėtų apsvarstyti galimybę transformuoti duomenis sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę arba atlikti svorinę dispersinę analizę. Darant prielaidą, kad dozės ir atsako priklausomybė yra nemonotoniška, daugkartiniams poriniams palyginimams gali būti taikomas Dunnett kriterijus (parametrinis) arba Mann-Whitney kriterijus su Bonferroni korekcija (nparametrinis). Kiti statistiniai kriterijai (pvz. Jonckheere-Terpstra arba Williams kriterijus) gali būti taikomi, jeigu dozės ir atsako priklausomybė yra daugmaž monotoniška. Siekiant padėti apsispręsti, kurį statistinį kriterijų geriausia taikyti, 8 priedėlyje pateikta statistinė srautų diagrama. Papildomos informacijos taip pat galima gauti iš EBPO „Dabartinių statistinės ekotoksiškumo duomenų analizės metodų dokumento“ (27).

Rezultatų ataskaita

47. Tyrimo duomenys turi apimti toliau nurodytą informaciją.

Bandyką atliekanti įstaiga:

- atsakingi darbuotojai ir jų pareigos atliekant tyrimą;
- kiekviena laboratorija turi būti įrodžiusi savo kompetenciją reprezentatyvių cheminių medžiagų naudojimo srityje.

Bandomoji cheminė medžiaga:

- bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas;
- fizinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;
- bandomųjų koncentracijų paruošimo metodas ir periodiškumas;
- informacija apie stabilumą ir biologinį skaidumą.

Tirpiklis:

- tirpiklio apibūdinimas (pobūdis, naudojama koncentracija);
- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

- rūšis ir veislė;
- tiekėjas ir konkreti tiekėjo įranga;
- žuvų amžius bandymo pradžioje ir reprodukcinė (neršto) būklė;
- išsamūs duomenys apie gyvūnų aklimatizavimo procedūrą;
- žuvų (iš žuvų išteklų paimto poėminio) kūno svoris veikimo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- taikyta bandymo procedūra (bandymo rūšis, įkrova, gyvūnų laikymo tankis ir t. t.);
- Pradinių tirpalų paruošimo metodas ir srauto greitis;
- nominaliosios bandomosios koncentracijos, kas savaitę matuojamos bandymo tirpalų koncentracijos ir taikomas analizės metodas, išmatuotų verčių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bandymo induose ir įrodymai, kad matavimai atitinka bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas tikrajame tirpale;
- skiedimo vandens savybės (įskaitant pH, kietumą, šarmingumą, temperatūrą, ištirpusio deguonies koncentraciją, chloro nuosėdų kiekį, bendrąją organinę anglį, suspenduotų kietųjų dalelių kiekį ir kitus atliktus matavimus);
- bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;
- išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašaro (-ų) rūšis, šaltinis, duodamas kiekis, šėrimo dažnumas ir, jeigu yra, atitinkamų teršalų (polichlorinuatų bifenilų, policiklinių aromatinių angliavandenilių ir chloro organinių pesticidų) nustatymo analizių rezultatai.

Rezultatai:

- įrodymai, kad kontroliniai indai atitiko bandymo priimtumo kriterijus;
- duomenys apie gaištamumą induose su bandomosiomis koncentracijomis ir kontroliniame inde;
- taikyti statistiniai analizės metodai, duomenų apdorojimas ir taikomų metodų pagrindimas;
- bendrųjų morfologinių stebėjimų duomenys, įskaitant apie antrinius lytinius požymius ir vitelogeniną;
- duomenų analizių rezultatai, pageidautina – lentelių ir grafikų forma;
- neįprastų žuvų reakcijų dažnumas ir visi matomi bandomosios cheminės medžiagos poveikiai.

BANDYMO REZULTATŲ AIŠKINIMO IR PRIPAŽINIMO REKOMENDACIJOS

48. Šiame skirsnyje analizuojami parametrai, į kuriuos reikia atsižvelgti aiškinant per bandymą atlikto įvairių vertinamųjų baigčių matavimo rezultatus. Rezultatus reikėtų vertinti atsargiai, jeigu atrodo, kad bandomoji cheminė medžiaga sukėlė akivaizdų toksinį poveikį arba paveikė bendrą bandomojo gyvūno būklę.
49. Kad duomenų aiškinimas būtų patikimas, nustatant bandomąsias koncentracijas reikėtų užtikrinti, kad nebūtų viršyta didžiausia toleruojama koncentracija. Svarbu naudoti bent vieną cheminės medžiagos koncentraciją, dėl kurios neatsiranda toksinio poveikio požymių. Ligos ir toksinio poveikio požymius reikėtų atidžiai vertinti ir nurodyti. Pavyzdžiui, yra galimybė, kad VTG gamybai patelių organizme įtakos taip pat gali turėti bendrasis toksiškumas ir medžiagų, kurioms būdingas ne endokrininis toksiškumas (pvz., toksinis poveikis kepenims), poveikis. Tačiau poveikio aiškinimas gali tapti patikimesnis naudojant kitas cheminės medžiagos dozes, kurios nėra susijusios su sisteminiu toksiškumu.
50. Yra keli aspektai, kuriuos reikia apsvarstyti prieš pripažįstant bandymo rezultatus. Orientuojamasi į tai, kad VTG kiekis kontrolinėse juodosios drūtagalvės rainės ir zebrinės danijos patinų ir patelių grupėse turėtų skirtis maždaug trimis eilėmis, o medakos patinų ir patelių grupėse – maždaug viena eile. Verčių, su kuriomis susiduriama kontrolinėse ir doze veikiamose grupėse, diapazono pavyzdžiai pateikiami tinkamumo patvirtinimo ataskaitose (1, 2, 3, 4). Esant dideliems VTG kiekiams kontrolinių patinų organizme, gali kilti abejonių dėl tyrimo jautrumo ir gebėjimo nustatyti silpnus estrogenų agonistus. Esant dideliems VTG kiekiams kontrolinių patinų organizme, gali kilti abejonių dėl tyrimo jautrumo ir gebėjimo nustatyti silpnus estrogenų agonistus. Tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti šioms rekomendacijoms parengti.
51. Jeigu laboratorija anksčiau nė karto nebuvo atlikusi tokio tyrimo arba buvo padaryti reikšmingi pakeitimai (pvz., pakeista žuvų veislė ar tiekėjas), patartina atlikti techninės kompetencijos tyrimą. Rekomenduojama naudoti chemines medžiagas, kurios veikia keliais būdais arba turi poveikį kelioms bandymo vertinamosioms baigtims. Iš tikrųjų kiekvienai laboratorijai rekomenduojama kurti savo patinų ir patelių duomenų bazę ir atlikti estrogeninio veikimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-estradioliu (100 ng/l) arba žinomu silpnu agonistu), dėl kurios padidėja VTG kiekis žuvų patinų organizme, aromatazės slopinimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., fadrozolu arba prochlorazu (300 μg/l), dėl kurios sumažėja VTG kiekis žuvų patelių organizme, ir androgeninio veikimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-trenbolonu (5 ng/l), dėl kurios juodosios drūtagalvės rainės ir medakos patelės igauna antrinių lytinių požymių. Laboratorijos kompetencijai užtikrinti visus šiuos duomenis galima palyginti su turimais tinkamumo patvirtinimo tyrimų (1, 2, 3) duomenimis.
52. Apskritai išmatuotos vitelogenino vertės turėtų būti laikomos teigiamomis, jeigu VTG kiekis yra statistiškai reikšmingai padidėjęs patinų organizme ($p < 0,05$) arba statistiškai reikšmingai sumažėjęs patelių organizme ($p < 0,05$), bent didžiausios bandomosios dozės lygmeniu, palyginti su kontroline grupe, ir nesant bendrojo toksiškumo požymių. Teigiamas rezultatas dar patvirtinamas pademonstruojant biologiškai galimą dozės ir atsako kreivių sąryšį. Kaip minėta pirmiau, vitelogenino kiekio sumažėjimas gali būti ne vien endokrininės kilmės, tačiau teigiamas rezultatas paprastai turėtų būti aiškinamas kaip poveikio endokrinei sistemai *in vivo* įrodymas, o tokiu atveju paprastai turėtų būti imtasi veiksmų papildomai informacijai gauti.

NUORODOS

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23 (3):774-81.
 - (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,“ not „traffic lights,“ in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22
-

*1 priedėlis***Santrumpos ir apibrėžtys**

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

VK – variacijos koeficientas.

IFA (ELISA) – imunofermentinė analizė.

Įkrova – drėgna žuvų masė vandens tūrio vienetu.

Gyvūnų laikymo tankis – žuvų skaičius vandens tūrio vienetu.

VTG (vitelogeninas) – fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

PHL ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

DTK – didžiausia toleruojama koncentracija, sudaranti apie 10 % LC50 (vidutinės mirtinos koncentracijos).

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri pagal šį bandymo metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Bandymo sąlygos atliekant poveikį žuvų endokrinei sistemai nustatyti skirtą atrankos tyrimą

1. Rekomenduojamos rūšys	Juodoji drūtagalvė rainė (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrinė danija (<i>Danio rerio</i>)
2. Bandymo rūšis	Pratekamojo srauto	Pratekamojo srauto	Pratekamojo srauto
3. Vandens temperatūra	25 ± 2° C	25 ± 2° C	26 ± 2° C
4. Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)
5. Šviesos stipris	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)
6. Šviesos laikotarpis (aušros ir sutemų imitavimas galimas, bet nelaikomas privalomu)	16 val. šviesos, 8 val. tamsos	12–16 val. šviesos, 12–8 val. tamsos	12–16 val. šviesos, 12–8 val. tamsos
7. Įkrova	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui
8. Bandymo akvariumo tūris	10 l (mažiausiai)	2 l (mažiausiai)	5 l (mažiausiai)
9. Bandymo tirpalo tūris	8 l (mažiausiai)	1,5 l (mažiausiai)	4 l (mažiausiai)
10. Bandymo tirpalų keitimas	Mažiausiai 6 kartus per parą	Mažiausiai 5 kartus per parą	Mažiausiai 5 kartus per parą
11. Bandomųjų organizmų amžius	Žr. 20 punktą.	Žr. 20 punktą.	Žr. 20 punktą.
12. Apytikslė drėgna suaugusios žuvies masė (g)	Patelės: 1,5 ± 20 % Patinai: 2,5 ± 20 %	Patelės: 0,35 ± 20 % Males: 0,35 ± 20 %	Patelės: 0,65 ± 20 % Patinai: 0,4 ± 20 %
13. Žuvų skaičius viename bandymo inde	6 (2 patinai ir 4 patelės)	10 (5 patinai ir 5 patelės)	10 (5 patinai ir 5 patelės)
14. Bandymų su cheminės medžiagos dozėmis skaičius	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)
15. Vienam bandymui naudojamų indų skaičius	Bent 4	Bent 2	Bent 2
16. Viena bandomąja koncentracija veikiamų žuvų skaičius	16 suaugusių patelių ir 8 suaugusių patinų (po 4 patelės ir 2 patinus kiekviename kartotiniame inde)	10 suaugusių patelių ir 10 suaugusių patinų (po 5 patelės ir 5 patinus kiekviename kartotiniame inde)	10 suaugusių patelių ir 10 suaugusių patinų (po 5 patelės ir 5 patinus kiekviename kartotiniame inde)

17. Šėrimo režimas	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai du ar tris kartus per parą (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai du ar tris kartus per parą (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys
18. Aeracija	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės
19. Skiedimo vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo
20. Paruošiamasis laikotarpis	7 dienos (rekomenduojama)	7 dienos (rekomenduojama)	7 dienos (rekomenduojama)
21. Veikimo chemine medžiaga trukmė	21 diena	21 diena	21 diena
22. Biologinės vertinamosios baigtys	išgyvenamumas elgesys antriniai lytiniai požymiai VTG	išgyvenamumas elgesys antriniai lytiniai požymiai VTG	išgyvenamumas elgesys VTG
23. Bandymo priimtumo kriterijai	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 25 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 24 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 26 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.

3 priedėlis

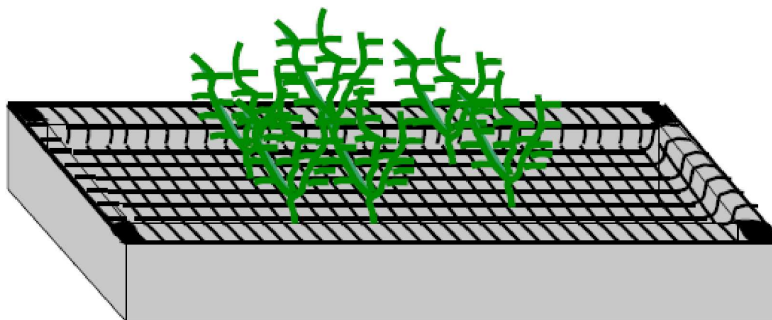
Kai kurios tinkamo skiedimo vandens cheminės savybės

Sudedamoji dalis	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloro kiekis	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

4A priedėlis

Neršto substratas zebrinei danijai

Padėklas nerštui – visiškai iš stiklo pagamintas instrumentinis indas, pvz., 22 × 15 × 5,5 cm (ilgis x plotis x gylis), uždenktas nuimamu nerūdijančio plieno tinkleliu (su 2 mm pločio akutėmis). Tinklelio pagrindas turėtų būti žemiau instrumentinio indo kraštų.



Ant tinklelio turėtų būti suformuotas neršto substratas. Jis turi sudaryti struktūrą, į kurią žuvis galėtų įplaukti. Pavyzdžiui, tam tinka dirbtiniai akvariumo augalai, pagaminti iš žalio plastiko (pastaba: reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos įgertį į plastiką). Plastikinius augalus reikėtų pakankamai ilgai mirkyti pakankamame šilto vandens kiekyje, kad būtų užtikrinta, jog jokios cheminės medžiagos nepateks į bandomąjį vandenį. Naudojant stiklines medžiagas, turėtų būti užtikrinta, kad žuvis negalėtų susižeisti ir nebūtų varžomi jų energingi judesiai.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų neršiama už padėklo ribų, atstumas nuo padėklo iki stiklo sienelių turėtų siekti bent 3 cm. Ant padėklo padėti ikreliai iškrenta pro tinklelį ir jų mėginius galima paimti praėjus 45–60 min nuo apšvietimo pradžios. Skaidrūs ikreliai nėra sulipę ir juos lengvai galima suskaičiuoti naudojant transversinę šviesą. Viename inde laikant penkias pateles, ikrelių skaičius gali būti laikomas mažu, jeigu jų padedama 20 arba mažiau per parą, vidutiniu, jeigu jų padedama iki 100, ir dideliu, jeigu jų padedama daugiau kaip 100. Padėklas nerštui turi būti išimamas, ikreliai surenkami ir padėklas vėl įdedamas į bandymo indą kuo vėliau vakare arba kuo anksčiau ryte. Padėklas turėtų būti grąžintas į bandymo indą ne vėliau kaip per valandą, nes kitaip neršto substratas gali sukelti individualų poravimąsi ir nerštą neįprastu laiku. Jeigu pagal situaciją padėklą nerštui reikia įdėti vėliau, tai reikėtų padaryti ne mažiau kaip per devynias valandas nuo apšvietimo pradžios. Tokiu vėlyvu paros metu nerštas nebevyksta.

4B priedėlis

Neršto substratas juodajai drūtagalvei rainei

Į kiekvieną bandymo akvariumą įdedama po dvi ar tris neršto slėptuves ir padėklus, pagamintus iš plastiko, keramikos ir stiklo derinio arba iš nerūdijančio plieno (pvz., 80 mm ilgio pilką pusapvalį lataką, padėtą ant 130 mm ilgio padėklo su užlenktais kraštais.) (žr. pav.). Įrodyta, kad tinkamai pagamintos polivinilchlorido ar keraminės slėptuvės yra tinkamos naudoti kaip neršto substratas (Thorpe ir kiti, 2007).

Rekomenduojama slėptuves pabrūžinti, kad pagerėtų sulipimas. Padėklą taip pat reikia tikrinti, kad žuvis negalėtų pasiekti nukritusių ikrelių, nebent būtų įrodyta, kad ikreliai efektyviai prilimpa prie naudojamo neršto substrato.



Padėklo pagrindas skirtas visiems prie slėptuvės paviršiaus neprilipusiems, taigi į akvariumo dugną nukrisiantiems ikreliams (arba ikreliams, padėtiems tiesiai ant plokščio plastikinio pagrindo) surinkti. Prieš naudojant, visi substratai bent 12 valandų turėtų būti mirkomi skiedimo vandenyje.

NUORODA

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

5A priedėlis

Juodosios drūtagalvės rainės antrinių lytinių požymių vertinimas tam tikroms endokrininę sistemą veikiančioms cheminėms medžiagoms nustatyti**Apžvalga**

Suaugusių juodųjų drūtagalvių rainių fizinės išvaizdos ypatybės, kurios gali būti svarbios atliekant endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymą, yra kūno spalva (t. y. pašviesėjimas arba patamsėjimas), spalvos tolygumas (t. y. vertikalių dryžių buvimas arba nebuvimas), kūno forma (t. y. galvos ir krūtinės srities forma, pilvo išsipūtimas) ir specializuoti antriniai lytiniai požymiai (t. y. poravimosi gumburėlių skaičius ir dydis, sprando pagalvėlės dydis ir kiaušdėtis).

Poravimosi gumburėliai yra ant aktyvaus reprodukcinio amžiaus juodosios drūtagalvės rainės patino galvos (sprando pagalvėlės) ir paprastai yra simetriškai išsidėstę iš abiejų pusių (Jensen ir kiti, 2001). Kontrolinės patelės ir abiejų lyčių žuvų jaunikliai gumburėlių neturi (Jensen ir kiti, 2001). Aplink patinų akis ir tarp jų šnervių gali būti iki aštuonių atskirų gumburėlių. Daugiausia (ir didžiausią) gumburėlių yra išsidėstę dviem lygiagrečiomis linijomis iš karto po šnervėmis ir virš burnos. Daugelis žuvų turi gumburėlių grupes po apatiniu žandu; arčiausiai burnos paprastai yra pavienės poros, o arčiau pilvo esančią grupę gali sudaryti iki keturių gumburėlių. Faktinis gumburėlių skaičius retai viršija 30 (paprastai 18–28; Jensen ir kiti, 2001). Dažniausiai gumburėliai (kalbant apie jų skaičių) yra vientisa, palyginti apvali struktūra, kurios aukštis apytiksliai atitinka plotį. Dauguma aktyvaus reprodukcinio amžiaus patinų taip pat turi bent kelis gumburėlius, kurie yra padidėję ir aiškiai išreikšti taip, kad jų neįmanoma atskirti kaip individualių struktūrų.

Veikiant kai kurių rūšių endokrininę sistemą ardančioms cheminėms medžiagoms, priešingos lyties gyvūnams gali pasireikšti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., dėl androgenų receptorių agonistų, kaip antai 17β-metiltosterono ar 17β-trenbolono, poveikio juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti poravimosi gumburėliai (Smith, 1974; Ankley ir kiti, 2001; 2003), o patinams dėl estrogenų receptorių agonistų poveikio gali sumažėti poravimosi gumburėlių skaičius arba dydis (Miles-Richardson ir kiti, 1999; Harries ir kiti, 2000).

Toliau pateiktas juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių apibūdinimas, parengtas remiantis JAV procedūromis, taikytomis JAV Aplinkos apsaugos agentūros Duluto (Minesota) laboratorijoje. Tam tikrus produktus ir (arba) įrangą galima pakeisti panašiomis turimomis medžiagomis.

Tyrimą geriausia atlikti naudojant padidinimo stiklą su pašvietimu arba 3X stereoskopą su pašvietimu. Žuvis tiriama iš nugaros pusės, priešakine dalimi į priekį (galva nukreipta į tyrėjo pusę).

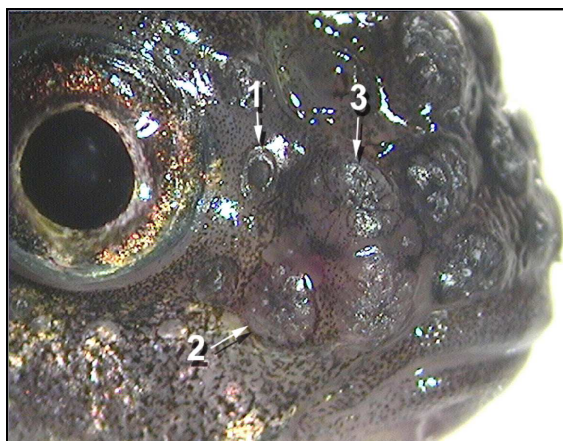
- Įdėkite žuvį į mažą Petri lėkštelę (pvz., 100 mm skersmens), priešakine dalimi į priekį ir pilvu į apačią. Nustatykite vaizdo iškliklį taip, kad matytųsi gumburėliai. Atsargiai ir lėtai paverskite žuvį nuo vieno šono ant kito, kad nustatytumėte gumburėlių sritis. Suskaičiuokite ir įvertinkite gumburėlius.
- Pakartokite žuvies galvos tyrimą iš pilvo pusės Petri lėkštelėje padėdami žuvį ant nugaros, priešakine dalimi į priekį.
- Kiekvienos žuvies tyrimą reikėtų atlikti per dvi minutes.

Gumburėlių skaičiavimas ir vertinimas

Nustatytos šešios konkrečios juodosios drūtagalvės rainės kūno sritys, kuriose reikia įvertinti gumburėlių buvimą ir vystymąsi. Esamų gumburėlių vietai ir kiekiui sužymėti parengta lentelė (žr. šio priedėlio pabaigą). Gumburėlių skaičius registruojamas, o jų dydis kiekviename organizme gali būti kiekybiškai įvertintas taip: 0 – nėra, 1 – yra, 2 – padidėjęs ir 3 – aiškiai išreikštas (1 pav.).

Įvertis 0 – gumburėlių nėra. Įvertis 1 – gumburėlių yra, jie nustatomi kaip bet kuris vieną viršūnę turintis gumburėlis, kurio aukštis beveik lygus pločiui (skersmeniui). Įvertis 2 – padidėję gumburėliai, nustatomi pagal tai, kad jų audiniai pagal išvaizdą primena žvaigždutę, paprastai didelio skersmens, su išeinančiais iš centro grioveliais ir kanalėliais. Gumburėlių viršus dažnai yra nelygus, bet kartais gali būti kiek suapvalintas. Įvertis 3 – gumburėliai aiškiai išreikšti, paprastai gana dideli ir suapvalinti, turi mažiau apibrėžtą struktūrą. Kartais šie gumburėliai susilieja ir sudaro vientisą masę vienoje arba kelyse srityse (B, C ir D, apibūdinta toliau). Spalva ir forma panašios į 2 balais įvertintų gumburėlių, bet kartais gali būti gana silpnai išreikštos. Naudojant šią vertinimo sistemą, ant normalaus kontrolinio patino, turinčio 18–20 gumburėlių, paprastai suskaičiuojama mažiau kaip 50 gumburėlių, (Jensen ir kiti, 2001).

1 pav.



Faktiškai kai kurios žuvys gali turėti daugiau gumburėlių negu lentelėje yra konkrečiai vertinamai sričiai skirtų langelių (A priedėlis). Jeigu taip atsitinka, papildomi įverčiai gali būti įrašomi į langelį arba jo dešinėje ar kairėje. Todėl lentelė nebūtinai turi būti simetriška. Taikant kitą suporuotų arba vertikaliai palei horizontaliąją burnos liniją sujungtų gumburėlių žymėjimo metodiką, dviejų gumburėlių įverčiai galėtų būti įrašomi į vieną langelį.

Žymėjimo sritys:

A – aplink akis išsidėstę gumburėliai. Jie žymimi iš nugaros ir pilvo pusės aplink išorinį akies kraštą. Paprastai daug jų turi subrendę kontroliniai patinai, o kontrolinės patelės jų neturi; paprastai jie yra išsidėstę poromis (po vieną prie kiekvienos akies) arba po vieną jų turi androgenų veikiamos patelės.

B – tarp šnervių esantys gumburėliai (sensorinio kanalo poros). Ant kontrolinių patinų šie gumburėliai paprastai išsidėstę poromis ir yra labiau išsivystę (du padidėję arba trys aiškiai išreikšti). Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau kartais jie atsiranda ir vystosi androgenais veikiamoms patelėms.

C – gumburėliai, esantys iš karto priešais šnerves, lygiagrečiai burnai. Paprastai tokie subrendusių kontrolinių patinų gumburėliai yra padidėję arba aiškiai išreikšti. Jų turi mažiau išsivystę patinai arba androgenais veikiamos patelės (jie gali būti padidėję).

D – lygiagrečiai palei burnos liniją išsidėstę gumburėliai. Paprastai tokie kontrolinių patinų gumburėliai vertinami kaip išsivystę. Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau turi androgenais veikiamos patelės.

E – ant apatinio žando, arti burnos esantys gumburėliai, paprastai maži ir išsidėstę poromis. Kontroliniai ar cheminėmis medžiagomis veikiami patinai, taip pat jomis veikiamos patelės turi įvairių jų kiekių.

F – gumburėliai, esantys pilvo pusėje, po E sritimi. Paprastai būna maži ir išsidėstę poromis. Jų turi kontroliniai patinai ir androgenais veikiamos patelės.

NUORODOS

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquat Toxicol 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Can J Zool 52:1031-1038.

Gumburėlių žymėjimo lentelė

Atpažinties Nr. _____

Data _____

Bendras įvertis _____

Skaitinis įvertis

1 – yra

2 – padidėjęs

3 – aiškiai išreikštas

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

5B priedėlis

Medakos antrinių lytinių požymių vertinimas tam tikroms endokrininę sistemą veikiančioms cheminėms medžiagoms nustatyti

Toliau pateiktas spenelių ataugų (*), kurios yra medakos (*Oryzias latipes*) antriniai lytiniai požymiai, matavimo aprašymas.

(*) Spenelinės ataugos paprastai atsiranda tik pas suaugusius patinus ir būna tarp antro ir septinto arba aštunto analinio peleko spindulio, skaičiuojant nuo analinio peleko užpakalinio galo (1 ir 2 pav.). Tačiau ataugos retai atsiranda ant pirmo peleko spindulio nuo analinio peleko užpakalinio galo. Pagal šią standartinę veiklos procedūrą (SVP) galima matuoti ant pirmo peleko spindulio esančias ataugas (pagal šią SVP peleko spinduliai skaičiuojami nuo analinio peleko užpakalinio galo).

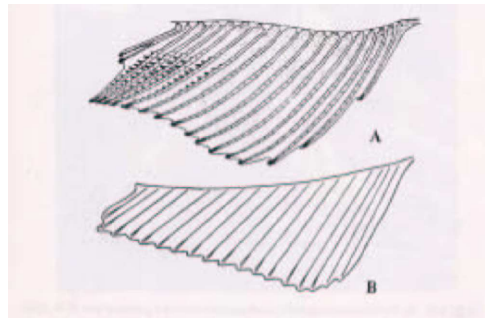
- 1) Pašalinus kepenis (6 priedėlis) skerdena įdedama į kūginį vamzdelį, kuriame yra apie 10 ml 10 % neutralaus buferizuoto formalino tirpalo (galva viršuje, uodega apačioje). Jeigu lytinė liauka fiksuota kitame tirpale nei 10 % neutralus buferizuotas formalinas, preparavimo peiliu atsargiai, kad neužkliudytumėte gonoporo ir pačios lytinės liaukos, padarykite skerdenoje skersinį pjūvį tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės (3 pav.). Galvinę žuvies kūno dalį įdėkite į fiksavimo tirpalą, kad būtų išsaugota lytinė liauka, o uodeginę kūno dalį – į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą, kaip aprašyta pirmiau.
- 2) Žuvies kūną įdėję į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą, suimkite priekinę analinio peleko dalį pincetu ir 30–čiai sekundžių ją sulenkite taip, kad analinis pelekas būtų atviras. Suimdami pincetu analinį peleką, atsargiai, kad nebūtų pažeistos spenelinės ataugos, suimkite kelis priekinėje dalyje esančius peleko spindulius.
- 3) Palaike analinį peleką atvirą apie 30 sekundžių, iki spenelių ataugų matavimo žuvies kūną įdėkite į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą ir laikykite kambario temperatūroje (matavimas turi būti atliekamas mažiausiai po 24 valandų).

Matavimas

- 1) Bent 24 valandas palaike žuvies kūną 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale, išimkite skerdeną iš kūginio vamzdelio ir nuvalykite formaliną filtravimo popieriumi (arba popierine servetėle).
- 2) Padėkite žuvį pilvu į viršų. Tada atsargiai nukirpkite analinį peleką mažomis skrodimo žirkklėmis (pageidautina analinį peleką nukirpti su nedideliu kiekiu pterigioforo).
- 3) Pincetu suimkite priekinę atskirto analinio peleko dalį ir padėkite ją ant stiklinės plokštelės su keliais vandens lašais. Tada analinį peleką uždenkite dengiamuoju stikleliu. Suimdami analinį peleką pincetu, stenkitės nepažeisti spenelių ataugų.
- 4) Suskaičiuokite sujungtas plokšteles, ant kurių yra spenelių ataugų, naudodami po biologiniu (tiesioginės šviesos arba invertuotu) mikroskopu esantį skaitiklį. Spenelinės ataugos atpažįstamos, kai ant užpakalinės sujungtos plokštelės dalies matomi nedideli ataugų dariniai. Technologiškai lape įrašykite kiekvieno peleko spindulio sujungtų plokštelių, ant kurių yra spenelių ataugų, skaičių (pvz., pirmas peleko spindulys – 0, antras peleko spindulys – 10, trečias peleko spindulys – 12, ir t. t.) ir įrašykite šių skaičių sumą kiekvienai atskirai žuviai į Excel skaičiuoklę. Prireikus nufotografuokite analinį peleką ir ant nuotraukos suskaičiuokite sujungtas plokšteles, ant kurių yra spenelių ataugų.
- 5) Atlikę matavimus, įdėkite analinį peleką į 1 punkte aprašytą kūginį vamzdelį ir laikykite jį ten.

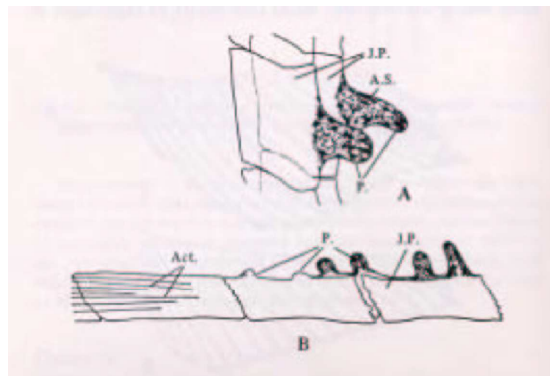
1 pav.

Diagramoje parodyti analinio peleko formos ir dydžio skirtumai pagal lytį. A – patino, B – patelės. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



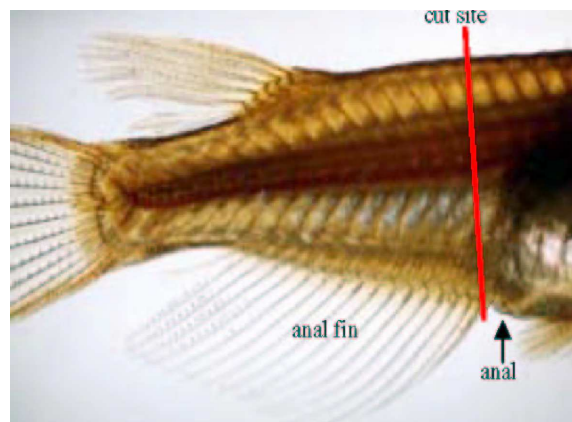
2 pav.

A – ataugos ant sujungtų analinio peleko spindulio plokštelių. J.P. – sujungta plokštelė; A.S. – ašies erdvė; P – atauga. B – distalinis analinio peleko galas. Aktinotrichijos (Act.) yra ant galiuko. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



3 pav.

Nuotraukoje parodyta pjūvio vieta, kai lytinė liauka fiksuojama kitame fiksavimo tirpale nei 10 % neutralus buferizuotas formalino tirpalas. Tokiu atveju likusi kūno dalis bus nupjauta preparavimo peiliu (raudona linija) darant pjūvį tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės ir galvinė žuvies kūno dalis bus įdėta į lytinės liaukos fiksavimo tirpalą, o uodeginė dalis – į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą.



6 priedėlis

Rekomenduojamos mėginių ėmimo vitelogenino analizei atlikti procedūros

Reikėtų stengtis išvengti kryžminio patinų ir patelių VTG mėginių užteršimo.

1A procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Po anestezijos uodegos kotelis dalinai nupjaunamas skalpeliu ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu kapiliariniu mikrohematokrito vamzdeliu paimamas kraujas. Paėmus kraujo, plazma greitai atskiriama 3 minutes centrifuguojant 15 000 g/min greičiu (arba 10 minučių 15 000 g/min greičiu esant 4 °C temperatūrai). Jeigu norima, hematokrito procentą galima nustatyti po centrifugavimo. Tada plazma pašalinama iš mikrohematokrito vamzdelio ir iki vitelogenino analizės laikoma centrifuginiame mėgintuvėlyje su 0,13 vienetų aprotinino (proteazės inhibitoriaus) – 80 °C temperatūroje. Atsižvelgiant į juodosios drūtagalvės rainės dydį (kuris priklauso nuo lyties), iš vienos žuvies paprastai surenkama 5–60 mikrolitrų plazmos (Jensen ir kiti, 2001).

1B procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš širdies

Kraują taip pat galima paimti heparinizuotu švirkštu (1 000 vienetų heparino vienam ml) atliekant širdies punkciją. Kraujas perpilamas į Eppendorfo mėgintuvėlius (laikomus ant ledo), o tada centrifuguojamas (5 min, 7 000 g, kambario temperatūra). Iki analizės plazmą reikėtų perpilti į švarius Eppendorfo mėgintuvėlius (alikvotinėmis dalimis, jeigu plazmos kiekis yra pakankamas) ir greitai užšaldyti – 80 °C temperatūroje (Panter ir kiti, 1998).

2A procedūra. Japoninė medaka, medakos kepenų pašalinimas

Bandomosios žuvies išėmimas iš bandymo akvariumo

- (1) Bandomąją žuvį iš bandymo akvariumo reikėtų išimti naudojant mažą sietelį. Būkite atsargūs, kad neįmestumėte bandomosios žuvies į kitus bandymo akvariumus.
- (2) Iš esmės bandomosios žuvys iš indų turėtų būti išimamos tokia eilės tvarka: kontrolė, tirpiklio kontrolė (jeigu taikytina), mažiausia koncentracija, vidutinė koncentracija, didžiausia koncentracija ir teigiama kontrolė. Be to, prieš išimant pateles, iš bandymo akvariumo reikėtų išimti visus patinus.
- (3) Kiekvienos bandomosios žuvies lytis nustatoma pagal išorės antrinius lytinius požymius (pvz., analinio peleko formą).
- (4) Įdėkite bandomąją žuvį į nešiojamąją talpyklą ir perneškite į darbo vietą kepenims pašalinti. Patikrinkite, ar bandymo akvariumo ir nešiojamosios talpyklos etiketės yra tikslios, ir įsitikinkite, kad iš bandymo akvariumo pašalintų ir jame likusių žuvų skaičius yra toks, kaip numatyta.
- (5) Jeigu lyties neįmanoma nustatyti pagal žuvies išorę, iš bandymo akvariumo išimkite visas žuvis. Tokiu atveju lytis turėtų būti nustatoma lytinę liauką arba antrinius lytinius požymius tiriant stereoskopiniu mikroskopu.

Kepenų pašalinimas

- (1) Mažu sieteliu perkelti bandomąją žuvį iš nešiojamosios talpyklos į anestezinį tirpalą.
- (2) Anestezavę bandomąją žuvį, (paprastu) pincetu perkelti ją ant filtravimo popieriaus (arba popierinės servetėlės). Kad nesulaužytumėte uodegos, bandomąją žuvį pincetu suimkite už galvos šonų.
- (3) Nuvalykite vandenį nuo bandomosios žuvies paviršiaus filtravimo popieriumi (arba popierine servetele).
- (4) Padėkite žuvį pilvu į viršų. Tada skrodimo žirkklėmis padarykite mažą skersinę įpjovą nuo pilvo pusės kaklo srities iki pilvo vidurio.

- (5) Įkiškite skrodimo žirkles į šią mažą įpjovą ir prapjaukite pilvą nuo užpakalinės žiaunų dalies iki galvinės išangės pusės išilgai vidurinės pilvo linijos. Stenkitės neįkišti žirklių pernelyg giliai, kad nebūtų pažeistos kepenys ir lytinė liauka.
- (6) Tolesnius veiksmus atlikite po stereoskopiniu mikroskopu.
- (7) Padėkite žuvį pilvu į viršų ant popierinės servetėlės (taip pat ją galima įdėti į stiklinę Petri lėkštelę arba ant stiklinės plokštelės).
- (8) Praplėskite pilvo ertmės sienelės plonu pincetu ir išimkite vidaus organus. Vidaus organus taip pat galima išimti prireikus pašalinant vieną pilvo ertmės sienelės pusę.
- (9) Atverkite sujungtą kepenų ir tulžies pūslės dalį naudodami kitą plonų pincetų porą. Tada pincetu suimkite tulžies lataką ir nupjaukite tulžies pūslę. Stenkitės nesuplėšyti tulžies pūslės.
- (10) Suimkite stemplę ir tokiu pat būdu atskirkite virškinimo traktą nuo kepenų. Stenkitės neišpilti virškinimo trakto turinio. Atskirkite užpakalinę virškinimo trakto dalį nuo išangės ir išimkite traktą iš pilvo ertmės.
- (11) Pašalinkite riebalų ir kitų aplink kepenis esančių audinių masę. Stenkitės nepažeisti kepenų.
- (12) Suimkite už kepenų vartų venos srities plonu pincetu ir išimkite kepenis iš pilvo ertmės.
- (13) Padėkite kepenis ant stiklinės plokštelės. Plonu pincetu prireikus pašalinkite visus likusius riebalus ir išorinius audinius (pvz., pilvo sienelę) nuo kepenų paviršiaus.
- (14) Pasverkite kepenis elektroninėmis analitinėmis svarstyklėmis, kaip tarą naudodami 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Gautą vertę užrašykite technologiniame lape (0,1 mg tikslumu). Patikrinkite mikromėgintuvėlio etiketėje pateiktą atpažinties informaciją.
- (15) Uždarykite mikromėgintuvėlį su kepenimis dangteliu. Įdėkite jį į šaldymo stovą (arba stovą su ledu).
- (16) Pašalinę kepenis, išvalykite skrodimo instrumentus arba pakeiskite juos švariais.
- (17) Pagal pirmiau aprašytą procedūrą pašalinkite kepenis iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų.
- (18) Pašalinus kepenis iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų (t. y. visų bandymo akvariume laikomų patinų ir patelių), visus kepenų bandinius su identifikacinėmis etiketėmis sudėkite į mėgintuvėlių stovą ir padėkite jį į šaldiklį. Jeigu kepenys paruošiamajam apdorojimui atlikti pateikiamos netrukus po jų pašalinimo, bandiniai į kitą darbo vietą pernešami šaldymo stovė (arba stovė su ledu).

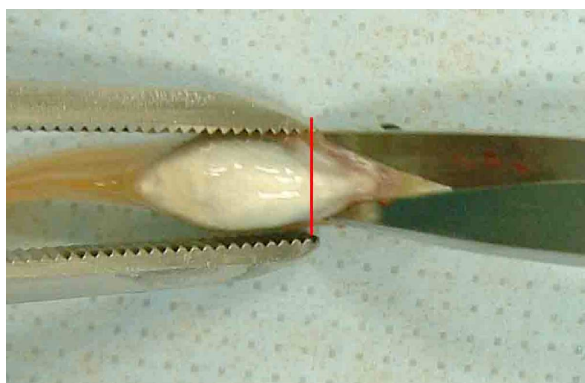
Pašalinus kepenis, žuvies skerdeną galima naudoti antriniams lytiniais požymiams įvertinti.

Bandinys

Jeigu iš bandomųjų žuvų paimti kepenų bandiniai nepanaudojami paruošiamajam apdorojimui atlikti netrukus po jų pašalinimo, laikykite juos ≤ -70 °C temperatūroje.

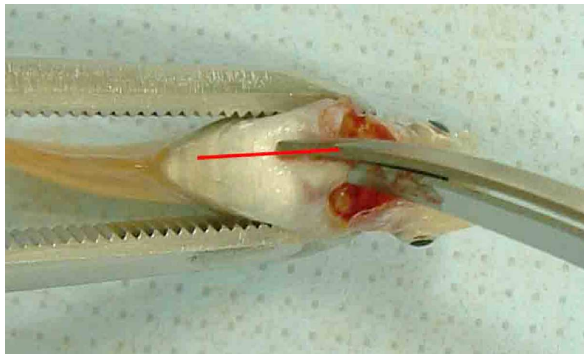
1 pav.

Vieta priešais krūtinės pelekus prapjaunama žirkėmis.



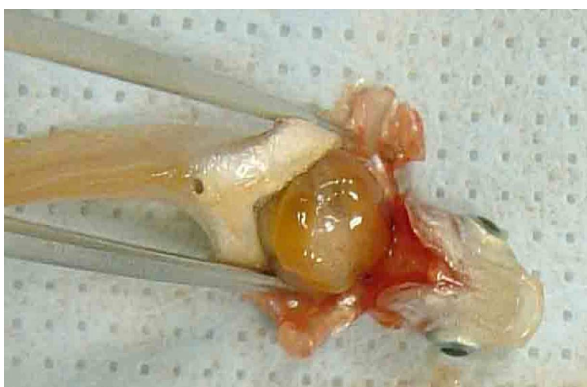
2 pav.

Pilvas prapjaunamas žirkklėmis išilgai vidurinės pilvo linijos nuo taško, esančio maždaug 2 mm nuo kaukolės, iki išangės.



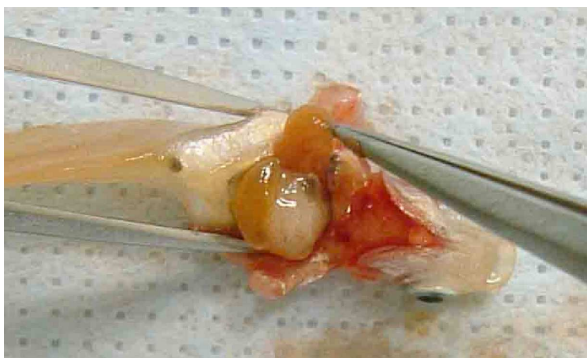
3 pav.

Pilvo sienelės praskečiamos chirurginėmis žnyplėmis, kad būtų galima išimti kepenis ir kitus vidaus organus. (Taip pat pilvo sienelės galima prispausti iš šonų).



4 pav.

Kepenys buikai prapjaunamos ir išimamos chirurginėmis žnyplėmis.



5 pav.

Žarnynas atsargiai atitraukiamas chirurginėmis žnyplėmis.



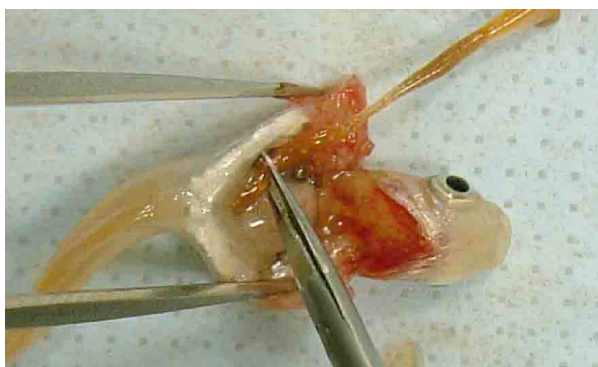
6 pav.

Abu žarnyno galai ir prisitvirtinusi žarnaplėvė atskiriami žirkklėmis.



7 pav. (patelė)

Tokia pati procedūra atliekama su patele.



8 pav.

Procedūra baigta.



2B procedūra. Japoninė medaka (*Oryzias latipes*), kepenų paruošimas vitelogenino analizei

Iš IFA rinkinio paimkite homogenizavimo buferio buteliuką ir atvėsinkite jį smulkintu ledu (tirpalo temperatūra – $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Jeigu naudojamas homogenizavimo buferis iš EnBio IFA rinkinio, palikite tirpalą atšilti kambario temperatūroje, o tada atvėsinkite smulkintu ledu.

Apskaičiuokite kepenims reikalingą homogenizavimo buferio kiekį pagal kepenų svorį (homogenatui paruošti vienam kepenų mg naudokite 50 μl homogenizavimo buferio). Pavyzdžiui, jeigu kepenys sveria 4,5 mg, reikia 225 μl homogenizavimo buferio. Paruoškite visiems kepenų bandiniams reikalingų homogenizavimo buferio kiekių sąrašą.

Kepenų parengimas paruošiamajam apdorojimui

- (1) Prieš pat paruošiamąjį apdorojimą išimkite 1,5 ml mikromėgintuvėlį su kepenimis iš šaldiklio.
- (2) Kad būtų išvengta užteršimo vitelogeninu, patinų kepenų paruošiamasis apdorojimas turėtų būti atliktas pirmiau nei patelių. Be to, bandomųjų grupių žuvų kepenų paruošiamasis apdorojimas turėtų būti atliekamas tokia eilės tvarka: kontrolė, tirpiklio kontrolė (jeigu taikytina), mažiausia koncentracija, vidutinė koncentracija, didžiausia koncentracija ir teigiama kontrolė.
- (3) Bet kuriuo konkrečiu momentu iš šaldiklio turėtų būti išimta ne daugiau 1,5 ml mikromėgintuvėlių su kepenų mėginiais nei tuo metu galima centrifuguoti.
- (4) Stove su ledu išrikiuokite 1,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenų mėginiais bandinių numerių eilės tvarka (kepenų atitirpdyti nereikia).

Paruošiamojo apdorojimo procedūra

1. Homogenizavimo buferio pridėjimas

- (1) Pasitikrinkite sąraše, kokį kiekį homogenizavimo buferio reikia naudoti konkrečiam kepenų mėginiui ir nustatykite atitinkamą kiekį mikropipete (diapazonas: 100–1 000 μl). Užmaukite ant mikropipetės švarų antgalį.
- (2) Paimkite reagento buteliuką su homogenizavimo buferiu ir įpilkite buferio į 1,5 ml mikromėgintuvėlį su kepenimis.
- (3) Įpilkite homogenizavimo buferio į visus 1,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenimis pagal pirmiau aprašytą procedūrą. Mikropipetės antgalio nauju pakeisti nereikia. Tačiau, jeigu antgalis užterštas arba įtariama, kad jis gali būti užterštas, antgalį reikėtų pakeisti.

2. Kepenų homogenizavimas

- (1) Pritvirtinkite naują homogenizavimo grūstuvėlį prie mikromėgintuvėlio homogenizatoriaus.
- (2) Įkiškite grūstuvėlį į 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Laikykite mikromėgintuvėlio homogenizatorių taip, kad suspaustumėte kepenis tarp grūstuvėlio paviršiaus ir 1,5 ml mikromėgintuvėlio vidinės sienelės.
- (3) Įjunkite mikromėgintuvėlio homogenizatorių 10–20-iai sekundžių. Atlikdami šią operaciją, atvėsinkite mikromėgintuvėlį smulkintu ledu.
- (4) Ištraukite grūstuvėlį iš 1,5 ml mikromėgintuvėlio ir palikite jį apie 10 sekundžių. Tada atlikite vizualinį suspensijos būsenos patikrinimą.
- (5) Jeigu suspensijoje matomi kepenų gabaliukai, pakartokite trečią ir ketvirtą veiksmus, kad paruoštumėte tinkamą kepenų homogenatą.
- (6) Prieš centrifugavimą atvėsinkite suspenduotą kepenų homogenatą stovė su ledu.
- (7) Gamindami kiekvieną homogenatą, grūstuvėlį pakeiskite nauju.
- (8) Pagal pirmiau aprašytą procedūrą homogenizuokite visas kepenis homogenizavimo buferiu.

3. Suspenduoto kepenų homogenato centrifugavimas

- (1) Šaldomoje centrifugos kameroje nustatykite $\leq 5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą.
- (2) Įdėkite 1,5 ml mikromėgintuvėlius su suspenduotu kepenų homogenatu į šaldomą centrifugą (jeigu reikia, sureguliuokite balansą).
- (3) 10 minučių centrifuguokite suspenduotą kepenų homogenatą 13 000 g greičiu $\leq 5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tačiau, jeigu supernatantai atsiskyrė tinkamai, centrifugavimo jėgą ir laiką galima koreguoti esant reikalui.
- (4) Po centrifugavimo patikrinkite, ar supernatantai tinkamai atsiskyrė (paviršiuje – lipidai, per vidurį – supernatantas, apačioje – kepenų audiniai). Jeigu atsiskyrimas įvyko nekokybiškai, centrifuguokite suspensiją dar kartą tomis pačiomis sąlygomis.
- (5) Išimkite visus bandinius iš šaldomos centrifugos ir stovė su ledu išrikiuokite juos bandinių numerių eilės tvarka. Po centrifugavimo stenkitės iš naujo nesuplakti atskirų sluoksnių į vieną.

4. Supernatanto surinkimas

- (1) Įdėkite keturis 0,5 ml mikromėgintuvėlius su supernatantu į mėgintuvėlių stovą.
- (2) Mikropipete paimkite po 30 μl kiekvieno supernatanto (susiformavusio kaip vidurinis sluoksnis) ir supilkite jį į vieną 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Stenkitės nesurinkti paviršiuje esančių lipidų arba apatiniame sluoksnyje esančių kepenų audinių.
- (3) Surinkite supernatantą ir supilkite jį į kitus du 0,5 ml mikromėgintuvėlius, kaip aprašyta pirmiau.
- (4) Surinkite likusią supernatanto dalį mikropipete (jeigu galima – $\geq 100 \mu\text{l}$). Tada supilkite supernatantą į likusį 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Stenkitės nesurinkti paviršiuje esančių lipidų arba apatiniame sluoksnyje esančių kepenų audinių.
- (5) Uždarykite 0,5 ml mikromėgintuvėlį dangteliu ir užrašykite supernatanto kiekį etiketėje. Tada nedelsdami atvėsinkite mikromėgintuvėlius stovė su ledu.
- (6) Kiekvienam supernatanto mėginiui paimti mikropipetės antgalį pakeiskite nauju. Jeigu prie antgalio prilimpa didelis lipidų kiekis, nedelsdami pakeiskite jį nauju, kad neužterštumėte kepenų ekstrakto riebalais.

- (7) Supilkite visą centrifuguotą supernatantą į keturis 0,5 ml mikromėgintuvėlius pagal pirmiau aprašytą procedūrą.
- (8) Supylę supernatantą į 0,5 ml mikromėgintuvėlius, visus juos su identifikacinėmis etiketėmis sudėkite į mėgintuvėlių stovą, o tada nedelsdami užšaldykite juos šaldiklyje. Jeigu VTG koncentracijos matuojamos iš karto po paruošiamojo apdorojimo, laikydami vieną 0,5 ml mikromėgintuvėlį (kuriame yra 30 µl supernatanto) mėgintuvėlių vėsimo stovė perduokite jį į darbo vietą, kurioje atliekama IFA. Tokiu atveju likusius mikromėgintuvėlius sudėkite į mėgintuvėlių stovus ir užšaldykite juos šaldiklyje.
- (9) Surinkę supernatantą, tinkamai pašalinkite liekanas.

Bandinio laikymas

Iki panaudojimo atliekant IFA laikykite 0,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenų homogenato supernatantu $\leq -70^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

3A procedūra. Zebrinė danija, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Iš karto po anestezijos uodegos kotelis skersai nupjaunamas ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu kapiliariniu mikrohematokrito vamzdeliu paimamas kraujas. Kraujo kiekis svyruoja nuo 5 iki 15 µl atsižvelgiant į žuvies dydį. Toks pats aprotinio buferio kiekis (6 µg/ml fosfatinio buferio tirpale) įtraukiamas į mikrokapiliarinį vamzdelį, o plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (5 minutes 600 g greičiu). Plazma surenkama į mėgintuvėlius ir iki vitelogenino ar kitų dominančių baltymų kiekio nustatymo analizės laikoma -20°C temperatūroje.

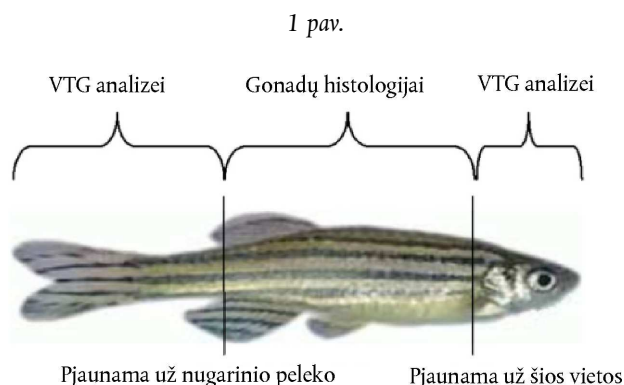
3B procedūra. Zebrinė danija, kraujo paėmimas atliekant širdies punkciją

Kad būtų išvengta kraujo krešėjimo ir baltymų irimo, mėginiai laikomi fosfatinio buferio tirpale (FBT), kuriame yra heparino (1 000 vienetų/ml) ir proteazės inhibitoriaus aprotinino (2 TIU/ml). Buferiui paruošti kaip sudedamąsias dalis rekomenduojama naudoti heparino amonio druską ir liofilizuotą aprotinimą. Kraujo mėginiui paimti rekomenduojama naudoti švirkštą (1 ml) su fiksuota plona adata (pvz., Braun Omnikan-F). Švirkštą reikia iš anksto pripildyti buferio tirpalo (maždaug 100 µl), kad iš kiekvienos žuvies būtų visiškai išplautas nedidelis kraujo kiekis. Kraujo mėginiai paimami atliekant širdies punkciją. Iš pradžių žuvis turėtų būti anestezuota MS-222 (100 mg/l). Tinkamai pritaikęs anesteziją, tyrėjas gali atskirti zebrinės danijos širdies plakimą. Atlikdami širdies punkciją, nestipriai spauskite švirkšto stūmoklį. Paimamas kraujo kiekis gali būti 20–40 mikrolitrų. Atlikus širdies punkciją, kraujo ir buferio mišinį reikėtų supilti į mėgintuvėlį. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (20 min, 5 000 g greičiu) ir iki analizės turėtų būti laikoma -80°C temperatūroje.

3C procedūra. Standartinė veiklos procedūra (SVP) – zebrinė danija, galvos ir uodegos homogenizavimas

- (1) Žuvis anestezuojamos ir numarinamos pagal bandymo aprašymą.
- (2) Žuvies galva ir uodega nupjaunamos taip, kaip parodyta 1 pav.

Svarbu: po kiekvienos atskiros žuvies preparavimo visi skrodimo instrumentai ir preparavimo stalas turėtų būti tinkamai išplauti ir išvalyti (pvz., 96 % etanoliumi), kad būtų išvengta neindukuotų patinų užteršimo patelių arba indukuotų patinų vitelogeninu.



- (3) Bendras kiekvienos žuvies galvos ir uodegos svoris matuojamas mg tikslumu.
- (4) Pasvėrus kūno dalys įdedamos į atitinkamus mėgintuvėlius (pvz., 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius) ir iki homogenizavimo užšaldomos – 80 °C temperatūroje arba tiesiogiai homogenizuojamos ant ledo dviem plastikinėmis piestelėmis. (Kiti metodai gali būti taikomi, jeigu tai atliekama ant ledo ir rezultatas yra homogeniška masė). Svarbu: mėgintuvėliai turėtų būti tinkamai sunumeruoti, kad žuvies galvą ir uodegą būtų galima susieti su atitinkama jų kūno dalimi, naudojama lytinių liaukų histologinei analizei atlikti.
- (5) Gavus homogenišką masę, įpilama ledo šaltumo homogenizavimo buferio (*), kurio turi būti keturis kartus daugiau nei sveria audiniai. Toliau dirbkite piestelėmis, kol mišinys taps homogeniškas. Svarbi pastaba: kiekvienai žuviai naudojamos naujos piestelės.
- (6) Iki centrifugavimo 30 minučių 50 000 × g greičiu 4 °C temperatūroje mėginiai padedami ant ledo.
- (7) Pipete įlašinkite po 20 µl supernatanto bent į du mėgintuvėlius panardindami pipetės galiuką žemiau paviršinio riebalų sluoksnio ir atsargiai surinkdami supernatantą be riebalų ar audinių dalelių.
- (8) Iki panaudojimo mėgintuvėliai laikomi – 80 °C temperatūroje.

(*) Homogenizavimo buferis:

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteazės inhibitorių mišinys („Sigma“): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteazės inhibitorių mišinio.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), pvz., „Bie & Berntsen“ gamybos (Danija).
- Proteazės inhibitorių mišinys: „Sigma“ gamybos (žinduolių audiniams). Produkto numeris P 8340.
- *Pastaba.* Homogenizavimo buferį reikėtų panaudoti tą pačią dieną, kurią jis buvo pagamintas. Naudodami laikykite tirpalą ant ledo.

7 priedėlis

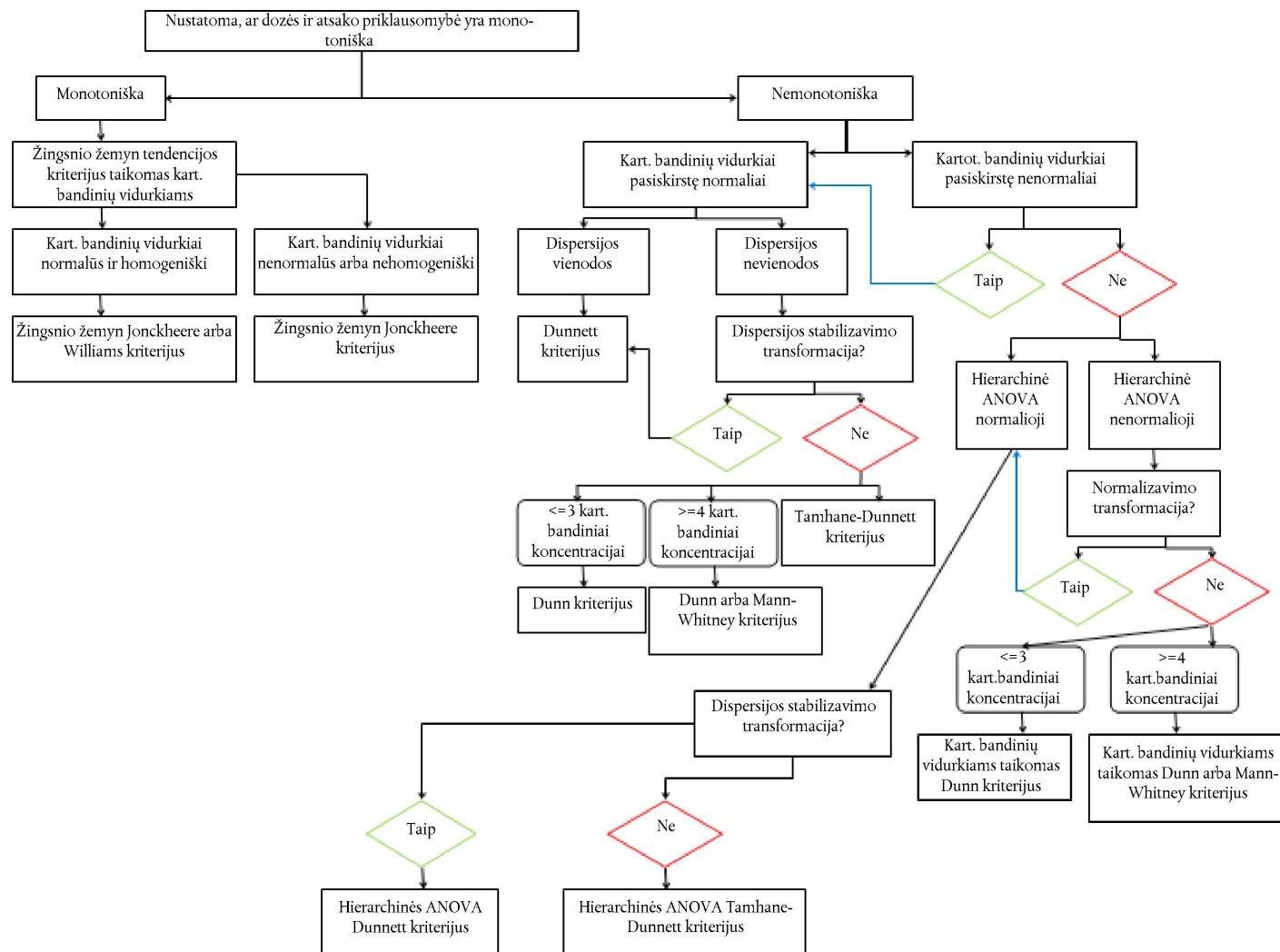
Sustiprinti vitelogenino mėginiai ir pamatinis tyrimo etalonas

Kiekvieną vitelogenino analizės atlikimo dieną bus išanalizuojamas sustiprintas mėginys, paruoštas naudojant etaloninį bandymo standartą. Etaloniniam bandymo standartui paruošti naudojamas vitelogeninas bus iš kitos partijos nei ta, kuri naudota atliekamo bandymo etaloniniams kalibravimo tirpalams paruošti.

Sustiprintas mėginys bus paruošiamas į kontrolinio patino plazmą pridedant žinomą etaloninio bandymo standarto kiekį. Mėginys bus stiprinamas tol, kol vitelogenino koncentracija taps 10–100 kartų didesnė nei numatoma kontrolinio patino vitelogenino koncentracija. Stiprinamas kontrolinio patino plazmos mėginys gali būti paimtas iš vienos žuvies arba iš kelių žuvų.

Bent dviejose kartotinėse duobutėse bus analizuojamas nesustiprintas kontrolinio patino plazmos poėminis. Sustiprintas mėginys taip pat bus analizuojamas bent dviejose kartotinėse duobutėse. Numatoma koncentracijai apskaičiuoti vidutinis dviejų nesustiprintų kontrolinių patinų plazmos mėginių vitelogenino kiekis bus pridėtas prie apskaičiuoto vitelogenino kiekio, pridėto prie sustiprintų mėginių. Šios numatomos ir išmatuotos koncentracijų santykis bus pateiktas kartu su kiekvienos tą dieną atliktų analizių grupės rezultatais.

Statistinei analizei skirta srautinė sprendimų diagrama



C.38. VARLIAGYVIŲ METAMORFOZĖS TYRIMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 231 (2009). Poreikis sukurti ir patvirtinti tyrimą, kurį atliekant būtų galima aptikti stuburinių rūšių skydliaukės sistemą veikiančias chemines medžiagas, kyla iš susirūpinimo, kad aplinkoje esančios cheminės medžiagos gali sukelti neigiamų padarinių žmonėms ir laukinei gyvūnijai. 1998 m. EBPO ėmėsi didelės svarbos darbų peržiūrėti esamas ir sukurti naujas endokrininę sistemą galinčių ardyti cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Viena iš darbo dalių buvo cheminių medžiagų, veikiančių stuburinių rūšių skydliaukės sistemą, atrankos TG sukūrimas. Buvo pasiūlytas patobulintas 28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas (šio priedo B.7 skyrius) ir varliagyvių metamorfozės tyrimas (AMA). Buvo atliktas patobulinto bandymo metodo B.7 tinkamumo patvirtinimas ir paskelbtas peržiūrėtas bandymo metodas. Buvo vykdyta didelės apimties varliagyvių metamorfozės tyrimo (AMA) tinkamumo patvirtinimo programa, kurią sudarė laboratoriniai ir tarplaboratoriniai tyrimai, įrodantys tyrimo tinkamumą ir patikimumą (1, 2). Vėliau nepriklausomų ekspertų grupė atliko tyrimo tinkamumo patvirtinimo analizę (3). Šis bandymo metodas yra patirties, sukauptos atliekant skydliaukės veiklą veikiančių cheminių medžiagų aptikimo metodų tinkamumo patvirtinimo tyrimus ir kitus darbus EBPO valstybėse narėse, rezultatas.

BANDYMO PRINCIPAS

2. Varliagyvių metamorfozės tyrimas (AMA) yra atrankos tyrimas, skirtas empiriniu būdu nustatyti chemines medžiagas, kurios gali trukdyti normaliai pagumburio-hipofizės-skydliaukės (HPT) ašies funkcijai. AMA atitinka apibendrintąjį stuburinių modelį tiek, kiek jis yra pagrįstas HPT ašies išsaugotomis struktūromis ir funkcijomis. Tai yra svarbus tyrimas, nes varliagyvių metamorfozė yra gerai ištirtas su skydliauke susijęs procesas, kuris reaguoja į HPT ašį veikiančias chemines medžiagas, ir šiuo metu yra vienintelis tyrimas, kuriuo aptinkamas poveikis morfologinio vystymosi stadijos gyvūnų skydliaukės veiklai.
3. Bendrąjį bandymo planą sudaro 51 stadijos *Xenopus laevis* buožgalvių 21 dienos trukmės veikimas ne mažiau kaip trijų skirtingų koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga ir kontrolinis bandinys su skiedimo vandeniu. Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai. Visų bandomąja medžiaga veikiamų grupių lervų tankis bandymo pradžioje yra 20 buožgalvių viename bandymo inde. Stebimos vertinamosios baigtys yra užpakalinės galūnės ilgis (HLL), atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL), vystymosi stadija, šlapio kūno masė, skydliaukės histologija ir kasdieniai gaištamumo stebėjimo duomenys.

METODO APRAŠYMAS

Bandymo gyvūnų rūšys

4. *Xenopus laevis* paprastai augina viso pasaulio laboratorijos ir juos lengva gauti iš komercinių tiekėjų. Šios gyvūnų rūšies reprodukciją ištisus metus galima nesunkiai sukelti darant žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcijas ir gautas lervas galima auginti dideliais kiekiais įprastu būdu iki pasirinktų vystymosi stadijų, kad būtų galima naudoti konkrečioms stadijoms skirtus bandymų protokolus. Pageidautina, kad tyrime naudojamos lervos būtų gautos iš suaugusių gyvūnų toje pačioje laboratorijoje. Galima taikyti alternatyvią procedūrą, kuri nėra pageidautina, kai ikrai arba embrionai būtų tiekiami į bandymą atliekančią laboratoriją ir aklimatizuojami; nepriimtina atsisiųsti lervos stadijų bandymo gyvūnus.

Įranga ir pagalbinių reikmenys

5. Bandymui atlikti būtina ši įranga ir pagalbinių reikmenys:
 - a) poveikio sistema (žr. toliau pateiktą aprašymą);
 - b) stikliniai arba nerūdijančiojo plieno akvariumai (žr. toliau pateiktą aprašymą);
 - c) auginimo indai;
 - d) temperatūros reguliavimo aparatai (pvz., šildytuvai arba aušintuvai (reguliuojami iki $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$));

- e) termometras;
- f) dviejų okuliarų skrodimo mikroskopas;
- g) skaitmeninė kamera, kurios skyra ne mažesnė kaip 4 megapikseliai, su mikroreguliavimo funkcija;
- h) skaitmeninio vaizdo gavimo programinė įranga;
- i) Petri lėkštelė (pvz., 100 × 15 mm) arba panašių matmenų permatoma plastikinė kamera;
- j) analizinės svarstyklės, kuriomis galima sverti tūkstantųjų tikslumu (mg);
- k) ištirpusio deguonies matuoklis;
- l) pH metras;
- m) šviesos stiprio matuoklis, kuris matuoja liuksais;
- n) įvairūs laboratoriniai stikliniai indai ir įrankiai;
- o) dozuojamosios pipetės (nuo 10 iki 5 000 µl) arba atitinkamų tūrių pipetėčių rinkiniai;
- p) bandomoji cheminė medžiaga, kurios pakaktų tyrimui atlikti, pageidautina, vienos partijos;
- q) analizės prietaisai, kurie tikėtų bandomajai cheminei medžiagai tirti, arba analizės paslaugos pagal rangos sutartį.

Cheminis bandomumas

6. AMA pagrįstas veikimo vandeniniu tirpalu protokolo taikymu, kai bandomoji cheminė medžiaga į bandymo kameras tiekama pratekamąja sistema. Tačiau pratekamieji metodai tinka ne visų tipų cheminėms medžiagoms bandyti – tai priklauso nuo cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių. Todėl, prieš taikant šį protokolą, reikėtų gauti bandomumui nustatyti svarbią pradinę informaciją apie cheminę medžiagą ir EBPO gairėse reikėtų ieškoti informacijos apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (4). Charakteristikos, kurios rodo, kad cheminę medžiagą gali būti sunku tirti vandeninėse sistemose, yra tokios: dideli oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientai ($\log K_{ow}$), didelis lakumas, jautrumas hidrolizei ir jautrumas fotolizei laboratorijos aplinkos apšvietimo sąlygomis. Bandomumui nustatyti gali būti svarbūs kiti veiksniai ir jie turėtų būti nustatyti kiekvienu atveju atskirai. Jei sėkmingas cheminės medžiagos bandymas naudojant pratekamąją bandymo sistemą neįmanomas, galima naudoti statinio atnaujinimo sistemą. Jei nė vienos iš sistemų bandomajai cheminei medžiagai pritaikyti neįmanoma, tada pagal šį protokolą bandymas neatliekamas.

Poveikio sistema

7. Jei įmanoma, pirminybė teikiama pratekamajai skiediklio sistemai palyginti su statinio atnaujinimo sistema. Jei bandomosios cheminės medžiagos fizikinių ir (arba) cheminių savybių neįmanoma priderinti prie pratekamiosios skiediklio sistemos, galima naudoti alternatyvią poveikio sistemą (pvz., statinio atnaujinimo). Sistemos komponentai, kurie liečiasi su vandeniu, turėtų būti iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ir (arba) politetrafluoretileno. Tačiau galima naudoti tinkamus plastikus, jei jie nekenkia bandymui. Bandymo indai turėtų būti stikliniai arba nerūdijančiojo plieno akvariumai su vertikaliaisiais tiekimo vamzdžiais, kuriais būtų užtikrinamas vandens tūris maždaug nuo 4,0 iki 10,0 l ir minimalus vandens gylys nuo 10 cm iki 15 cm. Sistema turėtų tikėti bandyti visas poveikio koncentracijos vertes ir kontrolinį bandinį, naudojant keturis kartotinius vienos koncentracijos bandinius. Kiekvieno indo srautas turėtų būti pastovus, atsižvelgiant į biologinių sąlygų ir veikimo chemine medžiaga užtikrinimą (pvz., 25 ml/min). Indų su bandomąja medžiaga vieta poveikio sistemoje turėtų būti priskirta atsitiktinai, kad būtų sumažinti galimi padėties veiksniai, įskaitant nežymius temperatūros, apšvietos ir kt. pokyčius. Reikėtų naudoti liuminescencinį apšvietimą 12 h dienos šviesos ir 12 h tamsos laikotarpiui gauti, kad apšvietos intervalas vandens paviršiuje būtų nuo 600 iki 2 000 liuksų (liumenų/m²). Kiekvieno bandymo indo vandens temperatūra turėtų būti 22° ± 1 °C, pH – nuo 6,5 iki 8,5, ištirpusio deguonies (DO) koncentracija > 3,5 mg/l (> 40 % oro soties). Vandens temperatūra, pH ir ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti matuojami ne rečiau kaip kartą per savaitę; temperatūrą pageidautina matuoti nepertraukiamai bent viename bandymo inde. 1 priedėlyje aprašytos bandymų sąlygos, kuriomis reikėtų vykdyti protokolą. Dėl papildomos informacijos apie pratekamųjų poveikio sistemų ir (arba) statinio atnaujinimo sistemų įrengimą žr. ASTM standartų apie bandomųjų medžiagų ūmaus toksiškumo žuvims, makrobestuburiams ir varliagyviams bandymų vadovą (5) bei bendruosius vandens toksikologijos bandymus.

Vandens kokybė

8. Galima naudoti bet koki vietinį vandenį (pvz., šaltinio vandenį arba per aktyvintąsias anglis filtruotą vandentiekio vandenį), kuriame gali normaliai augti ir vystytis *X. laevis* buožgalviai. Kadangi iš skirtingų vietų paimto vietinio vandens kokybė gali labai skirtis, reikėtų atlikti vandens kokybės analizę, ypač jei nėra ankstesnių duomenų apie vandens tinkamumą *Xenopus* auginti. Ypač reikėtų žiūrėti, kad vandenyje nebūtų vario, chloro ir chloraminų, kurie yra toksiški varlėms ir buožgalviams. Be to, rekomenduojama analizuoti vandenį foninei fluorido, perchlorato ir chlorato (geriamojo vandens dezinfekcijos šalutinių produktų) koncentracijai nustatyti, nes visi šie anijonai yra skydliaukės jodo pernešimo substratai ir padidinta kiekvieno iš šių anijonų koncentracija gali iškreipti tyrimo rezultatus. Analizę reikėtų atlikti prieš bandymų pradžią ir bandymo vandenyje paprastai neturėtų būti šių anijonų.

Jodido koncentracija bandymo vandenyje

9. Lervos kartu su vandeniu ir maistu turi gauti pakankamai jodo, kad skydliaukė galėtų sintetinti tiroksiną. Šiuo metu nėra empiriškai nustatytų gairių dėl minimalių jodido koncentracijos verčių. Tačiau jodido prieinamumas gali turėti įtakos skydliaukės sistemos atsakui į skydliaukę veikiančius agentus, ir yra žinoma, kad jodidas keičia skydliaukės bazinį aktyvumą, todėl jodido kiekis yra nagrinėtinas aspektas, kai aiškinami skydliaukės histopatologijos rezultatai. Todėl ataskaitoje reikėtų pateikti išmatuotas bandymo vandens jodido koncentracijos vertes. Atsižvelgiant į turimus tinkamumo patvirtinimo tyrimų duomenis, buvo įrodyta, kad protokolai tinka, kai bandymo vandens jodido (I^-) koncentracijos vertės yra nuo 0,5 µg/l iki 10 µg/l. Geriausia būtų, kad minimali jodido koncentracija bandymo vandenyje būtų 0,5 µg/l. Jei bandymo vanduo yra atkuriamas iš dejonizuoto vandens, į jį turi būti dedama ne mažesnė kaip 0,5 µg/l koncentracijos jodo. Kiekvienas papildomas jodo arba kitų druskų pridėjimas į bandymo vandenį turėtų būti nurodytas ataskaitoje.

Gyvūnų laikymas*Suaugusių gyvūnų priežiūra ir veisimas*

10. Suaugę gyvūnai prižiūrimi ir veisiami pagal standartines rekomendacijas, o išsamesnė informacija skaitytojui pateikiama standartiniame vadove *Varlių embrionų teratogenezės tyrimas* (FETAX) (6). Tokios standartinės rekomendacijos yra tinkamos priežiūros ir tinkamo veisimo metodų pavyzdys, tačiau jų griežtai laikytis nereikalaujama. Veisimui paskatinti suaugusių patelių ir patinų poroms (3–5) daroma žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcija. Patelėms ir patinams daroma maždaug 800 IU–1 000 IU ir 600 IU–800 IU hCG, ištirpinto 0,6–0,9 % fiziologiniame tirpale, injekcija. Veislinės poros laikomos dideliuose induose, netrikdomos ir statinėmis sąlygomis, kad būtų skatinamas apglėbimas. Reikėtų, kad kiekvienas veisimo indas turėtų antrąjį dugną iš nerūdijančiojo plieno arba plastikinio tinklo, per kurį į indo dugną galėtų kristi ikrų masė. Jei injekcija varlėms daroma vėlai po pietų, didesnė dalis ikrų paprastai būna padėta iki kitos dienos vidurdienio. Gavus ir apvaisinus pakankamai ikrų, suaugę gyvūnai turėtų būti pašalinti iš veisimo indų.

Lervų priežiūra ir atranka

11. Pašalinus suaugusius gyvūnus iš veisimo indų, ikrus surenkami ir jų gyvybingumas įvertinamas naudojant reprezentatyvų visų veisimo indų embrionų rinkinį. Reikėtų pasilikti geriausią (-ias) atskirą (-as) vadą (-as) (rekomenduojama imti 2–3, kad, atsižvelgiant į embrionų gyvybingumą ir reikiamo embrionų skaičiaus buvimą (ne mažiau kaip 1 500), būtų įvertinta vadų kokybė). Visi tiriami organizmai turėtų būti gauti per vieną ikrų dėjumą (t. y. vadų nereikėtų tarpusavyje maišyti). Embrionai pernešami į didelį plokščią padėklą arba lėkštę ir visi aktyviai negyvi arba nenormalūs ikrų (žr. (5) apibrėžti) pašalinami pipete arba akių lašų lašintuvu. Visų trijų vadų sveiki embrionai pernešami į tris atskirus inkubavimo indus. Po keturių dienų nuo pernešimo į inkubavimo indus pasirenkama geriausia vada pagal gyvybingumą ir išsiritimo sėkmę ir lervos pernešamos į reikiamą auginimo indą, kuriuose yra $22^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ temperatūra, skaičių. Be to, tam tikras papildomų lervų skaičius pernešamas į papildomus indus, kad jomis būtų galima pakeisti auginimo induose per pirmąją savaitę žuvusias lervas. Ši procedūra užtikrina pastovų organizmų tankį, taigi sumažina atskiros vados palikuonių vystymosi skirtumus. Visi auginimo indai kasdien išvalomi sifonu. Dėl saugos geriau naudoti vinilo arba nitrilo pirštines, o ne latekso. Pirmąją savaitę žuvusias lervas reikėtų šalinti kasdien ir jas pakeisti atsarginėmis lervomis, kad būtų išsaugotas organizmų tankis. Maitinti reikėtų mažiausiai du kartus per dieną.

12. Per laikotarpį iki veikimo bandomąja medžiaga buožgalviai pratinami prie tų sąlygų, kurios bus per jų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpį, įskaitant maisto tipą, temperatūrą, šviesos bei tamsos ciklą ir kultūros terpę. Todėl rekomenduojama, kad laikotarpiu iki veikimo ir veikimo laikotarpiu būtų naudojama ta pati kultūros terpė ar skiedimo vanduo. Jei buožgalviams laikyti laikotarpiu iki veikimo naudojama statinė kultūros sistema, kultūros terpę reikėtų visiškai pakeisti mažiausiai du kartus per savaitę. Laikotarpiu iki veikimo reikėtų vengti perpildymo dėl didelio lervų tankio, nes tokie veiksniai galėtų reikšmingai veikti buožgalvių vystymąsi paskesniu bandymo tarpsniu. Todėl auginimo tankis turėtų būti ne didesnis kaip maždaug keturi buožgalviai/l kultūros terpėje (statinė poveikio sistema) arba 10 buožgalvių/l kultūros terpėje (esant, pvz., 50 ml/min srautui laikotarpio iki veikimo arba auginimo sistemoje). Šiomis sąlygomis buožgalviai turėtų vystytis dvylikos dienų laikotarpiu nuo 45 ar 46 stadijos iki 51 stadijos. Šios pradinės populiacijos reprezentatyvieji buožgalviai turėtų būti apžiūrimi kasdien vystymosi stadijai nustatyti, kad būtų galima nustatyti, kada yra tinkamas laikas pradėti juos veikti bandomąja medžiaga. Reikėtų imtis priemonių, kad buožgalviams sukeltas stresas ir trauma būtų kiek įmanoma mažesni, ypač, perkeltant, valant akvariumus ir tvarkant lervas. Reikėtų vengti stresą sukeliančių sąlygų arba veiksmų, pvz., didelio ir (arba) nenutrūkstamo triukšmo, akvariumų tapšnojoimo, virpesių akvariumuose, per didelės veiklos laboratorijoje ir staigių aplinkos terpės pokyčių (apšvietimo, temperatūros, pH, ištirpusio deguonies (DO), vandens srautų ir kt.). Jei per 17 dienų nuo apvaisinimo buožgalviai neišsivysto iki 51 stadijos, kaip galima priežastis galėtų būti per didelis stresas.

Lervų kultūra ir maitinimas

13. Visą laikotarpį iki veikimo bandomąja medžiaga (po Nieuwkoop ir Faber (NF) 45 ar 46 stadijos (8)) ir visą 21 dienos bandymo laikotarpį buožgalviai maitinami, pvz., prekyboje esančiu buožgalvių maistu, naudotu atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus (taip pat žr. 1 priedėlį), arba kitu maistu, kuris tinka vienodiems varliagyvių metamorfozės tyrimo rezultatams gauti. Maitinimo režimas laikotarpiu iki veikimo turėtų būti kruopščiai reguliuojamas, kad atitiktų besivystančių buožgalvių poreikius. T. y., tik ką išsiritusiems buožgalviams maistą reikėtų duoti mažomis porcijomis kelis kartus per dieną (ne mažiau kaip du kartus). Reikėtų vengti maisto pertekliaus, kad i) būtų išlaikyta vandens kokybė ir ii) žiauniniai filtrai būtų apsaugoti nuo užsikimšimo maisto dalelėmis ir liekanomis. Jei buožgalviai maitinami tinkamumo patvirtinimo tyrimams naudotu maistu, dienos maisto davinyje turėtų būti didinamas buožgalviams augant iki maždaug 30 mg/gyvūnui/dienai prieš pat bandymo pradžią. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus buvo įrodyta, kad šis prekyboje esantis maistas užtikrina reikiamą *X. laevis* buožgalvių augimą ir vystymąsi ir jį sudaro smulkios dalelės, kurios ilgai išsilaiko suspenduotos vandens stulpelyje ir išsiplauna srautu. Todėl suminis dienos maisto kiekis turėtų būti padalytas į mažesnes porcijas ir maitinama ne mažiau kaip du kartus per dieną. Maitinimo šiuo maistu režimas pateiktas 1 lentelėje. Maitinimo normos turėtų būti užrašytos. Galima maitinti sausu maistu arba skiedimo vandenyje paruoštu jo pradiniu tirpalu. Toks pradinis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo kas antrą dieną ir laikomas 4 °C temperatūroje, kai nenaudojamas.

1 lentelė.

Maitinimo prekyboje esančiu buožgalvių maistu režimas, taikomas *X. laevis* buožgalviams atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus AMA pradiniu laikotarpiu pratekėjimo sąlygomis

Tyrimo diena	Maisto davinyje (mg maisto/gyvūnui/dienai)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analizinė chemija

14. Prieš tyrimo pradžią reikėtų įvertinti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą naudojant turimą informaciją apie jos tirpumą, skaidumą ir lakumą. Reikėtų paimti kiekvienos koncentracijos bandymo tirpalų ėminius iš kiekvieno kartotinio bandinio indo, kad būtų atlikta cheminė analizė bandymo pradžioje (0 diena) ir kas savaitę, imant ne mažiau kaip keturis ėminius. Taip pat rekomenduojama nustatyti kiekvieną bandymo koncentraciją ruošiant sistemą prieš bandymo pradžią, kad būtų patikrintas sistemos veikimas. Be to, rekomenduojama analizuoti pradinį tirpalą, kai jie keičiami, ypač, jei pradinio tirpalo tūryje esančio cheminės medžiagos kiekio nepakanka visai įprastinio ėminių ėmimo laikotarpių trukmei aprėpti. Jei tiriamos cheminės medžiagos, kurių negalima aptikti esant kai kurioms arba visoms bandymo koncentracijoms, reikėtų matuoti pradinį tirpalų koncentraciją ir užrašyti sistemos srautus, kad būtų apskaičiuotos nominalios koncentracijos vertės.

Cheminės medžiagos tiekimas

15. Bandomosios cheminės medžiagos tiekimo į sistemą būdas, atsižvelgiant į jos fizikines ir chemines savybes, gali skirtis. Vandenyje tirpias chemines medžiagas galima ištirpinti bandymo vandens alikvotinėse dalyse tokios koncentracijos, kuri atitiktų tiekimo pratekamąją sistemą tikslinę bandymo koncentraciją. Chemines medžiagas, kurios kambario temperatūroje yra skysčiai ir mažai tirpsta vandenyje, galima tiekti taikant skysčio prisotinimo skysčiu metodus. Chemines medžiagas, kurios kambario temperatūroje yra kietos medžiagos ir mažai tirpsta vandenyje, galima tiekti naudojant stiklo pluošto kolonėlę kaip sotintuvą (7). Pirminybė teikiama bandymo sistemai, kurioje nenaudojamas nešiklis, tačiau skirtingos bandomosios cheminės medžiagos turės skirtingas fizikines ir chemines savybes, dėl kurių greičiausiai teks taikyti skirtingus vandens su bandomąja chemine medžiaga ruošimo būdus. Pageidautina nenaudoti tirpiklių arba nešiklių, nes: i) tam tikri tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus arba netikėtus endokrininius atsakus, ii) bandant chemines medžiagas virš jų tirpumo vandenyje (kaip gali dažnai pasitaikyti naudojant tirpiklius) efektyviosios koncentracijos gali būti nustatytos netiksliai, ir iii) atliekant ilgalaikius bandymus dėl tirpiklių naudojimo gali susidaryti nemaža biologinė plėvelė, susijusi su mikrobų aktyvumu. Tirpiklius galima naudoti kaip kraštutinę priemonę sunkiai bandomoms medžiagoms tirti, taip pat EBPO gairėse reikėtų ieškoti informacijos apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (4), kad būtų nustatytas geriausias bandymo metodas. Tirpiklis pasirenkamas atsižvelgiant į cheminės medžiagos chemines savybes. Tirpikliai, kurie buvo nustatyti kaip efektyvi priemonė atliekant vandens terpės toksiškumo bandymus, yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Jei naudojamas tirpiklinis nešiklis, jo koncentracija turėtų būti mažesnė nei ilgalaikio nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC); EBPO gairėse nurodyta ne didesnė kaip 100 µl/l; naujai atliktoje apžvalgoje rekomenduojama, kad tirpiklio koncentracija skiedimo vandenyje būtų tik 20 µl/l (12). Jei naudojami tirpikliniai nešikliai, be netirpiklinių kontrolinių ėminių (švaraus vandens) reikėtų įvertinti atitinkamus tirpiklio kontrolinius ėminius. Jei cheminės medžiagos neįmanoma įterpti su vandeniu dėl fizikinių ir cheminių charakteristikų (mažas tirpumas) arba riboto cheminio prieinamumo, galima svarstyti jos tiekimą su maistu. Poveikio per maistą srityje atlikta preliminarinių darbų, tačiau šis veikimo būdas nėra plačiai taikomas. Metodo pasirinkimas turėtų būti aprašytas ir patikrintas atliekant analizę.

Bandymo koncentracijos verčių parinkimas

Didelės bandymo koncentracijos nustatymas

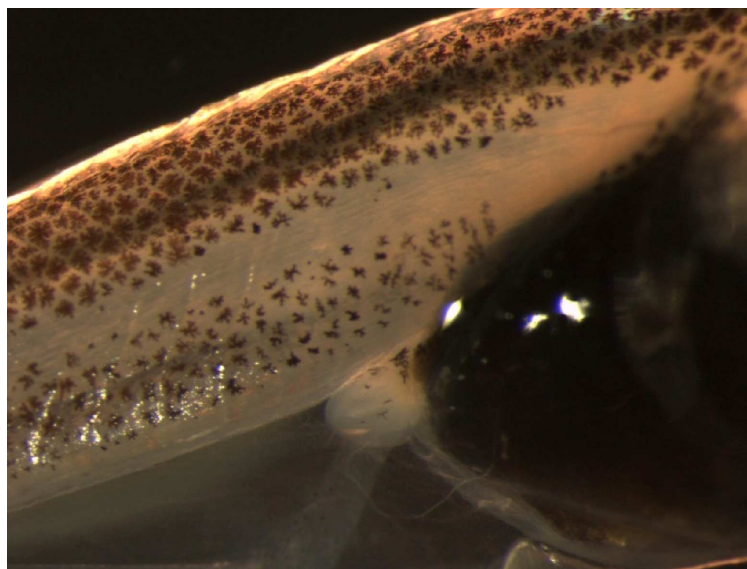
16. Šiame bandyme didelė bandymo koncentracija turėtų būti nustatyta, atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos ribinį tirpumą, ūmaus toksiškumo cheminių medžiagų maksimalią toleruojamąją koncentraciją (MTC) arba 100 mg/l, nelygu, kuri yra mažiausia.
17. MTC apibrėžiama kaip didžiausia cheminės medžiagos bandomoji koncentracija, kuriai esant ūmus gaištamumas mažesnis kaip 10 %. Šis būdas taikomas kai yra empiriniai ūmaus gaištamumo duomenys, pagal kuriuos galima įvertinti MTC. MTC įvertinimas gali būti netikslus ir paprastai reikalauja tam tikro profesinio išmanymo. Nors regresijos modelių taikymas iš esmės galėtų būti patikimiausias MTC vertinimo būdas, tinkamą apytikrę MTC vertę galima gauti pagal esamus ūmaus gaištamumo duomenis, imant 1/3 ūmios LC₅₀ vertės. Tačiau tiriamų rūšių ūmaus gaištamumo duomenų gali nebūti. Jei rūšies specifinių ūmaus toksiškumo duomenų nėra, galima atlikti 96 h LC₅₀ bandymą su buožgalviais, kurie yra reprezentatyvūs (t. y. yra tos pačios stadijos) bandomiems atliekant AMA. Jei yra duomenų apie kitas vandens gyvūnų rūšis (pvz., žuvų arba kitų varliagyvių rūšių LC₅₀ tyrimai), galima profesionaliai spręsti apie galimą MTC įvertį, pagrįstą ekstrapoliavimu tarp rūšių.

[illegible]

23. Visi buožgalviai turėtų būti 51 stadijos, kad būtų galima pradėti bandymą. Geriausiai matomas šios stadijos nustatymo požymis yra 1 paveiksle pavaizduotos užpakalinės galūnės morfologija.

1 paveikslas.

51 stadijos *X. laevis* buožgalvio užpakalinės galūnės morfologija.



24. Be vystymosi stadijos papildomai galima pasirinkti bandymo gyvūnų matmenis. Reikėtų išmatuoti Neuwkoop ir Faber 51 stadijos maždaug 20 buožgalvių poėmio viso kūno ilgį (ne SVL) 0 dieną. Apskaičiavus šios grupės gyvūnų vidutinį viso kūno ilgį, galima nustatyti minimalias ir maksimalias viso kūno ilgio ribas, taikant vidutinės vertės ± 3 mm intervalą (51 stadijos buožgalvių viso kūno ilgio vidutinė vertė yra nuo 24,0 mm iki 28,1 mm). Tačiau vystymosi stadija yra pagrindinis parametras nustatant kiekvieno bandymo gyvūno tinkamumą bandymui. Nereikėtų naudoti buožgalvių, turinčių aiškiai matomų vystymosi defektų arba žaizdų.
25. Pirmiau aprašytus stadijos kriterijus atitinkantys buožgalviai laikomi švariame veisime skirtame vandenyje iki stadijos nustatymo proceso pabaigos. Baigus stadijos nustatymą, lervos atsitiktinai skirstomos tarp veikimo indų tol, kol kiekviename iš jų yra po 20 lervų. Tada kiekvieno veikimo indo gyvūnai apžiūrimi nenormalios išvaizdos gyvūnams nustatyti (pvz., žaizdos, nenormalus plaukimo būdas ir kt.). Akivaizdžiai nesveikai atrodančius buožgalvius reikėtų pašalinti iš veikimo indų ir pakeisti iš naujo atrinktomis lervomis iš kaupiamojo indo.

Stebėjimai

26. Daugiau išsamios informacijos apie bandymo pabaigos procedūras ir buožgalvių apdorojimą pateikta EBPO gairėse apie varliagyvių skydliaukės histologiją (9).

7 dienos matavimai

27. 7 dieną iš kiekvieno bandymo indo kartotinių bandinių paimama po penkis atsitiktinai parinktus buožgalvius. Taikoma atsitiktinė procedūra kiekvienam bandymo organizmui turėtų užtikrinti vienodą parinkimo tikimybę. Tai galima pasiekti taikant kokį nors randomizavimo metodą, bet reikia, kad kiekvienas buožgalvis būtų pagautas tinklu. Neatsirinkti buožgalviai grąžinami į pradinį indą, o atsirinkti buožgalviai humaniškai numarinami nuo 150 iki 200 mg/l, pvz., MS-222, tinkamai buferuotu natrio hidrokarbonatu iki pH 7,0. Numarinti buožgalviai plaunami vandeniui, nusausinami sugeriamuoju popieriumi ir miligramo tikslumu nustatoma jų kūno masė. Nustatomas kiekvieno buožgalvio užpakalinių galūnių ilgis, atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos ir vystymosi stadija (naudojant dvių okuliarų skrodimo mikroskopą).

21 dienos matavimai (bandymo pabaiga)

28. Bandymo pabaigoje (21 diena) likę buožgalviai pašalinami iš bandymo indų ir humaniškai numarinami nuo 150 iki 200 mg/l, pvz., MS-222, tinkamai buferuotu natrio hidrokarbonatu, kaip nurodyta pirmiau. Buožgalviai plaunami vandeniui, nusauginami sugeriamuoju popieriumi ir miligramo tikslumu nustatoma jų kūno masė. Matuojama kiekvieno buožgalvio vystymosi stadija, SVL ir užpakalinių galūnių ilgis.
29. Visos lervos dedamos į Davidson fiksavimo tirpalą nuo 48 iki 72 h, kaip viso kūno ėminiai arba kaip išpjauti galvos audinio ėminiai su apatiniu žandikauliu histologiniam vertinimui atlikti. Iš kiekvieno kartotinio bandinio indo reikėtų paimti iš viso po penkis buožgalvius histopatologiniam tyrimui. Kadangi folikulinių ląstelių aukštis priklauso nuo stadijos (10), tinkamiausias histologinės analizės ėminių ėmimo būdas yra, jei įmanoma, naudoti stadiją atitinkančius individus. Norint parinkti stadiją atitinkančius individus, reikėtų nustatyti visų lervų stadiją prieš atranką ir vėlesnį apdorojimą renkant ir išsaugant duomenis. Tai yra būtina, nes dėl normalių vystymosi skirtumų bus skirtingas pasiskirstymas pagal stadijas kiekviename kartotinio bandinio inde.
30. Histopatologiniam tyrimui parinkti gyvūnai (n = 5 iš kiekvieno kartotinio bandinio indo), jei įmanoma, turėtų būti suderinti su kontrolinio bandinio medianine stadija (jungtinių kartotinių bandinių). Jei kartotinio bandinio inde yra daugiau kaip penkios tinkamos stadijos lervos, atsitiktinai parenkamos penkios lervos.
31. Jei kartotinio bandinio inde yra mažiau kaip penkios tinkamos stadijos lervos, reikėtų atsitiktinai parinkti gretimos aukštesnės arba žemesnės vystymosi stadijos individus, kad iš viso vieno kartotinio bandinio imties dydis būtų penkios lervos. Sprendimą dėl papildomų gretimos žemesnės arba aukštesnės vystymosi stadijos lervų paėmimo reikėtų priimti atsižvelgiant į pasiskirstymą pagal stadijas kontroliniuose ir veikimo induose. T. y., jei vystymosi vėlavimas yra susijęs su veikimu chemine medžiaga, reikėtų imti gretimos žemesnės stadijos papildomas lervas. Kita vertus, jei veikimas chemine medžiaga yra susijęs su vystymosi spartėjimu, reikėtų imti gretimos aukštesnės stadijos papildomas lervas.
32. Jei dėl veikimo bandomąja chemine medžiaga įvyksta didelių buožgalvių vystymosi pokyčių, gali nebūti bandomąja medžiaga paveiktų lervų stadijų ir apskaičiuotos kontrolinės medianinės vystymosi stadijos pasiskirstymo sanklotos. Tik šiais atvejais parinkimo procesą reikėtų keisti naudojant stadiją, kuri skiriasi nuo kontrolinės medianinės stadijos, kad skydliaukės histopatologijai naudojamų lervų imtys atitiktų stadiją. Be to, jei stadijos yra neaiškos (t. y. asinchroninės), histologinei analizei turėtų būti atsitiktinai parinkti 5 buožgalviai iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Atskaitoje reikėtų pagrįsti visų lervų, kurių stadija neatitinka kontrolinės medianinės vystymosi stadijos, imčių ėmimą.

Biologinių vertinamųjų baigčių nustatymas

33. Pagrindinių vertinamųjų baigčių matavimas 21 dienos veikimo laikotarpiu atliekamas 7 ir 21 dieną, tačiau bandymo gyvūnus būtina apžiūrėti kasdien. 3 lentelėje pateikta matavimo vertinamųjų baigčių ir atitinkamų stebėjimo laiko momentų apžvalga. Išsamesnė informacija apie apikaliųjų vertinamųjų baigčių matavimo ir histologinio vertinimo technines procedūras pateikta EBPO gairėse (9).

3 lentelė.

AMA pagrindinių vertinamųjų baigčių stebėjimo laiko momentai

Apikalinės vertinamosios baigtys	Kasdien	7 diena	21 diena
— Gaištamumas	•		
— Vystymosi stadija		•	•
— Užpakalinių galūnių ilgis		•	•
— Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos		•	•
— Šlapio kūno masė		•	•
— Skydliaukės histologija			•

Apikalinės vertinamosios baigtys

34. Vystymosi stadija, užpakalinių galūnių ilgis, SVL ir šlapio kūno masė yra AMA apikalinės vertinamosios baigtys, kurių kiekviena trumpai aptariama toliau. Papildoma techninė informacija apie šių duomenų rinkimą pateikta nurodytose gairėse, įskaitant kompiuterinės analizės procedūras, kurias rekomenduojama taikyti.

Vystymosi stadija

35. *X. laevis* buožgalvių vystymosi stadija nustatoma taikant Nieuwkoop ir Faber stadijų nustatymo kriterijus (8). Vystymosi stadijų duomenys naudojami nustatyti, ar vystymasis yra spartusis, asinchroninis, pavėlavęs ar nepaveiktas. Vystymosi spartėjimas arba vėlavimas nustatomas lyginant kontrolinių bandinių pasiektą medianinę stadiją ir bandomąją medžiagą paveiktų grupių stadiją. Ataskaitoje nurodoma, kad vystymasis yra asinchroninis, kai ištirti atskiro buožgalvio audiniai nėra netaisyklingai suformuoti arba nenormalūs, bet įvairių audinių morfogenezės arba vystymosi santykiniai laiko intervalai yra iškreipti.

Užpakalinių galūnių ilgis

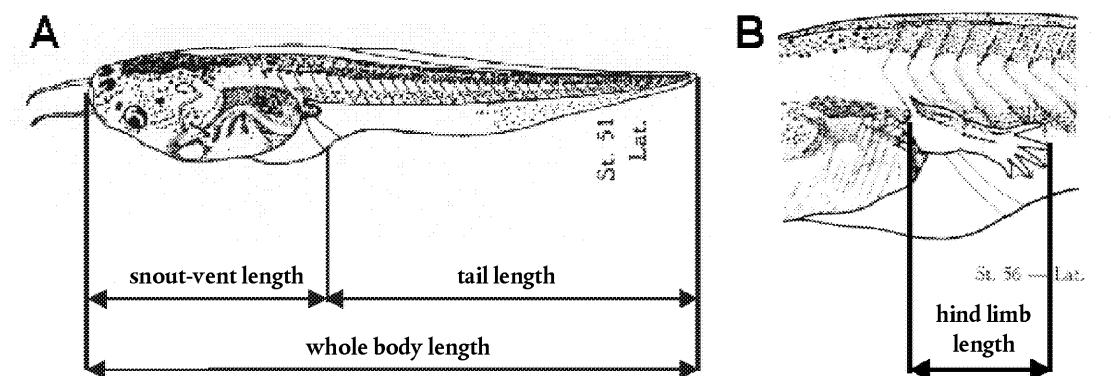
36. Skydliaukės hormonai valdo užpakalinių galūnių diferenciaciją ir augimą, kurie yra pagrindiniai vystymosi požymiai, kurie jau naudojami vystymosi stadijai nustatyti. Užpakalinių galūnių vystymasis naudojamas vystymosi stadijai nustatyti kokybiškai, bet šiame dokumente jis laikomas kiekybine vertinamąja baigtimi. Todėl užpakalinių galūnių ilgis matuojamas kaip vertinamoji baigtis siekiant nustatyti poveikį skydliaukės ašiai (2 paveikslas). Dėl nuoseklumo matuojamas kairiosios užpakalinės galūnės ilgis. Užpakalinių galūnių ilgis įvertinamas 7 ir 21 bandymo dieną. Užpakalinių galūnių ilgio matavimas 7 dieną yra paprastas, kaip pavaizduota 2 paveiksle. Tačiau užpakalinių galūnių ilgio matavimas 21 dieną yra sudėtingesnis dėl galūnės išlinkių. Todėl užpakalinių galūnių ilgį 21 dieną reikėtų pradėti matuoti nuo kūno sienelės ir eiti išilgai galūnės vidurio linijos per visus kampinius nuokrypius. Užpakalinių galūnių ilgio pokyčiai 7 dieną, nors ir nėra akivaizdūs 21 dieną, vis dar laikomi reikšmingais galimo poveikio skydliaukei požymiais. Ilgio matavimo duomenys gaunami iš skaitmeninių fotografijų, naudojant vaizdo analizės programas, kaip aprašyta EBPO gairėse apie varliagyvių skydliaukės histologiją (9).

Kūno ilgis ir šlapio kūno masė

37. Atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL) (2 paveikslas) ir šlapio kūno masės nustatymas įtraukti į bandymo protokolą, siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos galimus poveikius buožgalvių augimo spartai palyginti su kontroline grupe, ir yra naudingi nustatant apibendrintąjį bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą. Prilipusio vandens šalinimas matuojant masę buožgalviams gali sukelti streso sąlygas ir gali būti pažeista oda, todėl 7 dieną šie matavimai atliekami su buožgalvių poėmiu, o visi likę buožgalviai matuojami baigus bandymą (21 dieną). Dėl nuoseklumo kaip matavimo galinė riba naudojama išeinamosios angos priekinė pusė.
38. Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL) naudojamas buožgalvių augimui įvertinti, kaip pavaizduota 2 paveiksle.

2 paveikslas.

(A) Kūno ilgio matavimo būdai ir (B) *X. laevis* buožgalvių užpakalinių galūnių ilgio matavimas (1)



Skydliaukės histologija

39. Nors vystymosi stadija ir užpakalinių galūnių ilgis yra svarbios vertinamosios baigtys vertinant su bandomąja medžiaga susijusius metamorfinio vystymosi pokyčius, pats vystymosi vėlavimas negali būti laikomas antitiroidinio veikimo diagnostiniu rodikliu. Kai kuriuos pokyčius galima pastebėti tik atliekant įprastinę histopatologinę analizę. Diagnostinius kriterijus sudaro skydliaukės hipertrofija ir atrofija, folikulinė ląstelių hipertrofija, folikulinė ląstelių hiperplazija ir kaip papildomi kokybiniai kriterijai: folikulo ertmės plotas, koloido kokybė ir folikulinė ląstelių aukštis ar forma. Ataskaitoje reikėtų pateikti sunkumo laipsnius (4 laipsniai). Informacija apie histologinės analizės ėminių gavimą ir apdorojimą bei audinių ėminių histologinės analizės atlikimą pateikta: „Varliagyvių metamorfozės tyrimas. 1 dalis. Morfologinių ėminių ėmimo ir histologinių preparatų gavimo techninis vadovas“ ir „Varliagyvių metamorfozės tyrimas. 2 dalis. Tyrimų rezultatų aiškinimas, diagnostiniai kriterijai, sunkumo klasifikavimas ir atlasas“ (9). Laboratorijos, prieš pradėdamos skydliaukės histologinę analizę ir įvertinimą ir atliekančios tyrimą pirmą kartą, mokymosi tikslais turėtų klausti patyrusių patologų patarimo. Dėl akivaizdžių ir reikšmingų apikalinių vertinamųjų baigčių pokyčių, rodančių vystymosi spartėjimą ar asinchroniškumą, gali nebereikėti atlikti skydliaukės histopatologinės analizės. Tačiau akivaizdžių morfologinių pokyčių nebuvimas arba vystymosi vėlavimo įrodymai patvirtina histologinės analizės būtinumą.

Gaištamumas

40. Visi bandymo indai turėtų būti kasdien tikrinami ieškant žuvusių buožgalvių ir jų skaičius užrašomas kiekvienam indui atskirai. Radus negyvų buožgalvių, reikėtų užrašyti datą, koncentraciją ir indo numerį. Negyvi gyvūnai turėtų būti pašalinti iš bandymo indo kai tik jie pastebimi. Didesnis kaip 10 % gaištamumas gali rodyti netinkamas bandymo sąlygas arba bandomosios cheminės medžiagos toksinį poveikį.

Papildomi stebėjimai

41. Reikėtų užrašyti neįprasto elgesio atvejus ir aiškiai matomus vystymosi defektus bei sužalojimus. Reikėtų užrašyti datą, koncentraciją ir indo numerį, pastebėjus neįprastą elgesį, aiškius vystymosi defektus arba sužalojimus. Normalus elgesys apibūdinamas tuo, kad į vandens sluoksnį įleisti buožgalvių uodega yra aukščiau galvos, jie reguliariai ir ritmiškai ja suduoda, periodiškai pakyla į paviršių, judina žiaunų dangtelį ir atsako į dirgiklius. Nenormalaus elgesio požymiai būtų, pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštiejininkas arba nereguliarus plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir atsako į dirgiklius nebuvimas. Be to, reikėtų užrašyti, jei skirtinguose veikimo induose pastebima didelių maisto suvartojimo skirtumų. Be kita ko, prie didelių vystymosi defektų ir sužeidimų būtų galima priskirti morfologinius išsigimimus (pvz., galūnių deformaciją), kraujuojančias žaizdas, bakterinę arba grybelinę infekciją. Šie požymiai yra kokybiniai ir juos reikėtų laikyti panašiais klinikiniams ligos ar streso požymiams ir lyginti su kontroliniais gyvūnais. Jei reiškiniai arba jų dažnumas yra didesnis induose su chemine medžiaga nei kontroliniuose induose, juos reikėtų aiškinti kaip aiškaus toksiškumo įrodymą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų rinkimas

42. Visus duomenis reikėtų rinkti naudojant elektronines arba rankines sistemas, kurios atitinka gerą laboratorinę praktiką (GLP). Tyrimo duomenis turėtų sudaryti:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas: fizikinės ir cheminės savybės; informacija apie stabilumą ir biologinį skaidumą;
- cheminė informacija ir duomenys: tirpalų ruošimo metodas ir dažnumas. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą sudaro bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka kai kuriais atvejais, ne pradinės cheminės medžiagos faktinės ir nominaliosios koncentracijos vertės. Gali tekti atlikti bandomosios cheminės medžiagos pradinių tirpalų ir bandymo tirpalų matavimus;
- tirpiklis (jei ne vanduo): tirpiklio pasirinkimo pagrindimas ir tirpiklio apibūdinimas (tipas, naudota koncentracija);

Bandymo sąlygos:

- darbo eigos duomenys: juos sudaro pastebėjimai apie bandymo sistemos veikimą, jos aplinką ir infrastruktūrą. Tipinius duomenis sudaro: aplinkos temperatūros, bandymo temperatūros, dienos šviesos trukmės, svarbių poveikio sistemos komponentų būklės (pvz., siurblių, ciklų skaitiklių, slėgio vertės), srautų, vandens lygių, pradinį tirpalų butelių keitimo ir maitinimo duomenys. Bendruosius vandens kokybės parametrus sudaro: pH, ištirpus deguonis, laidis, suminis jodo kiekis, šarmingumas ir kietumas;
- nukrypimai nuo bandymo metodo: šią informaciją turėtų sudaryti visa informacija arba išsamūs visų nukrypimų nuo bandymo metodo aprašymai;

Rezultatai:

- biologiniai stebėjimai ir duomenys: juos sudaro kasdieniai gaištamumo, maisto suvartojimo, nenormalaus plaukimo elgesio, apsnūdimo, pusiausvyros praradimo, defektų, sužeidimų ir kt. duomenys. Stebėjimus ir duomenis, surinktus iš anksto nustatytais intervalais, sudaro: vystymosi stadija, užpakalinių galūnių ilgis, atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos ir šlapio kūno masė;
- statistinės analizės metodai ir taikytų metodų pagrindimas; statistinės analizės rezultatai, pageidautina, lentelių pavidalu;
- histologiniai duomenys: juos sudaro išsamūs aprašymai, taip pat specifinių stebėjimo duomenų sunkumo klasė ir dažnumo balas, kaip išsamiai aprašyta rekomendaciniame histopatologijos dokumente;
- ad hoc stebėjimai: šie stebėjimai turėtų apimti aprašomojo pobūdžio tyrimo aprašymus, kurių negalima priskirti pirmiau nurodytoms kategorijoms.

Duomenų pateikimas ataskaitoje

43. 2 priedėlyje pateiktos lentelinės skaičiuoklės kiekvienos dienos duomenims rinkti, kurias galima naudoti kaip neapdorotų duomenų įvesties ir visuminių statistinių duomenų skaičiavimo rekomendacijas. Be to, pateiktos ataskaitų rengimo lentelės, kurios yra patogus vertinamųjų baigčių duomenų santraukos pateikimo būdas. Histologinio vertinimo ataskaitų lentelės pateiktos 2 priedėlyje.

Bandymo charakteristikų kriterijai ir jo priimtumas ar tinkamumas

44. Paprastai, jei yra didelių nukrypimų nuo bandymo metodo, gauti duomenys yra nepakankamai priimtini, kad juos būtų galima aiškinti arba pateikti ataskaitoje. Todėl buvo sukurti šie 4 lentelėje pateikti kriterijai kaip rekomendacijos nustatant atliekamo bandymo kokybę ir bendrąsias kontrolinių organizmų charakteristikas.

4 lentelė.

AMA charakteristikų kriterijai

Kriterijus	Priimtinos ribos
Bandymo koncentracijos vertės	Variacijos koeficientas (CV) yra $\leq 20\%$ (išmatuotos bandymo koncentracijos kintamumas) 21 dienos bandymo laikotarpiu
Kontrolinio bandinio gyvūnų gaištamumas	$\leq 10\%$, bet kurio kartotinio kontrolinio bandinio indo gyvūnų gaištamumas neturėtų būti didesnis kaip 2 buožgalviai
Minimali medianinė kontrolinės grupės gyvūnų vystymosi stadija bandymo pabaigoje	57
Kontrolinės grupės gyvūnų vystymosi stadijos sklaida	Vystymosi stadijų skirstinio 10-oji ir 90-oji procentilės neturėtų skirtis daugiau kaip 4 stadijomis
Ištirpusio deguonies koncentracija	$\geq 40\%$ soties ore (*)

Kriterijus	Priimtinos ribos
pH	pH turėtų būti 6,5–8,5. Skirtumas tarp vienos bandomosios grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesnis kaip 0,5
Vandens temperatūra	22° ± 1 °C, skirtumas tarp vienos bandomosios grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesnis kaip 0,5 °C
Bandymo koncentracijos vertės, kurioms negaunama aiškaus toksiškumo	≥ 2
Kartotinių bandinių charakteristikos	≤ 2 kartotiniai bandiniai gali neatitikti reikalavimų per visą tyrimą
Specialiosios tirpiklio naudojimo sąlygos	Jei kaip nešiklis naudojamas tirpiklis, reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinius bandinius ir švaraus vandens kontrolinius bandinius, o rezultatus pateikti ataskaitoje
	Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tirpiklio kontrolinių bandinių ir švaraus vandens kontrolinių bandinių grupių apdorojami specialiu būdu. Daugiau informacijos pateikta toliau
Specialiosios statinio atnaujinimo sistemos sąlygos	Ataskaitoje reikėtų pateikti reprezentatyvios cheminės analizės prieš atnaujinimą ir po jo duomenis
	Amoniakio koncentracija turėtų būti matuojama prieš pat atnaujinimą
	Visi vandens kokybės parametrai, išvardyti 1 priedėlio 1 lentelėje, turėtų būti matuojami prieš pat atnaujinimą
	Atnaujinimo laikotarpio trukmė neturėtų būti didesnė kaip 72 h
	Reikiamas maitinimo grafikas (50 % dienos normos sudaro prekyboje esantis buožgalvių maistas)
(*) Vandens aeravimą gali užtikrinti barboteriai. Barboterius rekomenduojama įrengti tokia lygyje, kad jie nesukeltų buožgalviams nereikalingo streso.	

Tyrimo tinkamumas

45. Tyrimas turėtų atitikti šiuos reikalavimus, kad jis galėtų būti laikomas priimtinu ar tinkamu:

Tinkamas tyrimo bandymas, kuriuo nustatomas neigiamas cheminės medžiagos poveikis skydliaukės veiklai:

- (1) bet kurios bandomosios grupės (įskaitant jos kontrolinius bandinius) buožgalvių gaištamumas negali būti didesnis kaip 10 %; bet kuriame kartotinio bandinio inde buožgalvių gaištamumas negali būti didesnis kaip trys buožgalviai, priešingu atveju laikoma, kad kartotinis bandinys neatitinka reikalavimų;
- (2) analizei turėtų būti pateikti ne mažiau kaip dviejų bandomųjų grupių visi keturi reikalavimus atitinkantys kartotiniai bandiniai;
- (3) analizei turėtų būti pateikti ne mažiau kaip dviejų bandomųjų grupių, kurių atveju nestebimas aiškus toksiškumas, bandiniai.

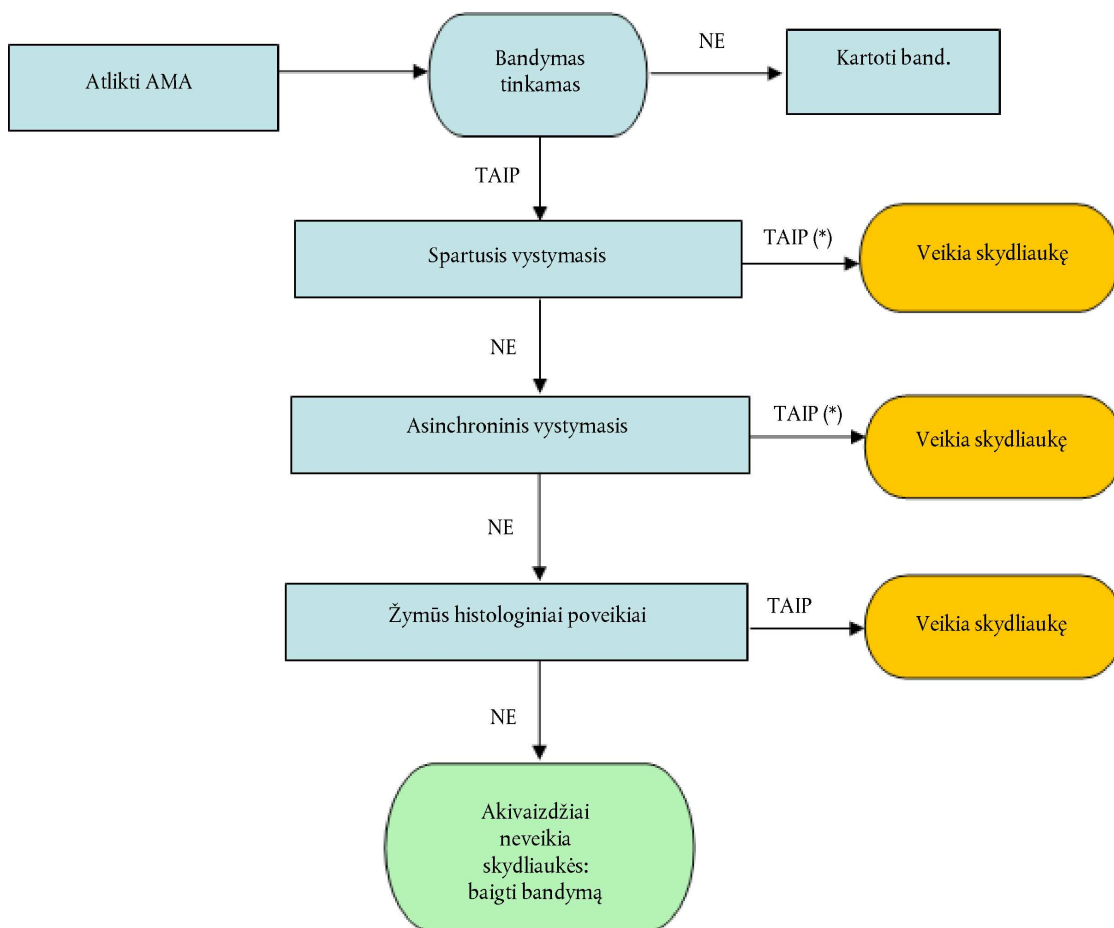
Tinkamas tyrimo bandymas, kuriuo nustatomas teigiamas cheminės medžiagos poveikis skydliaukės veiklai:

- (1) kontrolinės grupės gaištamumas gali būti ne didesnis kaip du buožgalviai vienam kontroliniam bandiniui.

Sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema

46. Buvo sukurta sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema, kurioje būtų pateikti biologinio tyrimo atlikimo ir jo rezultatų aiškinimo loginiai veiksmai (žr. 3 paveikslą schemą). Iš esmės pagal sprendimo priėmimo loginę schemą didesnis svoris tenka sparčiojo vystymosi, asinchroninio vystymosi ir skydliaukės histopatologijos vertinamosioms baigtims, o vėluojančio vystymosi, atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos ir šlapio kūno masės parametrams, kuriems įtakos gali turėti bendras toksiškumas, tenka mažesnis svoris.

3 paveikslas.

Sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema

(*) Nežiūrint į reikšmingus sparčiojo ir asinchroninio vystymosi skirtumus, kai kurios reguliavimo institucijos gali pareikalausti, kad būtų atlikta histologijos analizė. Šį tyrimą atliekanti įstaiga prieš tyrimo pradžią raginama tartis su kompetentingomis institucijomis, kad būtų nustatytos reikiamos vertinamosios baigtys.

Spartusis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadiją, SVL ir HLL)

47. Žinoma, kad spartųjį vystymąsi sukelia tik su skydliaukės hormonais susiję poveikiai. Tai gali būti periferinių audinių poveikiai, pvz., tiesioginė sąveika su skydliaukės hormonų receptoriais (pvz., su T4), arba poveikiai, kurie keičia cirkuliuojančių skydliaukės hormonų koncentraciją. Abiem atvejais tai laikoma pakankamu įrodymu, kad cheminė medžiaga daro įtaką skydliaukės veiklai. Spartusis vystymasis vertinamas vienu iš dviejų būdų. Pagal pirmąjį, taikant standartizuotą metodą, išsamiai aprašytą Nieuwkoop ir Faber (8) galima įvertinti bendrąją vystymosi stadiją. Taikant antrąjį, galima kiekybiškai įvertinti specifines morfolgines savybes, pvz., užpakalinių galūnių ilgį 7 ir 21 dieną, kuris yra teigiamai susijęs su skydliaukės hormonų receptoriaus agonistiniais poveikiais. Jei statistiškai reikšmingai pailgėja užpakalinė galūnė, bandymas rodo, kad cheminė medžiaga daro įtaką skydliaukės veiklai.
48. Gyvūnų spartesnio vystymosi, palyginti su kontroline populiacija, bandymo įvertinimas bus pagrįstas šių keturių vertinamųjų baigčių statistinės analizės rezultatais:
- užpakalinės galūnės ilgio (normalizuotu SVL atžvilgiu) 7 tyrimo dieną;
 - užpakalinės galūnės ilgio (normalizuotu SVL atžvilgiu) 21 tyrimo dieną;
 - vystymosi stadijos 7 tyrimo dieną;
 - vystymosi stadijos 21 tyrimo dieną.
49. Užpakalinių galūnių ilgio statistinė analizė turėtų būti atliekama matuojant kairiąją užpakalinę galūnę. Užpakalinės galūnės ilgis normalizuojamas, imant gyvūno užpakalinės galūnės ilgio ir atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos santykį. Lyginamas kiekvienai bandomajai grupei gautų normalizuotų verčių vidurkis. Vystymosi spartėjimą rodo chemine medžiaga paveiktos grupės reikšmingas (normalizuoto) vidutinio užpakalinės galūnės ilgio padidėjimas 7 ir (arba) 21 tyrimo dieną, palyginti su kontroline grupe (žr. 3 priedėlį).
50. Vystymosi stadijos statistinę analizę reikėtų atlikti nustatant vystymosi stadijas pagal Nieuwkoop ir Faber aprašytus morfolginius kriterijus (8). Vystymosi spartėjimą rodo tai, kad, atliekant daugybinės dichotomijos analizę, 7 ir (arba) 21 tyrimo dieną aptinkamas reikšmingas bandomosios grupės vystymosi stadijos verčių padidėjimas, palyginti su kontroline grupe.
51. AMA bandymo metodu nustatytas reikšmingas poveikis vienai iš pirmiau išvardytų keturių vertinamųjų baigčių laikomas pakankamu, kad būtų galima padaryti teigiamą išvadą dėl sparčiojo vystymosi. Tai reiškia, kad, nustačius reikšmingą poveikį užpakalinės galūnės ilgiui tam tikru laiko momentu, jo nereikia patvirtinti reikšmingais poveikiais užpakalinės galūnės ilgiui kitu laiko momentu arba reikšmingais poveikiais vystymosi stadijai tuo pačiu laiko momentu. Kita vertus, nustačius reikšmingą poveikį vystymosi stadijai tam tikru laiko momentu, jo nereikia patvirtinti reikšmingais poveikiais vystymosi stadijai kitu laiko momentu arba reikšmingais poveikiais užpakalinės galūnės ilgiui tuo pačiu laiko momentu. Visgi sparčiojo vystymosi įrodymo galia padidėtų, jei reikšmingi poveikiai būtų aptikti daugiau kaip vienai vertinamajai baigčiai.

Asinchroninis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadijos kriterijus)

52. Asinchroninis vystymasis apibūdinamas morfogenezes santykinio laikinio poslinkio arba to paties buožgalvio skirtingų audinių vystymosi. Negalėjimas aiškiai nustatyti organizmo vystymosi stadijos pagal jai būdingomis laikomų morfolginių vertinamųjų baigčių rinkinį, rodo, kad vykstant metamorfozei audiniai vystosi asinchroniškai. Asinchroninis vystymasis yra poveikio skydliaukei rodiklis. Vienintelis žinomas asinchroninį vystymąsi sukeliantis veikimo būdas yra cheminių medžiagų poveikis periferiniam skydliaukės hormonų veikimui ir (arba) skydliaukės hormonų metabolizmui besivystančiuose audiniuose, pvz., stebimas pagal dejodinazės inhibitorius.
53. Bandymo gyvūnų asinchroninio vystymosi, palyginti su kontroline populiacija, įvertinimas pagrįstas bandymo gyvūnų makroskopinės morfologijos vertinimu 7 ir 21 tyrimo dieną.
54. Nieuwkoop ir Faber pateiktas *Xenopus laevis* normalaus vystymosi aprašymas (8) yra normalios audinių rekonstrukcijos sekos identifikavimo schema. Terminas „asinchroninis vystymasis“ taikomas konkrečiai tiems

buožgalvių makroskopinės morfologijos vystymosi nukrypimams, kurie neleidžia vienareikšmiškai nustatyti vystymosi stadijos pagal Nieuwkoop ir Faber kriterijus (8), nes pagrindiniai morfologiniai požymiai rodo skirtingų stadijų charakteristikas.

55. Taikant terminą „asinchroninis vystymasis“ turima omenyje, kad reikėtų atsižvelgti tik į tam tikrų audinių rekonstrukcijos eigos nukrypimus, palyginti su kitų audinių rekonstrukcijos eiga. Kai kuriuos klasikinius fenotipus sudaro priekinių galūnių atsiradimo vėlavimas arba jų nebuvimas nepaisant normalaus arba sparčiojo užpakalinių galūnių ir uodegos audinių vystymosi, arba priešlaikinė žiaunų rezorbcija užpakalinių galūnių morfogenezės stadijos ir uodegos rezorbcijos atžvilgiu. Gyvūno vystymasis užrašomas kaip asinchroninis, jei neįmanoma priskirti vystymosi stadijos, nes gyvūnas neatitinka tam tikros Nieuwkoop ir Faber stadijos (8) daugumos reikšmingų vystymosi kriterijų arba jei ypač vėluoja arba sparčiai vystosi vienas arba keli pagrindiniai elementai (pvz., uodega visiškai rezorbuota, bet priekinės galūnės nepasirodė). Atliekamas kokybinis vertinimas ir reikėtų ištirti visą grupę Nieuwkoop ir Faber išvardytų reikšmingų elementų (8). Tačiau nebūtina užrašyti stebimų gyvūnų įvairių reikšmingų elementų vystymosi būsenos. Gyvūnai, kurie registruojami kaip asinchroninio vystymosi gyvūnai, Nieuwkoop ir Faber (8) vystymosi stadijai nepriskiriami.
56. Taigi esminis kriterijus, pagal kurį nenormalaus morfologinio vystymosi atvejai priskiriami asinchroniniam vystymuisi, yra tai, kad įvyksta audinių rekonstrukcijos ir audinių morfogenezės santykinis laiko poslinkis, o paveiktų audinių morfologija nėra aiškiai nenormali. Vienas šio makroskopinių morfologinių defektų aiškinimo pavyzdys yra pavėluota užpakalinių galūnių morfogenezė kitų audinių vystymosi atžvilgiu, kuri atitinka „asinchroninio vystymosi“ kriterijų, bet užpakalinių galūnių nebuvimas, pirštų defektai (pvz., ektradaktilija, polidaktilija) arba kiti aiškūs galūnių defektai neturėtų būti laikomi asinchroniniu vystymusi.
57. Atsižvelgiant į tai, pagrindinius morfologinius kriterijus, kurių suderintą metamorfozę reikėtų įvertinti, turėtų sudaryti užpakalinių galūnių morfogenezė, priekinių galūnių morfogenezė, priekinių galūnių atsiradimas, uodegos rezorbcijos stadija (ypač uodeginio peleko rezorbcijos) ir galvos morfologija (pvz., žiaunų dydis ir žiaunų rezorbcijos stadija, apatinio žandikaulio morfologija, Meckel kremzlės išsikišimas).
58. Atsižvelgiant į cheminės medžiagos veikimo būdą, gali pasitaikyti skirtingų makroskopinių morfologinių fenotipų. Kai kuriuos klasikinius fenotipus sudaro priekinės galūnės atsiradimo vėlavimas arba jos nebuvimas nepaisant normalaus ar sparčiojo užpakalinių galūnių ir uodegos audinių vystymosi, priešlaikinė žiaunų rezorbcija palyginti su užpakalinių galūnių ir uodegos rekonstrukcija.

Histopatologija

59. Jei cheminė medžiaga nesukelia aiškaus toksiškumo, nepaspartina vystymosi arba nesukelia asinchroninio vystymosi, įvertinama skydliaukių histopatologija naudojantis atitinkamomis gairėmis (9). Vystymosi vėlavimas nesant toksiškumo yra žymus antitiroidinio veikimo rodiklis, bet vystymosi stadijos analizė yra mažiau jautri ir mažiau tinka diagnozei nei skydliaukės histopatologinė analizė. Todėl šiuo atveju reikia atlikti skydliaukių histopatologinę analizę. Poveikis skydliaukės histologijai buvo įrodytas nesant poveikio vystymuisi. Jei yra skydliaukės histopatologijos pokyčių, laikoma, kad cheminė medžiaga veikia skydliaukę. Jei skydliaukių vystymosi vėlavimo arba histologinių pažeidimų nėra, laikoma, kad cheminė medžiaga skydliaukės neveikia. Šis sprendimas pagrįstas tuo, kad skydliaukę veikia TSH (skydliaukės stimuliavimo hormonas), todėl bet kuri cheminė medžiaga, kuri pakeičia skydliaukės hormonų cirkuliaciją taip, kad pasikeičia TSH išsiskyrimas, sukels jos histopatologinius pokyčius. Skydliaukės hormonų cirkuliaciją gali pakeisti įvairūs veikimo būdai ir mechanizmai. Taigi, nors skydliaukės hormonų lygis rodo su skydliauke susijusį poveikį, šio lygio nepakanka, kad būtų nustatyta, kuris veikimo būdas ar mechanizmas yra susijęs su atsaku.
60. Kadangi šiai vertinamajai baigčiai neįmanoma pritaikyti pagrindinių statistinių metodų, poveikį, susijusį su veikimu bandomąja chemine medžiaga, įvertina patologas.

Vėluojantis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadiją, HLL, kūno masę, SVL)

61. Vystymasis gali vėluoti dėl antitiroidinių mechanizmų ir dėl netiesioginio toksiškumo. Nedidelis vėlavimas kartu su aiškiais toksiškumo požymiais gali rodyti nespecifinį toksinį poveikį. Su skydliauke nesusijusio toksiškumo įvertinimas yra esminis bandymo elementas, kuris mažina klaidingų teigiamų rezultatų tikimybę.

Per didelis gaištamumas yra akivaizdus įrodymas, kad pasireiškia kiti toksiškumo mechanizmai. Panašiai nedidelis augimo sulėtėjimas, nustatytas pagal šlapio kūno masę ir (arba) SVL, taip pat leidžia daryti prielaidą, kad daromas toksinis poveikis, nesusijęs su skydliauke. Akivaizdus augimo spartėjimas stebimas tų cheminių medžiagų, kurios neigiamai veikia normalų vystymąsi, atveju. Taigi didesnių gyvūnų buvimas nebūtinai rodo su skydliauke nesusijusį toksiškumą. Tačiau nustatant su skydliauke susijusį toksiškumą niekuomet nereikėtų remtis vien tik augimu. Poveikis skydliaukei turėtų būti nustatomas augimo duomenis derinant kartu su vystymosi stadija ir skydliaukės histopatologija. Nustatant aiškų toksiškumą taip pat reikėtų atsižvelgti į kitas vertinamąsias baigtis, įskaitant edemą, kraujuojančias žaizdas, mieguistumą, mažesnę maisto suvartojimą, netvarkingą ar pakitusį plaukimą ir kt. Jei visoms koncentracijos vertėms matomi aiškaus toksiškumo požymiai, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti iš naujo bandoma esant mažesnei koncentracijai prieš nustatant, ar cheminė medžiaga gali veikti skydliaukę ar jos neveikia.

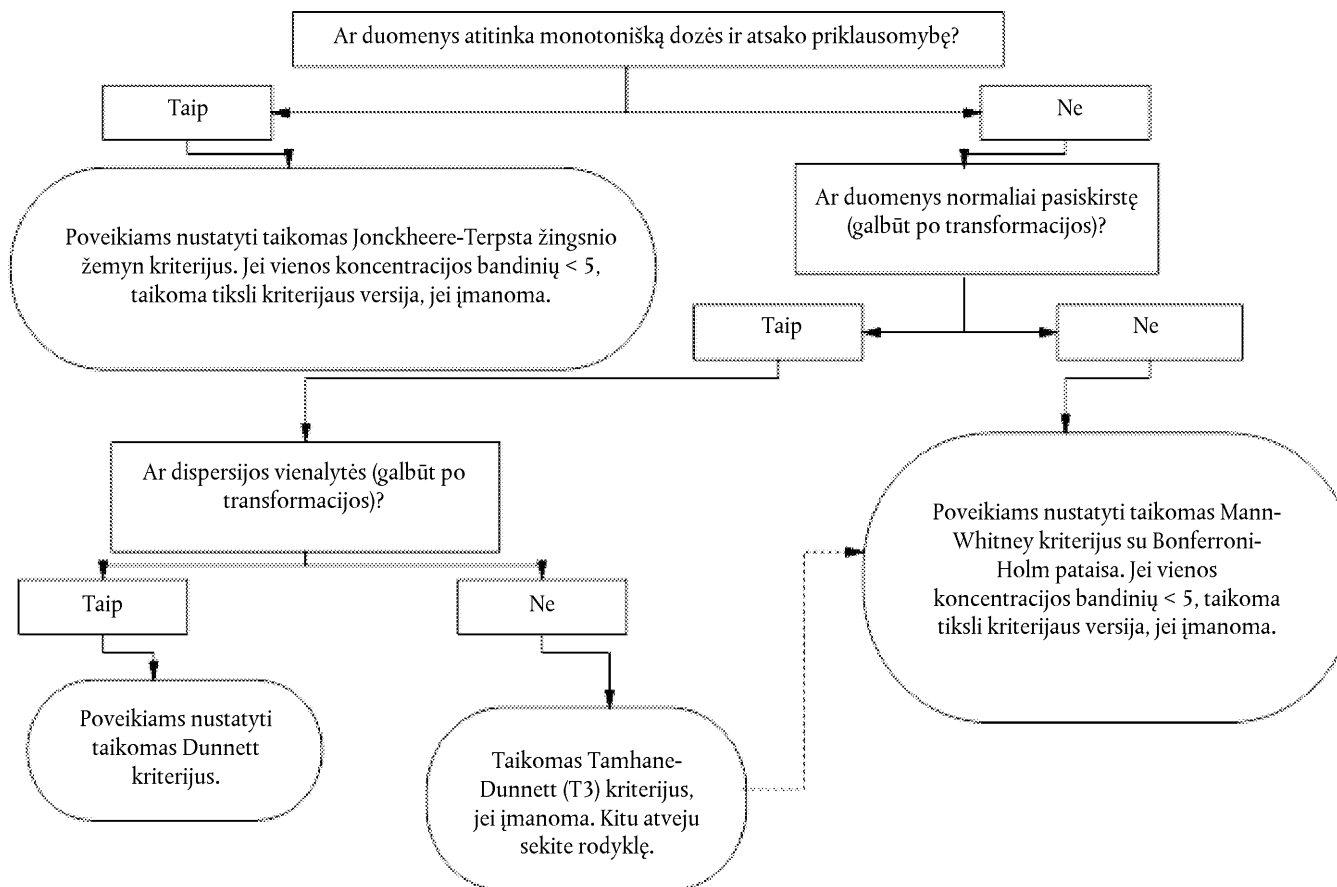
62. Statistiškai reikšmingas vystymosi vėlavimas, nesant kitų aiškaus toksiškumo požymių, rodo, kad cheminė medžiaga veikia skydliaukę (yra antagonistas). Nesant aiškių statistinių atsakų, šį rezultatą gali patvirtinti skydliaukės histopatologijos rezultatai.

Statistinė analizė

63. Statistinė duomenų analizė turėtų būti atliekama pagal procedūras, aprašytas dokumente *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). Visoms tolydžiosioms kiekybinėms vertinamosioms baigtims (HLL, SVL, šlapio kūno masė), kurios atitinka monotonišką dozės ir atsako priklausomybę, reikėtų taikyti Jonckheere-Terpstra kriterijų mažėjimo tvarka, kad būtų nustatytas reikšmingas veikimo bandomąja chemine medžiaga poveikis.
64. Jei tolydžiųjų vertinamųjų baigčių atveju dozės ir atsako priklausomybė nėra monotoniška, reikėtų įvertinti duomenų normalumą (pageidautina taikant Shapiro-Wilk ar Anderson-Darling kriterijų) ir sklaidos homogeniškumą (pageidautina, taikant Levene kriterijų). Abiem atvejais tikrinama atliekant ANOVA liekanų analizę. Vietoj šių oficialių normalumo ir sklaidos homogeniškumo tikrinimų galima klausti ekspertų nuomonės, tačiau pirmenybė teikiama oficialiems tikrinimams. Jei nustatomas nenormalumas arba sklaidos heterogeniškumas, reikėtų ieškoti normalizuojančios ir sklaidą stabilizuojančios transformacijos būdo. Jei duomenys (galbūt po transformacijos) pasiskirsto normaliai ir sklaida yra homogeniška, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas taikant Dunnett kriterijų. Jei duomenų (galbūt po transformacijos) pasiskirstymas yra normalus, bet sklaida yra heterogeniška, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas taikant Tamhane-Dunnett ar T3 kriterijų arba Mann-Whitney-Wilcoxon U kriterijų. Jei normalizavimo transformacijos neįmanoma rasti, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas pagal Mann-Whitney-Wilcoxon U kriterijų, naudojant Bonferroni-Holm p verčių pataisą. Dunnett kriterijus taikomas nepriklausomai nuo ANOVA F kriterijaus, o Mann-Whitney kriterijus taikomas nepriklausomai nuo visuminio Kruskal-Wallis kriterijaus.
65. Reikšmingo gaištamumo nesitikima, tačiau jį reikėtų įvertinti taikant Cochran-Armitage kriterijų mažėjimo tvarka, jei duomenys atitinka monotonišką dozės ir atsako priklausomybę, priešingu atveju – pagal Fisher tikslųjį kriterijų su Bonferroni-Holm pataisa.
66. Reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis vystymosi stadijai nustatomas mažėjimo tvarka taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų, kuris būtų taikomas kartotinių bandinių medianinėms vertėms. Kaip alternatyvą ir kaip pageidautiną metodą poveikiui nustatyti, reikėtų taikyti daugybinės dichotomijos Jonckheere kriterijų rezultatams nuo 20-osios iki 80-osios procentilės, nes jį taikant atsižvelgiama į pasiskirstymo profilio pokyčius.
67. Tinkamas analizės vienetas yra kartotinis bandinys, todėl duomenis sudaro kartotinių bandinių medianos, jei taikomas Jonckheere-Terpstra ar Mann-Whitney U kriterijus, arba kartotinių bandinių vidurkiai, jei taikomas Dunnett kriterijus. Dozės ir atsako priklausomybės monotoniškumą galima įvertinti vizualiai pagal kartotinių bandinių ir bandomųjų koncentracijų vidurkius ar medianas arba pagal pirmiau aprašytus oficialius kriterijus (11). Jei iš kiekvienos bandomosios ar kontrolinės grupės gaunami mažiau negu penki kartotiniai bandiniai, reikėtų taikyti tiksliai Jonckheere-Terpstra ir Mann-Whitney kriterijų randomizavimo versijas, jei yra. Visų nurodytų kriterijų statistinis reikšmingumo lygmuo yra 0,05.
68. 4 paveiksle pateikta tolydžiųjų duomenų statistinių kriterijų taikymo schema.

Statistinių metodų taikymo tolydžiojo atsako duomenims schema

Tolydžiojo atsako schema



Specialieji duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių bandomųjų grupių naudojimas

69. Sprendžiant, ar kurio nors kartotinio bandinio arba visos bandomosios grupės gyvūnai rodo aiškius toksiškumo požymius ir juos reikėtų pašalinti iš analizės, atsižvelgiama į kelis veiksnius. Aiškus bet kurio kartotinio bandinio toksiškumas apibrėžiamas kaip > 2 gaištamumas, kurį galima paaiškinti toksiškumu, bet ne technine klaida. Kitus aiškaus toksiškumo požymius sudaro kraujavimas, nenormalus elgesys, nenormalūs plaukimo judesiai, nevalgumas ir visi kiti klinikiniai ligos požymiai. Gali prireikti kokybinio subletalų toksiškumo požymių įvertinimo ir jį reikėtų atlikti lyginant su švaraus vandens kontrolinėmis grupėmis.

Tirpiklio kontroliniai bandiniai

70. Tirpiklio naudojimas turėtų būti laikomas kraštutine priemone, kai yra išnagrinėtos visos kitos veikimo chemine medžiaga galimybės. Jei naudojamas tirpiklis, kartu turėtų būti naudojamas švaraus vandens kontrolinis bandinys. Baigus bandymą reikėtų įvertinti galimą tirpiklio poveikį. Tai daroma atliekant statistinį tirpiklio kontrolinės grupės ir švaraus vandens kontrolinės grupės palyginimą. Tinkamiausios šios analizės vertinamosios baigtys, į kurias reikėtų atsižvelgti, yra vystymosi stadija, SVL ir šlapio kūno masė, nes jie gali būti paveikti net jei bandomoji medžiaga ir nėra toksiška skydliaukei. Jei tarp tirpiklio kontrolinės grupės ir švaraus vandens kontrolinės grupės vertinamųjų baigčių aptinkamas statistiškai reikšmingas skirtumas, tyrimo atsako vertinamosios baigtys nustatomos atsižvelgiant į švaraus vandens kontrolinę grupę. Jei tarp visų išmatuotų švaraus vandens kontrolinės grupės ir tirpiklio kontrolinės grupės atsako kintamųjų statistiškai reikšmingo skirtumo nėra, tyrimo atsako vertinamosios baigtys nustatomos naudojant jungtinius skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių duomenis.

Bandomosios grupės, kurios pasiekia 60 ir vėlesnę vystymosi stadiją

71. Po 60 stadijos dėl audinių rezorbcijos ir absoliučio vandens kiekio sumažėjimo mažėja buožgalvių dydis ir masė. Taigi šlapio kūno masės ir SVL matavimų negalima tinkamai naudoti statistinei augimo spartos skirtumų analizei. Todėl $> NF60$ organizmų šlapio kūno masės ir ilgio duomenis reikėtų atmesti ir jų negalima naudoti atliekant kartotinių bendinių vidurkių arba kartotinių bandinių medianų analizę. Šiuos su augimu susijusius parametrus būtų galima analizuoti dviem skirtingais metodais.
72. Pagal vieną iš metodų šlapio kūno masės ir (arba) SVL statistinė analizė atliekama atsižvelgiant tik į tuos buožgalvius, kurių vystymosi stadija yra lygi 60 arba mažesnė. Manoma, kad šis metodas suteikia pakankamai patikimą informaciją apie galimo poveikio augimui rimtumą tol, kol tik nedidelė bandymo gyvūnų dalis neįtraukiama į analizę ($\leq 20\%$). Jei vienos ar kelių nominaliųjų koncentracijos verčių didelio buožgalvių skaičiaus vystymosi stadija yra didesnė nei 60 ($\geq 20\%$), visiems buožgalviams reikėtų atlikti dvifaktoriinę ANOVA su hierarchine dispersijos struktūra, kad būtų įvertintas veikimo bandomąja chemine medžiaga poveikis augimui, atsižvelgiant į vėlesnės vystymosi stadijos poveikį augimui. 3 priedėlyje pateiktos rekomendacijos dėl masės ir ilgio dvifaktoriinės ANOVA analizės.

NUORODOS

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76, Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92, Paris
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23, Paris

- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
 - (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98
 - (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551
 - (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
 - (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
 - (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
 - (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69-92.
-

1 priedėlis

1 lentelė.

21 dienos varliagyvių metamorfozės tyrimo bandymų sąlygos

Bandomieji gyvūnai	<i>Xenopus laevis</i> lervos	
Pradinė lervų stadija	Neuwkoop ir Faber 51 stadija	
Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis	21 diena	
Lervų atrankos kriterijai	Vystymosi stadija ir visas ilgis (neprivalomas)	
Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės	Ne mažiau kaip 3 koncentracijos vertės, apimančios maždaug vieną dydžio eilę	
Veikimo bandomąja medžiaga režimas	Pratekėjimo (pageidautina) ir (arba) statinio atnaujinimo	
Bandymo sistemos srautas	25 ml/min (visiškas tūrio pasikeitimas maždaug kas 2,7 h)	
Pirminės vertinamosios baigtys / Nustatymo dienos	Gaištamumas	Kasdien
	Vystymosi stadija	7 ir 21 diena
	Užpakalinių galūnių ilgis	7 ir 21 diena
	Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos	7 ir 21 diena
	Šlapio kūno masė	7 ir 21 diena
	Skydliaukės histologija	21 diena
Skiedimo vanduo/Laboratorinė kontrolė	Vandentiekio vanduo be chloro (filtruotas per aktyvintąsias angis) arba lygiavertis laboratorijos šaltinis	
Lervų tankis	20 lervų viename bandymo inde (5 / l)	
Bandymo tirpalas / Bandymo indas	4–10 l (ne mažiau kaip 10–15 cm vandens) / Stiklinis arba nerūdijančiojo plieno bandymo indas (pvz., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Kartotiniai bandiniai	po 4 kartotinius bandymo indus kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontrolinei grupei	
Priimtinas gaištamumas kontrolinių bandinių induose	≤ 10 % viename kartotinio bandinio inde	
Skydliaukės fiksavimas	Gyvūnų skaičius	Visi buožgalviai (5 iš kiekvieno kartotinio bandinio įvertinami pradžioje)
	Sritis	Galva arba visas kūnas
	Fiksavimo skystis	Davidsono fiksatorius

Maitinimas	Maistas	Sera Micron® arba lygiavertis
	Kiekis / Dažnumas	Dėl maitinimo režimo maitinant Sera Micron® žr. 1 lentelę
Apšvietimas	Dienos šviesos trukmė	12 h šviesa: 12 h tamsa
	Apšvieta	nuo 600 iki 2 000 liuksų (matuojama vandens paviršiuje)
Vandens temperatūra		22° ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Ištirpusio deguonies (DO) koncentracija		> 3,5 mg/l (> 40 % soties ore)
Analizinės chemijos ėminių grafikas		Kartą per savaitę (4 ėminių ėmimo kartai/bandymui)

2 priedėlis

Neapdorotų duomenų ir suvestinių duomenų pateikimo lentelės

1 lentelė.

Bendroji informacija apie bandomąją cheminę medžiagą

Cheminė informacija			
Įrašoma bandomoji cheminė medžiaga, koncentracijos vienetai ir bandomosios grupės			
	Bandomoji cheminė medžiaga:		
	Koncentracijos vienetai:		
	1 bandomoji grupė		
	2 bandomoji grupė		
	3 bandomoji grupė		
	4 bandomoji grupė		
	Data (0 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)
	Data (7 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)
	Data (21 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)

2 lentelė.

Neapdorotų 7 ir 21 dienos duomenų rinkimo lentelės

X DIENA

DATA 00.00.00

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

3 lentelė.

Apskaičiuotos 7 ir 21 dienos vertinamųjų baigčių duomenų suvestinės

		Vystymosi stadija			SVL (mm)		Užpakalinės galūnės ilgis (mm)		Masė (mg)	
		min	mediana	maks	vidurkis	std nuokryp-is	vidurkis	std nuokryp-is	vidurkis	std nuokryp-is
Band-omios grupės Nr.	Karto-tinio bandinio Nr.									
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Pastaba. Skaiciavimo duomenys langeliuose susiję su 2 lentelės duomenų įvestimis.

4 lentelė.

Dienos gaištamumo duomenys

Bandymo diena	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Vertė!																
2	#Vertė!																
3	#Vertė!																
4	#Vertė!																
5	#Vertė!																
6	#Vertė!																
7	#Vertė!																
8	#Vertė!																
9	#Vertė!																
10	#Vertė!																
11	#Vertė!																
12	#Vertė!																
13	#Vertė!																
14	#Vertė!																
15	#Vertė!																
16	#Vertė!																
17	#Vertė!																
18	#Vertė!																
19	#Vertė!																
20	#Vertė!																
21	#Vertė!																
Iš viso kartotiniuose bandiniuose		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iš viso bandomosiose grupėse		0				0				0				0			

Pastaba. Skaiciavimo duomenys langeliuose susiję su 1 lentelės duomenų įvestimis.

5 lentelė.

Vandens kokybės kriterijai

Poveikio sistema (pratekamoji/statinio atnaujinimo):

Temperatūra:

Apšvieta:

Šviesos ir tamsos ciklas:

Maistas:

Maitinimo dažnumas:

Vandens pH:

Jodo koncentracija bandymo vandenyje:

6 lentelė.

Cheminių duomenų suvestinė

Cheminės medžiagos pavadinimas:

CAS #:

[illegible]

Cheminės medžiagos pavadinimas:

CAS #:

Bandymo diena	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Vertė!																				
7	#Vertė!																				
8	#Vertė!																				
9	#Vertė!																				
10	#Vertė!																				
11	#Vertė!																				
12	#Vertė!																				
13	#Vertė!																				
14	#Vertė!																				
15	#Vertė!																				
16	#Vertė!																				
17	#Vertė!																				
18	#Vertė!																				
19	#Vertė!																				
20	#Vertė!																				
21	#Vertė!																				

Pastaba. Skaiciavimo duomenys langeliuose susiję su 1 lentelės duomenų įvestimis.

8 lentelė.

Papildomi histopatologiniai kriterijai

Data:

Cheminė medžiaga:

Patologas:

1 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
2 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

9 lentelė.

Histopatologinių duomenų išsamus aprašymas

Data:

Cheminė medžiaga:

Patologas:

Aprašymas

1 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		
1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		

AMA vystymosi stadijos x dienos (7 arba 21) lentelės šablonas

		Kontrolinis bandinys				1 dozė					2 dozė					3 dozė				
Vertinamoji baigtis	Kartotinis bandinys	Vidurkis	SD	CV	N	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė
Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			
Šlapio kūno masė (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			

AMA vystymosi stadijos x dienos (7 arba 21) duomenų pateikimo lentelės šablonas

		Kontrolinis bandinys				1 dozė					2 dozė					3 dozė				
	Kartotinis bandinys	Mediana	Min	Ma-ks	N	Mediana	Min	Ma-ks	N	p vertė	Mediana	Min	Ma-ks	N	p vertė	Mediana	Min	Ma-ks	N	p vertė
Vystymosi stadija	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			

3 priedėlis

Alternatyvus masės ir ilgio analizės metodas, taikomas, kai daugiau kaip 20 % buožgalvių būdinga vėlyvoji vystymosi stadija esant vienai ar kelioms koncentracijos vertėms

Jei esant vienai arba kelioms nominaliosios koncentracijos vertėms didelė dalis buožgalvių (≥ 20 %) pasiekia vėlesnę nei 60 stadiją, visiems buožgalviams reikėtų taikyti dvifaktoriinę ANOVA su hierarchine dispersijos struktūra, kad būtų įvertinti su veikimu bandomąja chemine medžiaga susiję augimo veiksniai, atsižvelgiant į vėlyvosios vystymosi stadijos poveikį augimui.

Siūloma naudoti visus duomenis, bet atsižvelgti į vėlyvosios vystymosi stadijos poveikį. Tai galima padaryti taikant dvifaktoriinę ANOVA su hierarchine (įdėtąja) sklaidos struktūra. Apibrėžiama, kad gyvūno vėlyvoji stadija yra „taip“ (LateStage='Yes'), jei jo vystymosi stadija yra 61 arba vėlesnė. Kitais atvejais apibrėžiama, kad vėlyvoji stadija yra „ne“ (LateStage='No'). Tada galima atlikti dviejų faktorių ANOVA naudojant koncentracijos verčių ir vėlyvosios stadijos sąveiką, kai kart(konc) yra atsitiktinis faktorius, o buožgalvių (kart) – atsitiktinis poveikis. Taikant šį metodą, kartotinis bandinys vis dar laikomas analizės vienetu, gaunant iš esmės tuos pačius rezultatus kaip atliekant kart*vėlyvosios stadijos vidurkių svertinę analizę vidurkiui tenkančių gyvūnų skaičiaus atžvilgiu. Jei duomenys neatitinka ANOVA normalumo arba dispersijos vienaalytiškumo reikalavimų, galima atlikti normalizuotą rangų transformaciją prieštaravimui pašalinti.

Be standartinių ANOVA F kriterijų dėl koncentracijos, vėlyvosios stadijos ir jų sąveikos poveikių, sąveikos F kriterijus gali būti „padalytas“ į du papildomus ANOVA F kriterijus, vienas – vėlyvosios stadijos „ne“ vidutinių atsako verčių pagal visas koncentracijos vertes, kitas – vėlyvosios stadijos „taip“ vidutinių atsako verčių pagal visas koncentracijos vertes. Toliau kiekvieno vėlyvosios stadijos lygio bandomosios medžiagos dozių vidurkiai lyginami kontrolinių bandinių atžvilgiu. Galima atlikti tendencijos analizę taikant tinkamus skirtumus arba paprastą lyginimą poporiui, jei yra įrodymų, kad tam tikro vėlyvosios stadijos kintamojo lygio dozės ir atsako priklausomybė yra nemonotoniška. Bonferroni-Holm p verčių pataisa daroma tik tada, jei atitinkama F kriterijaus dalis yra nereikšminga. Tai galima atlikti taikant SAS ir galbūt kitus statistinės programinės įrangos rinkinius. Gali kilti problemų, kai ne visoms koncentracijos vertėms gaunami vėlyvosios stadijos gyvūnai, bet jas galima išspręsti paprastu būdu.

4 priedėlis

Apibrėžtys

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

C.39. KOLEMBOLŲ REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 232 (2009). Šis bandymo metodas sukurtas siekiant įvertinti cheminių medžiagų poveikį kolembolų reprodukcijos našumui dirvožemyje. Bandymas pagrįstas esamomis procedūromis (1) (2). Partenogenetinės *Folsomia candida* ir lytinio dauginimosi *Folsomia fimetaria* yra dvi prieinamiausios kolembolų rūšys, jos yra auginamos ir jų galima nusipirkti. Jei reikia įvertinti specifinės buveinės, kurių nenaudoja šios dvi rūšys, procedūrą galima pritaikyti kitoms kolembolų rūšims, jei jos gali atitikti bandymo tinkamumo kriterijus.
2. Dirvožemyje gyvenančios kolembolos yra ekologiškai tinkamos rūšys ekotoksikologiniams bandymams atlikti. Kolembolos yra šešiakojai gyvūnai su plonu egzoskeletu, kuris yra ypač laidus vandeniui ir orui, ir šios rūšies nariuotakojų cheminės medžiagos paveikia kitais būdais ir kitu laipsniu negu sliekus ir enchitrėjus.
3. Daugelio žemės ekosistemų kolembolų populiacijos tankis paprastai yra 10^5 m^{-2} dirvožemio ir lapų paklotės sluoksnio (3) (4). Suaugusių gyvūnų ilgis paprastai yra 0,5–5 mm, jų indėlis į suminę dirvožemio gyvūnų biomasę ir kvėpavimą yra mažas ir įvertinamas nuo 1 % iki 5 % (5). Todėl jų svarbiausias vaidmuo gali būti mitybos mikroorganizmais ir mikrofauna procesų reguliatorių vaidmuo. Kolembolos yra labai įvairių dirvožemyje ir jo paviršiuje gyvenančių bestuburių gyvūnų, pvz., erkių, šimtakojų, vorų, žygių ir trumpasparnių vabalų, grobis. Kolembolos prisideda prie skaidymo procesų rūgščiuose dirvožemiuose, kuriuose jos ir enchitrėjai galbūt yra svarbiausi tokių dirvožemių bestuburiai, nes sliekų ir diplopodų paprastai nėra.
4. *F. fimetaria* paplitusi visame pasaulyje ir dažnai pasitaiko kelių tipų dirvožemyje, nuo smėlio iki priemolio ir nuo švelniojo iki šiurkščiojo humuso dirvožemyje. Tai beakė nepigmentuota kolembola. Ji aptinkama visos Europos žemės ūkio paskirties dirvožemyje (6). Tai visaėdis gyvūnas, jos maistą sudaro grybienos hifai, bakterijos, pirmuonys ir detritas. Ėsdama ji sąveikauja su augalų patogeninių grybelių užkratais (7) ir gali turėti įtakos mikorizei, kaip nustatyta *F. candida* atveju. Kaip ir dauguma kolembolų rūšių, ji dauginasi lytiniu būdu, todėl būtinas nuolatinis patinėlių buvimas kiaušinėliams apvaisinti.
5. *F. candida* taip pat paplitusi visame pasaulyje. Nors daugumoje natūralių dirvožemių jos pasitaiko nedažnai, jų labai daug būna ten, kur gausu humuso. Tai beakė nepigmentuota kolembola. Ji turi gerai išvystytą furką (šokamąjį organą), aktyviai laksto ir lengvai šokinėja, jei būna sutrikdyta. Ekologinis *F. candida* vaidmuo panašus į *F. fimetaria* vaidmenį, bet jos buveinės yra daugiau organinių medžiagų turintys dirvožemiai. Ji dauginasi partenogenetiniu būdu. Patinų gali būti mažiau nei 1 tūkstančiui.

BANDYMO PRINCIPAS

6. Sinchroninės suaugusios kolembolos (*F. fimetaria*) arba jaunikliai (*F. candida*) veikiami kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga, įmaišyta į modifikuotą dirbtinį dirvožemį (8), turintį 5 % organinės medžiagos (arba alternatyvų dirvožemį). Bandymo scenarijų galima padalyti į du etapus:
 - intervalo nustatymo bandymą, jei turima per mažai informacijos apie toksiškumą, kai pagrindinės vertinamosios baigtys yra gaištamumas ir reprodukcija, *F. fimetaria* atveju vertinami po 2 savaitių, o *F. candida* – po 3 savaitių.
 - galutinį reprodukcijos bandymą, kai vertinamas iš motininių gyvūnų gautas suminis jauniklių skaičius ir motininių gyvūnų išgyvenamumas. Šis galutinis bandymas su *F. fimetaria* trunka 3 savaites, o su *F. candida* – 4 savaites.

Bandomosios cheminės medžiagos toksinis poveikis suaugusių gyvūnų gaištamumui ir reprodukcijos našumui išreiškiamas kaip LC_x ir EC_x , duomenims pritaikant tinkamą modelį netiesinės regresijos metodu, kad būtų galima įvertinti koncentraciją, kuri sukeltų x % gaištamumą arba reprodukcijos našumo sumažėjimą, arba kitaip išreiškiamas kaip NOEC/LOEC vertė (9).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos fizikines savybes, tirpumą vandenyje, $\log K_{ow}$, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą ir garų slėgį. Pageidautina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą dirvožemyje, pvz., fotolizės, hidrolizės ir biotinio skaidymo greitį. Reikėtų dokumentuoti cheminio bandomosios cheminės medžiagos identifikavimo pagal IUPAC duomenis, CAS numerį, partiją, siuntą, struktūrinę formulę ir grynumą, jei yra duomenų.
8. Šis bandymo metodas gali būti atliekamas ir su vandenyje tirpiomis, ir su netirpiomis cheminėmis medžiagomis. Tačiau atitinkamai skirtųsi bandomosios cheminės medžiagos įterpimo būdas. Bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, t. y. cheminėms medžiagoms, kurių Henrio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas yra didesnis už vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25° C temperatūroje didesnis kaip 0,0133 Pa.

BANDYMO TINKAMUMAS

9. Bandomąja medžiaga nepaveikti kontroliniai bandiniai turėtų atitikti šiuos kriterijus, kad bandymo rezultatas galėtų būti laikomas tinkamu:
 - vidutinis gaištamumas bandymo pabaigoje neturėtų būti didesnis kaip 20 %;
 - vidutinis jauniklių skaičius vienam indui bandymo pabaigoje turėtų būti ne mažesnis kaip 100;
 - variacijos koeficientas, apskaičiuotas galutinio bandymo pabaigoje esančių jauniklių skaičiui, turėtų būti mažesnis kaip 30 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

10. Etaloninę cheminę medžiagą, kurios koncentracija būtų pasirinkto tipo dirvožemio EC_{50} , reikėtų bandyti reguliariais laiko tarpais arba galbūt įtraukti į kiekvieną bandymą, kad būtų patikrinta, ar bandymo organizmų atsakas bandymo sistemoje yra normalaus lygio. Tinkama etaloninė medžiaga yra boro rūgštis, kuri turėtų sumažinti abiejų rūšių reprodukciją 50 % (10) (11), kai jos yra maždaug 100 mg/kg sausojo dirvožemio masės.

BANDYMO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir įranga

11. Kaip bandymo indai tiktų talpyklos, į kurias telpa 30 g drėgno dirvožemio. Talpyklų medžiaga turėtų būti stiklas arba inertinis plastikas (netoksinis). Tačiau indų iš plastiko reikėtų vengti, jei dėl sorbcijos sumažėja bandomosios cheminės medžiagos veikimas. Bandymo indų skerspjūvio plotas turėtų būti toks, kad faktinis dirvožemio sluoksnio storis bandymo inde galėtų būti 2–4 cm. Indai turi būti su dangčiais (pvz., stiklo ar polietileno), kurie suprojektuoti garavimui mažinti, bet kartu užtikrintų dujų mainus tarp dirvožemio ir atmosferos. Talpykla turėtų būti bent iš dalies skaidri, kad galėtų praleisti šviesą.
12. Reikalinga įprastinė laboratorijos ir ši specialioji įranga:
 - džiovavimo spinta;
 - stereomikroskopas;
 - pH metras ir liuksmetras;
 - tinkamos tiksliosios svarstyklės;
 - reikiama temperatūros kontrolės įranga;
 - reikiama oro drėgmės kontrolės įranga (nebūtina, jei ekspozicijos indai uždengti dangčiu);
 - reguliuojamos temperatūros inkubatorius arba maža patalpa;
 - pincetai arba mažos siurbimo galios oro siurbimo įtaisai.

Bandymo dirvožemio paruošimas

13. Naudojamas modifikuotas dirbtinis dirvožemis (8), kurio organinės medžiagos kiekis – 5 %. Taip pat galima naudoti natūralų dirvožemį, jei dirbtinis dirvožemis nepanašus į natūralų dirvožemį. Rekomenduojama tokia dirbtinio dirvožemio sudėtis (sausos medžiagos, išdžiovintos iki pastoviosios masės 105 °C temperatūroje, atžvilgiu):
- 5 % kiminių durpių, išdžiovintų ore ir smulkiai sumaltų (priimtinas dalelių dydis 2 ± 1 mm);
 - 20 % kaolino (pageidautinas didesnis kaip 30 % kaolinito kiekis);
 - maždaug 74 % išdžiovinto ore pramoninio smėlio (atsižvelgiant į reikiamą CaCO_3 kiekį), daugiausia smulkaus smėlio, kurio daugiau kaip 50 % dalelių būtų nuo 50 iki 200 mikronų. Tikslus smėlio kiekis priklauso nuo CaCO_3 kiekio (žr. toliau), nes kartu jie turėtų sudaryti iki 75 %.
 - 1,0 % kalcio karbonato (CaCO_3 , miltelių pavidalo, analiziškai grynas), kad būtų gauta $6,0 \pm 0,5$ pH vertė; pridedamo kalcio karbonato kiekis iš esmės gali priklausyti nuo durpių kokybės arba tipo (žr. 1 pastabą).
- 1 pastaba. Reikiamas CaCO_3 kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato komponentų ir turėtų būti nustatytas matuojant iš anksto inkubuotų drėgno dirvožemio ėminių pH prieš pat bandymą.
- 2 pastaba. Rekomenduojama matuoti dirvožemio pH ir galima (nebūtina) C/N santykį, katijonų mainų talpą ir organinės medžiagos kiekį, kad vėlesniame etape būtų įmanoma normalizuoti ir geriau aiškinti rezultatus.
- 3 pastaba. Prireikus, pvz., atsižvelgiant į specifinius bandymo tikslus, kaip bandymo ir (arba) kultūros auginimo substratą galima naudoti natūralius dirvožemius iš neužterštų vietų. Tačiau naudojant natūralų dirvožemį, jį reikėtų apibūdinti nurodant bent kilmę (surinkimo vietą), pH, tekstūrą (dalelių dydžio pasiskirstymą), katijonų mainų talpą ir organinės medžiagos kiekį, ir jame neturėtų būti jokių teršalų. Jei naudojamas natūralus dirvožemis, prieš jį naudojant galutiniam bandymui patariama įrodyti, ar jis tinka bandymui atlikti ir ar atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.
14. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys gerai sumaišomos (pvz., dideliu laboratoriniu maišikliu). Dirbtinio dirvožemio maksimali vandens sulaikymo geba (WHC) nustatoma pagal 5 priedėlyje aprašytas procedūras. Bandymo dirvožemio drėgmės kiekis turėtų būti optimalus, kad būtų gauta puri ir poringa dirvožemio struktūra, kuri sudarytų sąlygas kolemboloms patekti į poras. Jis paprastai yra nuo 40 % iki 60 % maksimalios WHC.
15. Nuo 2 iki 7 dienų prieš bandymo pradžią sausas dirbtinis dirvožemis iš anksto drėkinamas rūgštingumo pusiausvyrai pasiekti ar stabilizuoti įpilant dejonizuoto vandens, kuris turėtų sudaryti maždaug pusę galutinio vandens kiekio. Norint nustatyti pH, naudojamas dirvožemio ir 1 mol/l kalio chlorido (KCl) ar 0,01 mol/l kalcio chlorido (CaCl_2) tirpalo mišinys santykiu 1:5 (pagal 6 priedėlį). Jei dirvožemio rūgštingumas didesnis nei nustatytas pH intervalas, jį galima reguliuoti įdedant reikiamą CaCO_3 kiekį. Jei dirvožemio pH per didelis, jį galima sumažinti kolemboloms nekenksminga neorganine rūgštimi.
16. Iš anksto sudrėkintas dirvožemis dalijamas į tiek dalių, kiek yra bandymo koncentracijos verčių (ir etaloninės medžiagos, jei naudojama) ir bandymui naudojamų kontrolinių bandinių skaičius. Įdedama bandomųjų cheminių medžiagų, ir vandens kiekis reguliuojamas pagal 24 pastraipą.

Bandymo gyvūnų atranka ir paruošimas

17. Rekomenduojama partenogenetinė rūšis *F. candida*, nes atliekant bandymo metodo tarplaboratorinį tyrimą (11) ši rūšis dažniau nei *F. fimetaria* atitinka tinkamumo kriterijus dėl išgyvenamumo. Jei naudojamos alternatyvios rūšys, jos turėtų atitikti 9 pastraipoje nurodytus tinkamumo kriterijus. Bandymo gyvūnus reikėtų gerai maitinti nuo bandymo pradžios iki 23–26 dienų *F. fimetaria* amžiaus ir 9–12 dienų *F. candida* amžiaus. Kiekviename kartotiniame bandinyje *F. fimetaria* skaičius turėtų būti 10 patinų ir 10 patelių, o *F. candida* – 10 patelių (žr. 2 ir 3 priedėlius). Sinchroniniai gyvūnai parenkami iš lėkštelių atsitiktinai ir tikrinama kartotiniame bandiniui priskiriamos kiekvienos partijos gyvūnų sveikata ir fizinė būklė. Kiekviena 10 ar 20 gyvūnų grupė dedama į atsitiktinai parinktą bandymo indą ir pasirenkamos didelės *F. fimetaria* patelės, kad jas būtų galima tinkamai atskirti nuo *F. fimetaria* patinų.

Bandymo koncentracijos medžiagų ruošimas

18. Galima taikyti keturis bandomosios cheminės medžiagos įterpimo būdus: 1) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant vandenį, 2) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant organinį tirpiklį, 3) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant smėlį arba 4) dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga. Tinkamo metodo parinkimas priklauso nuo cheminės medžiagos charakteristikų ir bandymo tikslo. Apskritai rekomenduojama, kad bandomoji cheminė medžiaga būtų maišoma su dirvožemiu. Tačiau gali tekti taikyti įterpimo procedūras, kurios atitiktų praktinį cheminės medžiagos naudojimo būdą (pvz., purkšti skystąjį preparatą arba naudoti specialias pesticidų sudėtis, pvz., granules arba sėklų beicavimo priemones). Dirvožemis apdorojamas prieš įdedant kolembolas, išskyrus atvejus, kai bandomąja chemine medžiaga dengiamas dirvožemio paviršius – kolembolas jau turėtų būti dirvožemyje.

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

19. Ruošiamas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas dejonizuotame vandenyje, kurio kiekio pakaktų visiems vienos bandymo koncentracijos kartotiniams bandiniams paruošti. Prieš įdedant į bandymo indą, bandomosios cheminės medžiagos tirpalas gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio partija.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Jei cheminės medžiagos netirpsta vandenyje, bet tirpsta organiniuose tirpikliuose, bandomąją cheminę medžiagą galima ištirpinti mažiausiame įmanomame tinkamo tirpiklio (pvz., acetono) tūryje, visą laiką užtikrinant tinkamą cheminės medžiagos sumaišymą su dirvožemiu ir jo sumaišymą su reikiamu kvarcinio smėlio kiekiu. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Jei naudojamas organinis tirpiklis, reikėtų, kad visų bandymo koncentracijos verčių bandiniai ir papildomas tirpiklio neigiamas kontrolinis bandinys turėtų tą patį mažiausią tirpiklio kiekį. Maišymo indų nereikėtų tam tikrą laiką uždengti, kad su maišoma bandomąja chemine medžiaga patekęs tirpiklis galėtų išgaruoti, ir užtikrinti, kad per šį laiką neišsisklaidytų toksinė cheminė medžiaga.

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose mažai tirpi bandomoji cheminė medžiaga

21. Jei cheminės medžiagos mažai tirpsta vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, reikiamai bandymo koncentracijai gauti su bandomąja chemine medžiaga maišomas kvarcinis smėlis, kuris turėtų sudaryti dalį viso į dirvožemį dedamo smėlio. Kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys dedamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir gerai sumaišomas, įpylus dejonizuoto vandens kiekį, kuris turi užtikrinti reikiamą dirvožemio drėgmę. Galutinis mišinys padalijamas į bandymo indus. Procedūra kartojama su kiekviena bandymo koncentracija, taip pat ruošiamas atitinkamas kontrolinis bandinys.

Dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga

22. Jei bandomoji cheminė medžiaga yra pesticidas, galbūt ją reikėtų purkšti ant dirvožemio paviršiaus. Dirvožemis apdorojamas įdėjus kolembolas. Iš pradžių į bandymo indus dedamas sudrėkinto dirvožemio substratas, paskui įleidžiami gyvūnai ir bandymo indai pasveriami. Siekiant išvengti tiesioginio gyvūnų poveikimo bandomąja medžiaga dėl jų tiesioginio sąlyčio su bandomąja chemine medžiaga, ji purškama praėjus ne mažiau kaip pusvalandžiui po kolembolų įleidimo. Dirvožemio paviršių bandomąja chemine medžiaga reikėtų padengti kuo tolygiau, ją purškiant tinkamu laboratoriniu purkštuvu, kad būtų modeliuojamas laukų purškimas. Reikėtų purkšti temperatūrai kintant ne daugiau kaip $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir purškiamų vandeninių tirpalų, emulsijų arba dispersijų purškimo norma turėtų atitikti rizikos vertinimo rekomendacijas. Srautas turėtų būti tikrinamas taikant atitinkamą kalibravimo metodą. Specialios sudėties preparatus, pvz., granules arba sėklų beicavimo priemones galima būtų įterpti žemės ūkyje taikomu būdu. Maistas dedamas po purškimo.

PROCEDŪRA**Bandymo sąlygos**

23. Vidutinė bandymo temperatūra turėtų būti $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, o temperatūros intervalas – $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bandymas atliekamas reguliuojamų šviesos ir tamsos ciklų sąlygomis (pageidautina, 12 h šviesos ir 12 h tamsos), bandymo indų zonos apšvietai esant nuo 400 iki 800 liuksų.

24. Dirvožemio drėgmė tikrinama indus pasveriant bandymo pradžioje, per vidurį ir pabaigoje. Masės nuostoliai > 2 % kompensuojami įpilant dejonizuoto vandens. Reikėtų pabrėžti, kad vandens nuostolius būtų galima sumažinti užtikrinant didelę oro drėgmę (> 80 %) bandymo inkubatoriuje.
25. pH reikėtų matuoti intervalo nustatymo bandymo ir galutinio bandymo pradžioje ir pabaigoje. Reikėtų išmatuoti vieną papildomą kontrolinį bandinį ir po vieną papildomą apdoroto dirvožemio (visų koncentracijos verčių) bandinį, kurie būtų paruošti ir prižiūrimi kaip bandymo kultūrų bandiniai, bet be kolembolų.

Bandymo procedūra ir matavimai

26. Į bandymo indą dedamas kiekvienos bandymo koncentracijos dirvožemio kiekis, atitinkantis 30 g naujai paruošto dirvožemio masės. Taip pat ruošiami kontroliniai bandiniai su vandeniu be bandomosios cheminės medžiagos. Jei bandomajai cheminei medžiagai įterpti naudojamas nešiklis, be bandymo bandinių serijos turėtų būti viena kontrolinių bandinių tik su nešikliu serija. Tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų atitikti jų koncentraciją bandymo induose su bandomąja chemine medžiaga.
27. Atskiri gyvūnai atsargiai pernešami į kiekvieną bandymo indą (atsitiktinai paskirstyti tarp bandymo indų) ir dedami dirvožemio paviršiuje. Siekiant užtikrinti efektyvų pernešimą, galima naudoti mažo slėgio oro siurbimo įtaisą. Vienos bandymo koncentracijos kartotinių bandinių ir kontrolinių bandinių skaičius priklauso nuo taikomos bandymo schemos. Bandymo indai atsitiktinai išdėstomi bandymo inkubatoriuje ir kas savaitę jų padėtis atsitiktinai keičiama.
28. Vienam bandymo indui reikėtų naudoti dvidešimt suaugusių *F. fimetaria* gyvūnų, 10 patinų ir 10 patelių, kurių amžius 23–26 dienos. 21 dieną kolembolos ištraukiamos iš dirvožemio ir suskaičiuojamos. *F. fimetaria* lytis nustatoma pagal sinchronizuotos gyvūnų partijos gyvūnų dydį. Patelės yra gerokai didesnės nei patinai (žr. 3 priedėlį).
29. Vienam bandymo indui reikėtų naudoti dešimt *F. candida* jauniklių, kurių amžius 9–12 dienų. 28 dieną kolembolos ištraukiamos iš dirvožemio ir suskaičiuojamos.
30. Tinkamas maisto šaltinis yra kaip buitinis produktas parduodamos sausos granuliuotos kepimo mielės, kurių pakankamas kiekis, pvz., 2–10 mg, dedamas į kiekvieną indą bandymo pradžioje ir maždaug po dviejų savaičių.
31. Bandymo pabaigoje įvertinamas gaištamumas ir reprodukcija. Po 3 savaičių (*F. fimetaria*) arba po 4 savaičių (*F. candida*) kolembolos ištraukiamos iš bandymo dirvožemio (žr. 4 priedėlį) ir suskaičiuojamos (12). Kolembola užrašoma kaip negyva, jei jos nėra tarp ištrauktųjų gyvūnų. Kolembolų ištraukimo ir skaičiavimo metodų tinkamumas turėtų būti patvirtintas. Į tinkamumo kriterijų įtraukiamas didesnis kaip 95 % jauniklių ištraukimo efektyvumas, kurį galima patikrinti, pvz., įdedant žinomą jų skaičių į dirvožemį.
32. Bandymo procedūros praktinės eigos suvestinė ir laiko grafikas aprašyti 2 priedėlyje.

Bandymo planas

Intervalo nustatymo bandymas

33. Prireikus atliekamas intervalo nustatymo bandymas imant, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės ir po du kartotinius kiekvienos koncentracijos ir kontrolinius bandinius. Papildoma panašių cheminių medžiagų bandymo ar iš literatūros paimta informacija apie kolembolų gaištamumą ar reprodukciją taip pat gali būti naudinga priimant sprendimą dėl intervalui nustatyti atliekamo bandymo koncentracijos verčių intervalo.
34. Intervalo nustatymo bandymo naudojant *F. fimetaria* trukmė yra dvi savaitės, o *F. candida* – 3 savaitės, kad būtų užtikrinta, jog bus gauta viena jauniklių vada, gavimas. Bandymo pabaigoje įvertinamas kolembolų gaištamumas ir reprodukcija. Reikėtų užrašyti suaugusių gyvūnų ir jauniklių skaičių.

Galutinis bandymas

35. Jei reikia nustatyti EC_x (pvz., EC_{10} , EC_{50}), reikėtų atlikti bandymą imant dvyliką koncentracijos verčių. Rekomenduojama imti mažiausiai du kartotinius kiekvienos bandymo koncentracijos bandinius ir šešis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių faktorius kinta atsižvelgiant į dozės ir atsako priklausomybę.
36. Jei reikia nustatyti NOEC/LOEC, reikėtų naudoti bent penkias koncentracijos vertes, sudarančias geometrinę progresiją. Rekomenduojama imti keturis kartotinius kiekvienos bandymo koncentracijos bandinius ir aštuonis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių išdėstymo faktorius neturėtų būti didesnis kaip 1,8.
37. Taikant jungtinį metodą, galima nustatyti NOEC/LOEC ir EC_x . Jei taikomas šis jungtinis metodas, reikėtų naudoti aštuonias koncentracijos vertes, sudarančias geometrinę progresiją. Rekomenduojama imti keturis kartotinius kiekvienos apdorojimo dozės bandinius ir aštuonis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių išdėstymo faktorius neturėtų būti didesnis kaip 1,8.
38. Jei atliekant intervalo nustatymo bandymą nestebima jokio poveikio esant didžiausiai koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg), reprodukcijos bandymas gali būti atliekamas kaip ribinis bandymas, naudojant 1 000 mg/kg bandymo koncentracijos bandinius ir kontrolinį bandinį. Ribinis bandymas suteiks galimybę įrodyti, kad esant ribinei koncentracijai nėra statistiškai reikšmingo poveikio. Reikėtų naudoti aštuonis kartotinius apdoroto dirvožemio ir kontrolinius bandinius.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

39. Reprodukcijos našumas (pvz., viename bandymo inde gautų jauniklių skaičius) yra pagrindinė vertinamoji baigtis. Pagal statistinės analizės, pvz., ANOVA procedūras, bandomosios dozės lyginamos, taikant Student t kriterijų, Dunnett kriterijų ar Williams kriterijų. Atskiriems gautiems bandomųjų dozių vidurkiams apskaičiuojami 95 % pasiklovimo intervalai.
40. Kontroliniuose bandiniuose, kurie nebuvo veikiami bandomąja medžiaga, išgyvenusių suaugusių gyvūnų skaičius yra pagrindinis tinkamumo kriterijus ir jį reikėtų dokumentuoti. Kaip ir intervalo nustatymo bandymo atveju, visi kiti padarytos žalos požymiai taip pat turėtų būti pateikti ataskaitoje.

LCx ir ECx

41. EC_x vertės, įskaitant su jomis susijusias parametro apatinę ir viršutinę 95 % pasiklovimo ribas, skaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., logistinę ar Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Kärber metodą arba paprastą interpoliaciją). EC_x gaunama iš nustatytą lygtį ištatant vertę, atitinkančią kontrolinio bandinio vidurkio x %. Norint apskaičiuoti EC_{50} arba kitą EC_x , reikėtų atlikti viso duomenų rinkinio regresinę analizę. LC_{50} paprastai įvertinama atliekant probit regresinę analizę arba panašią analizę, kurią atliekant atsižvelgiama į binominio pasiskirstymo gausimumo duomenis.

NOEC/LOEC

42. Jei numatoma, kad NOEC/LOEC nustatyti bus taikoma statistinė analizė, būtina turėti vienam indui taikomą statistiką (atskiri indai laikomi kartotiniais bandiniais). Reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus pagal EBPO 54 dokumentą dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės šiuolaikinių metodų. Taikymo rekomendacijos (9). Apskritai, neigiamas cheminės medžiagos poveikis, palyginti su kontroliniu bandiniu, tiriamas taikant vienpusį hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$.
43. Normalusis pasiskirstymas ir sklaidos homogeniškumas gali būti tikrinami taikant tinkamą statistinį kriterijų, pvz., Shapiro-Wilk kriterijų ir Levene kriterijų ($p \leq 0,05$). Galima atlikti vienfaktorinę sklaidos analizę (ANOVA) ir vėliau taikyti daugybinio lyginimo kriterijų. Galima taikyti daugybinio lyginimo kriterijus (pvz., Dunnett kriterijų) arba tendencijos kriterijus mažėjimo tvarka (pvz., Williams kriterijų), kad būtų apskaičiuota, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairios koncentracijos chemine medžiaga paveiktų bandinių (rekomenduojamas kriterijus pasirenkamas pagal EBPO dokumentą 54 (9)). Kitais atvejais NOEC ir LOEC galima būtų nustatyti taikant neparametrinius metodus (pvz., Bonferroni U kriterijų pagal Holm ar Jonckheere-Terpstra tendencijos kriterijų).

Ribinis bandymas

44. Jei buvo atliekamas ribinis bandymas (lyginamas tik kontrolinis ir tik vienos bandomosios dozės bandinys) ir yra vykdomi parametrinių kriterijų procedūrų reikalavimai (normalumas, homogeniškumas), metrinis atsakus galima įvertinti taikant Student kriterijų (t kriterijų). Jei šie reikalavimai nevykdomi, galima taikyti nelygių sklaidų t kriterijų (Welch t kriterijų) arba neparametrinį kriterijų, pvz., Mann-Whitney U kriterijų.
45. Jei norima nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių bandinių (kontrolinių ir tirpiklio kontrolinių bandinių), kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima bandyti pagal aprašytąjį ribinį bandymą. Jei šiais bandymais reikšmingų skirtumų neaptinkama, visi kontroliniai ir tirpiklio kontroliniai bandiniai gali būti sujungti. Priešingu atveju visus bandomųjų dozių bandinius reikėtų lyginti su tirpiklio kontroliniais bandiniais.

Bandymo ataskaita

46. Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

- bandomosios cheminės medžiagos, partijos ir siuntos identifikavimo duomenys, CAS numeris, grynumas;
- bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., $\log K_{ow}$, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio konstanta (H) ir pageidautina informacija apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą dirvožemyje), jei yra;
- jei bandoma ne grynoji cheminė medžiaga, reikėtų nurodyti bandomosios cheminės medžiagos ir priedų sudėtį;

Bandymo organizmai

- rūšių ir bandymo organizmų tiekėjo identifikavimo duomenys, veisimo sąlygų aprašymas ir bandymo organizmų amžiaus intervalas;

Bandymo sąlygos

- bandymo plano ir procedūros aprašymas;
- bandymo dirvožemio paruošimo duomenys; natūralaus dirvožemio, išsami specifikacija, jei naudojamas (kilmė, laikinis kitimas, dalelių dydžio pasiskirstymas, pH, organinių medžiagų kiekis);
- dirvožemio vandens sulaikymo geba;
- bandomosios cheminės medžiagos įterpimo į dirvožemį būdo aprašymas;
- bandymo sąlygos: apšvieta, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra;
- maitinimo režimo aprašymas, bandymo metu naudojamo maisto tipas ir kiekis, maitinimo dienos;
- dirvožemio pH ir vandens kiekis bandymo pradžioje ir pabaigoje (kontrolinio ir kiekvienos bandomosios dozės bandinių);
- išsamus gyvūnų ištraukimo metodo aprašymas ir ištraukimo efektyvumas.

Bandymo rezultatai

- jauniklių skaičius bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde;
- suaugusių gyvūnų skaičius bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde ir jų gaištamumas (%);
- akivaizdžių fiziologinių ar patologinių simptomų arba aiškių elgesio pokyčių aprašymas;
- rezultatai, gauti naudojant etaloninę cheminę medžiagą;
- NOEC/LOEC vertės, gaištamumo LC_x , reprodukcijos EC_x (dažniausiai LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} ir EC_{10}) ir 95 % pasiklivimo intervalai. Pritaikyto modelio grafikas, naudotas atliekant skaičiavimus, jo funkcijos lygtis ir parametrai (žr. (9));

- visa informacija ir pastebėjimai, kurie būtų naudingi aiškinant rezultatus;
- taikyto kriterijaus galia, jei tikrinama hipotezė (9);
- nukrypimai nuo šiame bandymo metode aprašytų procedūrų ir visi neįprasti reiškiniai atsiradę bandymo metu;
- bandymo tinkamumas;
- jei vertinama NOEC, minimalus aptinkamas skirtumas.

NUORODOS

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve
- (3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- (8) Šio priedo C.36 skyrius, Plėšriųjų erkių (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reprodukcijos dirvožemyje bandymas.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.
- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. *Norsk Entomologisk Forening*.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

*1 priedėlis***Apibrėžtys**

Šiame bandymo metode taikomos šios apibrėžtys (šiame bandyme visos poveikio koncentracijos vertės yra išreikštos bandomosios cheminės medžiagos mase sausojo bandymo dirvožemio masei):

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas poveikis ($p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį.

EC_x (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

2 priedėlis

Kolembolų bandymo pagrindiniai veiksmai ir laiko grafikas

Bandymo etapus galima apibendrinti taip:

Laikas (diena)	Veiksmas
– 23 iki – 26	Ruošiama sinchronizuota <i>F. fimetaria</i> kultūra
– 14	Ruošiamas dirbtinis dirvožemis (maišomos sausosios sudedamosios dalys) Tikrinama ir atitinkamai koreguojama dirbtinio dirvožemio pH vertė Matuojama maksimali dirvožemio vandens sulaikymo geba (WHC)
– 9 iki – 12	Ruošiama sinchronizuota <i>F. candida</i> kultūra
– 2 iki – 7	Iš anksto drėkinamas dirvožemis
– 1	Jaunikliai suskirstomi į partijas Ruošiami pradiniai tirpalai ir įterpiama cheminė medžiaga, jei būtina naudoti tirpiklį
0	Ruošiami pradiniai tirpalai ir įterpiama cheminė medžiaga, jei naudojama kietoji, vandenyje tirpi cheminė medžiaga ar ją reikia purkšti ant paviršiaus. Matuojamas dirvožemio pH ir sveriami indai. Įdedamas maistas. Įleidžiamos kolembolos.
14	<i>F. fimetaria</i> intervalo nustatymo bandymo atveju: Bandymas baigiamas, gyvūnai ištraukiami, matuojama dirvožemio pH vertė ir vandens nuostoliai (sveriama) Galutinio bandymo atveju: Matuojamas drėgmės kiekis, papildoma vandens ir įdedama 2–10
21	Galutinio <i>F. candida</i> bandymo atveju: Bandymas baigiamas, gyvūnai ištraukiami, matuojama dirvožemio pH vertė ir vandens nuostoliai (sveriama) Range-finding <i>F. candida</i> : Terminate test, extract animals, measure soil pH and loss of water (weight)
28	Definitive <i>F. candida</i> test: Terminate test, extract animals, measure soil pH and loss of water (weight)

3 priedėlis

Rekomendacijos dėl *F. fimetaria* ir *F. candida* veisimo ir sinchronizavimo

Šiame vadove pateiktas datas ir trukmės vertės reikia atskirai patikrinti kiekvienos konkrečios kolembolų veislės atveju, siekiant užtikrinti, kad tinkamu laiku būtų gauti pakankamai sinchronizuoti jaunikliai. Tinkamą kiaušinėlių ir sinchronizuotai išsiritusių jauniklių surinkimo dieną iš esmės lemia kiaušinėlių dėjimo po suaugusių gyvūnų perkėlimo ant naujo substrato ir išsiritimo iš kiaušinėlių dienos.

Rekomenduojama turėti nuolatinę pradinę kultūrą, kurią sudarytų, pvz., 50 indų ar Petri lėkštelių. Pradinei kultūrai turėtų būti užtikrintos geros maitinimo sąlygos, kas savaitę tiekiant maistą, vandenį ir šalinant seną maistą bei negyvų gyvūnų kūnus. Jei ant substrato yra per mažai kolembolų, gali vykti inhibavimas dėl didesnio grybelių augimo. Jei kiaušinėliams gaminti pradinė kultūra naudojama per dažnai, ji gali pavargti. Nuovargio požymiai yra negyvi suaugę gyvūnai ir pelėsiai ant substrato. Kiaušinėlius, kurie liktų nuo sinchronizuotų gyvūnų gavimo, galima panaudoti kultūrai atjauninti.

Sinchronizuotai gautos *F. fimetaria* kultūros patinai ir patelės visų pirma skiriasi pagal dydį. Patinai yra aiškiai mažesni nei patelės, bet juda greičiau nei jos. Reikia nedaug patirties, kad būtų galima tiksliai atpažinti lytį, kurią galima patvirtinti atliekant lytinės zonos apžiūrą po mikroskopu (13).

1. Auginimas**1.a. Kultūros auginimo substrato paruošimas**

Kultūros auginimo substratas yra gipsas (kalcio sulfatas) ir aktyvintosios anglys. Taip gaunamas drėgnas substratas, kurio aktyvintųjų anglių funkcija – sugerti dujines atliekas ir išskyras (14) (15). Kad kolembolas būtų lengviau stebėti, galima naudoti įvairių formų medžio anglys. Pvz., medžio anglių milteliai naudojami *F. candida* ir *F. fimetaria* (gaunamas juodai pilkas gipsas):

Substrato sudedamosios dalys:

- 20 ml aktyvintųjų anglių
- 200 ml distiliuoto vandens
- 200 ml gipso

arba

- 50 g aktyvintųjų anglių miltelių
- 260–300 ml distiliuoto vandens
- 400 g gipso.

Prieš naudojant substrato mišinys paliekamas sutirštėti.

1.b. Veisimas

Kolembolos laikomos induose, pvz., Petri lėkštelėse (90 mm × 13 mm), kurių dugnas padengtas 0,5 cm gipso ir medžio anglių substrato sluoksniu. Jos auginamos 20 ± 1 °C temperatūroje, taikant 12 h ir 12 h dienos ir tamsos ciklą (400–800 liuksų). Indai laikomi drėgni visą laiką, jų viduje užtikrinant 100 % santykinę oro drėgmę. Ją gali užtikrinti laisvasis vanduo akytame gipse, bet reikėtų vengti vandens plėvelės susidarymo gipso paviršiuje. Vandens nuostolių galima išvengti užtikrinant drėgną aplinkos orą. Visus negyvus gyvūnus ir supelijusį maistą reikėtų iš indų pašalinti. Jei norima paskatinti kiaušinėlių dėjimą, suaugusius gyvūnus reikia perkelti į Petri lėkšteles su nauju gipso ir medžio anglių substratu.

1.c. Maisto šaltinis

Kaip vienintelis *F. candida* and *F. fimetaria* maistas naudojamos išdžiovintos kepimo mielių granulės. Šviežias maistas duodamas kartą ar du per savaitę, kad būtų išvengta pelijimo. Maistas mažą krūvelę dedamas tiesiai ant gipso. Dedamų mielių masę reikėtų derinti su kolembolų populiacijos dydžiu, bet paprastai pakanka 2–15 mg.

2. Sinchronizavimas

Bandymą reikėtų atlikti su sinchronizuotais gyvūnais, kad būtų gauti vienalyčiai tos pačios stadijos ir dydžio bandymo gyvūnai. Be to, sinchronizavimas sudaro sąlygas atskirti *F. fimetaria* patinus ir pateles nuo 3 savaitės ir vėliau pagal lytinį dimorfizmą, t. y. dydžio skirtumą. Toliau pateikta procedūra yra siūlymas, kaip gauti sinchronizuotų gyvūnų (praktiniai etapai neprivalomi).

2.a. Sinchronizavimas.

- Ruošiami indai su 0,5 cm storio gipso ir medžio anglių sluoksniu.
- Į kiaušinėliams dėti paruoštus indus pernešama 150–200 suaugusių *F. fimetaria* ir 50–100 *F. candida* iš geriausių 15–20 pradinės kultūros indų su 4–8 savaitių senumo substratu ir įdedama 15 mg kepimo mielių. Reikia vengti pernešti jauniklius kartu su suaugusiais gyvūnais, nes jauniklių buvimas gali trukdyti kiaušinėlių gamybai.
- Kultūra laikoma 20 ± 1 °C temperatūroje (vidurkis turėtų būti 20 °C) ir esant 12–12 h šviesos ir tamsos ciklui (400–800 liuksų). Būtina užtikrinti šviežią maistą ir drėgmę prisotintą orą. Dėl maisto trūkumo gyvūnai gali tuštinti ant kiaušinėlių, ant kurių pradėtų augti grybelis arba *F. candida* gali pradėti būti savo pačių kiaušinėlius. Po 10 dienų kiaušinėliai atsargiai surenkami adata bei mentele ir pernešami ant „kiaušinėlių popieriaus“ (filtravimo popieriaus gabaliukai, įmerkti į gipso ir medžio anglių tyrę), kuris dedamas į indą su nauju gipso ir medžio anglių substratu. Ant substrato dedami keli grūdėliai mielių jaunikliams išvilioti, kad jie paliktų kiaušinėlių popierių. Svarbu, kad kiaušinėlių popierius ir substratas būtų drėgni, kitaip kiaušinėliai netektų vandens. Kitas būdas – suaugusius gyvūnus, jiems padėjus kiaušinėlius, 2 arba 3 dienoms galima pašalinti iš sinchronizuotos kultūros dėžučių.
- Po trijų dienų dauguma jauniklių išsisirio ant kiaušinėlių popieriaus, o kai kuriuos jauniklius galima rasti po kiaušinėlių popieriumi.
- Siekiant gauti vienodo amžiaus jauniklius, kiaušinėlių popierius su neprasikalusiais kiaušinėliais pincetu pašalinamas iš Petri lėkštelės. Jaunikliai, kurių amžius 0–3 dienos, paliekami lėkštelėje ir maitinami kepimo mielėmis. Neprasikalę kiaušinėliai išmetami.
- Kiaušinėliai ir išsiritę jaunikliai auginami taip pat, kaip suaugę gyvūnai. Konkrečiai *F. fimetaria* reikėtų taikyti šias priemones: užtikrinti pakankamai šviežią maistą, pašalinti seną supelijusį maistą, po 1 savaitės paskirstyti jauniklius į naujas Petri lėkštes, jei jų tankis didesnis kaip 200.

2.b. Kolembolų apdorojimas bandymo pradžioje

- 9–12 dienų amžiaus *F. candida* arba 23–26 dienų amžiaus *F. Fimetaria* surenkamos, pvz., siurbiant, įleidžiamos į mažą indą su drėgnu gipso ir medžio anglių substratu ir po dviejų okuliarų mikroskopu tikrinama jų fizinė būklė (sužeisti ir pažeisti gyvūnai pašalinami). Visus etapus reikėtų atlikti kolembolas laikant drėgnoje atmosferoje, kad jos išvengtų džiūvimo streso, pvz., naudojant suvilgytus paviršius ir kt.
- Indas apverčiamas dugnu į viršų ir pastuksenamas, kad kolembolos patektų į dirvožemį. Reikėtų neutralizuoti statinę elektrą, kitaip gyvūnai gali pakilti į orą arba prilipti prie indo sienelių ir išdžiūti. Krūvį galima neutralizuoti naudojant jonizatorių arba po indu padedant šlapią skudurą.
- Maistas turėtų būti paskleistas po visą dirvožemio paviršių, o ne padėtas kaip vienas gabalas.

- Transportavimo ir bandymo laikotarpiu reikėtų vengti trankyti arba kitaip fiziškai trikdyti bandymo indus, nes taip gali būti tankinamas dirvožemis ir trukdoma kolembolų sąveika.

3. Alternatyvios kolembolų rūšys

Bandymams pagal šį bandymo metodą galima pasirinkti kitas kolembolų rūšis, pvz., *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Prieš naudojant alternatyvias rūšis turi būti tenkinamos šios sąlygos:

- jas vienareikšmiškai identifikuoti;
 - pagrįsti rūšies pasirinkimą;
 - užtikrinti, kad į bandymo etapą būtų įtraukta dauginimosi biologija, nes dauginimasis būtų potencialus tikslinis ekspozicijos parametras;
 - žinoti duomenis apie jų gyvenimą: lytinės brandos amžių, išsiritimo iš kiaušinių trukmę ir vystymosi stadijas, per kurias gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga;
 - užtikrinti optimalias augimo ir reprodukcijos sąlygas naudojant bandymo substratą ir tiekiamą maistą;
 - kintamumas turėtų būti pakankamai mažas, kad būtų galima preciziškai ir tiksliai įvertinti toksiškumą.
-

4 priedėlis

Gyvūnų ištraukimas ir skaičiavimas**1. Gyvūnus galima ištraukti dviem būdais.**

- 1.a. Pirmasis būdas: galima naudoti reguliuojamo temperatūros gradiento ištraukimo įrenginį, kurio veikimas pagrįstas MacFadyen principais (1). Šiluma tiekama iš kaitinimo elemento, įrengto ištraukimo dėžutės viršuje (reguliuojama termistoriumi, padėtu dirvožemio bandinio paviršiuje). Rinktuvo indą supančio aušinamojo skysčio temperatūra reguliuojama termistoriumi, įrengtu rinktuvo dėžutės paviršiuje (padėtu žemiau dirvožemio kerno). Termistoriai sujungti su programuojamu valdikliu, kuris didina temperatūrą pagal iš anksto suprogramuotą grafiką. Gyvūnai surenkami į vėsinaimą rinktuvo dėžutę (2 °C), kurios dugnas padengtas gipso ir medžio anglių sluoksniu. Ištraukti gyvūnus pradedama 25 °C temperatūroje, kuri automatiškai didinama kas 12 h 5 °C, ir visa ištraukimo trukmė – 48 h. Po 12 h 40 °C temperatūroje ištraukimas baigtas.
- 1.b. Antrasis būdas: pasibaigus bandymo inkubavimo laikotarpiui, esančių kolembolų jauniklių skaičius įvertinamas flotacijos būdu. Tuo tikslu bandymas atliekamas maždaug 250 ml tūrio induose. Bandymo pabaigoje įpilama 200 ml distiliuoto vandens. Dirvožemis švelniai maišomas mažu teptuku, kad kolembolos galėtų plūduriuoti vandens paviršiuje. Į vandenį galima įpilti truputį, maždaug 0,5 ml juodojo Kentmere fotografinio dažiklio, kad būtų lengviau skaičiuoti, nes jis padidina kontrastą tarp vandens ir baltų kolembolų. Dažiklis nėra toksiškas kolemboloms.

2. Skaičiavimas:

Skaičiuoti galima plika akimi arba po optiniu mikroskopu, naudojant ant flotacijos indo padėtą tinklėlį arba fotografuojant kiekvieno indo paviršių ir vėliau skaičiuojant kolembolas didelėse nuotraukose arba skaidrėse. Taip pat galima skaičiuoti naudojant skaitmeninius vaizdo apdorojimo metodus (12). Reikėtų patvirtinti visų metodų tinkamumą.

5 priedėlis

Dirvožemio maksimalios vandens sulaikymo gebos (WHC) nustatymas

Buvo prieita prie išvados, kad toliau nurodytas maksimalios dirvožemio vandens sulaikymo gebos (WHC) nustatymo metodas yra tinkamas. Jis aprašytas ISO DIS 11268-2 C priede (Dirvožemio kokybė. Teršalų poveikis sliekams (*Eisenia fetida*). 2 dalis. Poveikio dauginimuisi nustatymas).

Tinkamu ėmikliu (vamzdiniu sraigtiniu grąžtu ir kt.) paimamas tam tikras kiekis (pvz., 5 g) dirvožemio substrato. Vamzdžio apačia užkemšama šlapiu filtravimo popieriaus gabalu, vamzdis įtaisomas ant stovo ir statomas į vandens vonią. Vamzdis laipsniškai leidžiamas žemyn tol, kol vandens lygis yra aukščiau dirvožemio viršaus. Tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug trims valandoms. Kadangi galima sulaikyti ne visą dirvožemio kapiliarais absorbuotą vandenį, dirvožemio bandinys maždaug dviem valandoms turėtų būti paliktas vandeniui nutekėti, vamzdį pastačius ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio sluoksnio, esančio uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada bandinys pasveriamas ir išdžiovinamas iki pastoviosios masės 105 °C temperatūroje. Vandens sulaikymo geba (WHC) turėtų būti apskaičiuota taip:

$$\text{WHC (\% sausos medžiagos masės)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

čia:

S – vandens prisotinto substrato masė + vamzdžio masė + filtravimo popieriaus masė;

T – taros masė (vamzdžio masė + filtravimo popieriaus masė);

D – sauso substrato masė.

6 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas pagrįstas aprašymu, pateiktu ISO DIS 10390. Dirvožemio kokybė. pH nustatymas.

Nustatytas dirvožemio kiekis džiovinamas kambario temperatūroje ne trumpiau kaip 12 h. Ruošiama vieno tūrio dirvožemio suspensija (iš ne mažiau kaip 5 g dirvožemio) penkiuose tūriuose 1 mol/l analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 mol/l analiziškai gryno kalcio chlorido (CaCl_2). Suspensija stipriai purtoma 5 min ir paliekama nusistovėti ne trumpiau kaip 2 h, bet ne ilgiau kaip 24 h. Vandeninės fazės pH vertė matuojama pH metru, kalibruojamu prieš kiekvieną matavimą pagal tinkamą buferinių tirpalų seriją (pvz., pH 4,0 ir 7,0).

C.40. CHIRONOMIDŲ GYVAVIMO CIKLO TRUKMĖS TOKSIŠKUMO BANDYMAS NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE, NAUDOJANT SODRINTĄ VANDENĮ ARBA SODRINTAS NUOSĖDAS**IVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 233 (2010). Jis sukurtas siekiant įvertinti cheminės medžiagos poveikį gėlavandeniui dvisparniui *Chironomus* sp. bandomąja medžiaga jį veikiant visą jo gyvenimo trukmę (visiškai apimama 1-oji karta (P karta) ir ankstyvoji 2-osios kartos (F1 kartos) dalis). Šis metodas yra esamų bandymo metodų C.28 (1) arba C.27 (15), pagal kuriuos bandomąja chemine medžiaga veikiamas sodrintame vandenyje arba sodrintose nuosėdose, tąsa. Jame atsižvelgiama į esamus *Chironomus riparius* ir *Chironomus dilutus* (anksčiau vadinto *C. tentans* (2)) toksiškumo bandymo protokolus, kurie buvo parengti Europoje ir Šiaurės Amerikoje (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), o vėliau buvo atliktas jų tarplaboratorinis bandymas (1) (7) (10) (11) (12). Taip pat galima naudoti kitas tinkamai dokumentuotas chironomidų rūšis, pvz., *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Visa *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* veikimo bandomąja medžiaga trukmė yra maždaug 44 dienos, o *C. dilutus* – maždaug 100 dienų.
2. Šiame bandymo metode aprašyti veikimo bandomąja medžiaga vandenyje ir nuosėdose scenarijai. Tinkamo scenarijaus pasirinkimas priklauso nuo numatomo bandymo taikymo. Veikimo vandenyje scenarijus, sodrinant vandens sluoksnį, skirtas purškiamų pesticidų sklidimui modeliuoti, ir jis aprėpia pradinę pikinę koncentraciją paviršiniuose vandenyse. Be to, vandens sodrinimo scenarijus taip pat tinka, jei cheminė medžiaga patenka kitais būdais (įskaitant cheminių medžiagų išsiliejimą), bet ne kaupimosi nuosėdose procesams, kurių trukmė yra didesnė nei bandymo laikotarpis. Šiuo atveju ir tada, kai pagrindinis pesticidų patekimo į vandens telkinius būdas yra jų nuotėkis, gali būti, kad labiau tiktų sodrintų nuosėdų schema. Jei numatomi kiti cheminės medžiagos patekimo būdai, bandymo schemą galima nesunkiai pritaikyti. Pavyzdžiui, jei nėra tiriamas bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandeninės fazės ir nuosėdų sluoksnio, bet turi būti kuo labiau sumažinta adsorbcija ant nuosėdų, galima pagalvoti apie nuosėdų pakeitimą dirbtinėmis nuosėdomis (pvz., kvarciniu smėliu).
3. Cheminės medžiagos, dėl kurių reikia bandyti nuosėdose gyvenančius organizmus, gali nuosėdose išsilaikyti ilgai. Nuosėdose gyvenančius organizmus galima veikti keliais būdais. Kiekvieno veikimo būdo santykinė svarba ir jo indėlis į visuminį toksinį poveikį gavimo trukmė priklauso nuo cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių. Jei cheminės medžiagos stipriai adsorbuojamos arba su nuosėdomis jungiasi kovalentinėmis jungtimis, tinkamas veikimo būdas galėtų būti užteršto maisto suvalgymas. Siekiant, kad ypač lipofilinių cheminių medžiagų toksiškumas būtų pakankamai įvertintas, galima būtų pagalvoti apie tai, ar maistą į nuosėdas nereikėtų dėti prieš bandomosios cheminės medžiagos įdėjimą (žr. 31 pastraipą). Taigi įmanoma įtraukti visus veikimo būdus ir visus gyvenimo tarpsnius.
4. Matuojamos vertinamosios baigtys yra suminis suaugusių gyvūnų skaičius (1-osios ir 2-osios kartos), vystymosi sparta (1-osios ir 2-osios kartos), visiškai išsiritusių ir gyvų suaugusių gyvūnų lyčių santykis (1-osios ir 2-osios kartos), vienos patelės kiaušinėlių krūvelių skaičius (tik 1-osios kartos) ir kiaušinėlių krūvelių visumas (tik 1-osios kartos).
5. Rekomenduojama naudoti dirbtines nuosėdas. Dirbtinės nuosėdos keliais aspektais tinkamesnės nei natūralios nuosėdos:
 - bandymo kintamumas sumažėja, nes nuosėdos sudaro atkuriamą „standartizuotą matricą“ ir nereikia ieškoti švarių nuosėdų šaltinio;
 - bandymus galima pradėti bet kuriuo metu, nesant bandymo nuosėdų sezoninio kintamumo ir būtinumo jas iš anksto apdoroti, kad būtų pašalinta tenykštė fauna;
 - įprastiniams bandymams reikiamas dirbtinių nuosėdų kiekis kainuoja mažiau nei lauko sąlygomis paimtų nuosėdų;
 - naudojant dirbtines nuosėdas, galima palyginti įvairių cheminių medžiagų toksiškumo tyrimų rezultatus ir jas atitinkamai klasifikuoti (3).
6. Taikomos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Pirmosios stadijos chironomidų lervos veikiamos kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga nuosėdų ir vandens sistemoje. Bandymas prasideda nuo pirmosios stadijos lervų (1-osios kartos) įdėjimo į bandymo stiklines su sodrintomis nuosėdomis arba su vandeniu, sodrinamu chemine medžiaga po lervų įdėjimo. Įvertinamas chironomidų atsiradimas, atsiradimo trukmė bei visiškai išsinėrusių ir gyvų mašalų lyčių santykis. Išsinėrę suaugę mašalai pernešami į veisimo narvelius, kad jiems būtų lengviau spiestis, poruotis ir dėti kiaušinėlius. Įvertinamas gautų kiaušinėlių krūvelių skaičius ir jų vislumas. Iš šių kiaušinėlių krūvelių gaunamos 2-osios kartos pirmosios stadijos lervos. Šios lervos dedamos į naujai paruoštas bandymo stiklines (sodrinimo procedūra atitinka 1-osios kartos procedūrą), kad būtų įvertintas 2-osios kartos gyvybingumas, įvertinant atsiradimą, atsiradimo trukmę bei visiškai išsinėrusių ir gyvų mašalų lyčių santykį (gyvavimo ciklo bandymo scheminis vaizdas pateiktas 5 priedėlyje). Visi duomenys analizuojami taikant regresijos modelį, kad būtų įvertinta koncentracija, sukelianti X % atitinkamos vertinamosios baigties sumažėjimą, arba tikrinant hipotezę, kad būtų nustatyta nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC). Jai nustatyti atsakai, gauti veikiant bandomąja medžiaga, lyginami su atitinkamų kontrolinių bandinių atsakais, taikant statistinius kriterijus. Reikėtų pastebėti, kad taikant sodrinto vandens scenarijų, greitai skaidomoms cheminėms medžiagoms, kiekvienos kartos vėlesnių stadijų (pvz., lėliukės tarpsnio) lervas galbūt veiktų gerokai mažesnė vandens virš nuosėdų koncentracija palyginti su 1-osios stadijos lervomis. Jei tai yra problema, o kiekvienai gyvenimo stadijai būtina palyginamoji bandomosios medžiagos koncentracija, galima būtų apsvarstyti šiuos bandymo metodo pakeitimus:

- lygiagrečiai bandymai sodrinant atskiromis gyvenimo stadijomis, arba
- kartotinis bandymo sistemos sodrinimas (arba vandens virš nuosėdų atnaujinimas) abiem bandymo tarpsniais (1-osios ir 2-osios kartos), kai sodrinimo (atnaujinimo) intervalus reikėtų suderinti su bandomosios cheminės medžiagos kitimo charakteristikomis.

Tokie pakeitimai įmanomi tik taikant sodrinto vandens scenarijų, bet ne sodrintų nuosėdų scenarijų.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje, jos garų slėgis, $\log K_{ow}$, išmatuotas arba apskaičiuotas pasiskirstymo nuosėdose koeficientas ir stabilumas vandenyje. Reikėtų turėti patikimą, žinomo ir patvirtinto tikslumo bei aptikimo ribos analizės metodą bandomosios cheminės medžiagos kiekiui nustatyti vandenyje virš nuosėdų, porose esančiame vandenyje ir nuosėdose. Naudingą informaciją sudaro bandomosios cheminės medžiagos struktūrinė formulė ir grynumas. Taip pat naudinga informacija apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą (pvz., išsisklaidymą, abiotinį bei biotinį skaidumą ir kt.). Kitos cheminių medžiagų, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų tyrimą, bandymo rekomendacijos pateiktos (16).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Etalonines chemines medžiagas galima bandyti periodiškai, siekiant įsitikinti, ar nepakito laboratorijos populiacijos jautrumas. Kaip ir dafnijų atveju, pakaktų atlikti 48 h trukmės ūmaus toksiškumo bandymą (pagal 17 nuorodą). Tačiau, kol nėra patvirtintos ūmaus toksiškumo rekomendacijos, galima svarstyti lėtinio toksiškumo bandymą pagal šio priedo C.28 skyrių. Etaloninių toksinių cheminių medžiagų, sėkmingai naudotų atliekant tarplaboratorinius ir tinkamumo patvirtinimo tyrimus, pavyzdžiai: lindanas, trifluralinas, pentachlorfenolis, kadmio chloridas ir kalio chloridas. (1) (3) (6) (7) (18).

BANDYMO TINKAMUMAS

10. Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

- bandymo pabaigoje kontrolinio bandinio abiejų kartų lervų išsinėrimas turėtų būti ne mažesnis kaip 70 % (1) (7);
- 85 % visų kontrolinio bandinio abiejų kartų *C. riparius* and *C. yoshimatsui* suaugusių mašalų turėtų išsinėti 12–23 dieną po 1-osios stadijos lervų įleidimo į indus; *C. tentans* priimtinas 20–65 dienų laikotarpis;

- kontrolinio bandinio visiškai išsinerusių ir gyvų abiejų kartų mašalų vidutinis lyčių santykis (kaip patelių arba patinų dalis) turėtų būti ne mažesnis kaip 0,4 ir ne didesnis kaip 0,6;
- į veisimo narvelį įdėti vienai 1-osios kartos patelei tenkantis kiaušinėlių krūvelių skaičius kiekviename veisimo narvelyje turėtų būti ne mažesnis kaip 0,6;
- kontrolinio bandinio 1-osios kartos visų kiaušinėlių krūvelių kiekviename veisimo narvelyje dalis turėtų būti ne mažesnė kaip 0,6;
- abiejų kartų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaigoje kiekviename inde turėtų būti išmatuota pH vertė ir ištirpusio deguonies koncentracija. Deguonies koncentracija visuose induose turėtų būti ne mažesnė kaip 60 % soties ore vertės (ASV ⁽¹⁾), o vandens virš nuosėdų pH – nuo 6 iki 9;
- vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip $\pm 1,0$ °C.

METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir veisimo narveliai

11. Lervos bandomąja medžiaga veikiamos maždaug 8,5 cm skersmens 600 ml stiklinėse (žr. 5 priedėlį). Tinka kiti indai, tačiau juose turėtų būti užtikrintas reikiamas vandens virš nuosėdų ir nuosėdų sluoksnio storis. Nuosėdų paviršiaus plotas turėtų būti toks, kad vienai lervai tektų nuo 2 iki 3 cm². Nuosėdų sluoksnio ir vandens virš nuosėdų gylio santykis turėtų būti maždaug 1:4. Reikėtų naudoti veisimo narvelius (visi trys matmenys ne mažesni kaip 30 cm), kurių viršus ir mažiausiai vienas šonas turėtų būti metalinis tinklėlis (akučių dydis maždaug 1 mm) (žr. 5 priedėlį). Į kiekvieną narvelį dedamas 2 l kristalizatorius su bandymo vandeniu ir nuosėdomis, skirtas kiaušinėliams dėti. Kristalizatoriaus nuosėdų sluoksnio ir vandens virš nuosėdų gylio santykis taip pat turėtų būti maždaug 1:4. Kiaušinėlių krūveles surinkus iš kristalizatoriaus, jos dedamos į 12 duobučių mikrotitravimo plokštelę (po vieną krūvelę į duobutę, kurioje yra ne mažiau kaip 2,5 ml sodrinto kristalizatoriaus vandens), plokštelės uždengiamos dangčiu, kad būtų išvengta reikšmingo garavimo. Taip pat galima naudoti kitus indus, kurie tikėtų kiaušinėlių krūvelėms laikyti. Išskyrus mikrotitravimo plokšteles, visi bandymo indai ir kita aparatūra, kuri galėtų liestis su bandymo sistema, turėtų būti pagaminta vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos (pvz., politetrafluoretileno).

Rūšių pasirinkimas

12. Atliekant bandymą pageidautina naudoti *Chironomus riparius*. Taip pat galima naudoti *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* irgi tinka, bet šią rūšį sunkiau prižiūrėti ir bandymo trukmė turi būti ilgesnė. *C. riparius* kultūrų auginimo metodai pateikti 2 priedėlyje. Taip pat yra informacijos apie *C. dilutus* (5) and *C. yoshimatsui* (14) kultūrų auginimo sąlygas. Rūšies tapatybę reikėtų patvirtinti prieš bandymą, tačiau tai daryti nebūtina prieš kiekvieną bandymą, jei organizmas paimtas iš vietoje išaugintos kultūros.

Nuosėdos

13. Pageidautina naudoti dirbtines nuosėdas (kitais vadinamas atkurtąsias ar sintetines nuosėdas). Tačiau naudojant natūralias nuosėdas reikėtų nurodyti jų charakteristikas (bent pH, organinės anglies kiekį, taip pat rekomenduojama nustatyti kitus parametrus, pvz., C/N santykį ir granulimetrinę sudėtį) ir jose neturėtų būti jokių teršalų ir kitų organizmų, kurie galėtų konkuruoti su chironomidų lervomis arba jas vartoti. Taip pat rekomenduojama nuosėdas prieš bandymą kondicionuoti bandymo sąlygomis septynias dienas. Rekomenduojama tokia dirbtinių nuosėdų sudėtis (1) (20) (21), kaip aprašyta (1):
 - a. 4–5 % (sausos medžiagos masės) durpių: pH turėtų būti kuo artimesnis vertės intervalui nuo 5,5 iki 6,0; svarbu, kad durpės būtų smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 1 mm) ir išdžiovintos tik ore;
 - b. 20 % (sausos medžiagos masės) kaolino molio (pageidautina, kad kaolinito kiekis būtų didesnis kaip 30 %);

⁽¹⁾ Gėlojo vandens soties ore vertė (ASV) 20 °C temperatūros ir standartinio atmosferos slėgio sąlygomis lygi 9,1 mg/l (60 % sudaro 5,46 mg/l).

- c. 75–76 % (sausos medžiagos masės) kvarcinio smėlio (smulkusis smėlis, kurio dalelės yra 50–200 μm turėtų sudaryti daugiau kaip 50 procentų kiekio);
 - d. įpilama dejonizuoto vandens, kad galutinio mišinio vandens kiekis būtų nuo 30–50 %;
 - e. įdedama chemiškai gryno kalcio karbonato (CaCO_3), kad būtų galima nustatyti galutinio nuosėdų mišinio pH vertę $7,0 \pm 0,5$;
 - f. galutinio nuosėdų mišinio organinės anglies kiekis turėtų būti 2 % ($\pm 0,5$ %) ir jį reikia reguliuoti dedant reikiamą durpių ir smėlio kiekį, kaip nurodyta nuo (a) iki (c).
14. Turėtų būti žinomas durpių, kaolino molio ir smėlio šaltinis. Nuosėdų komponentus reikėtų patikrinti, ar juose nėra cheminės taršos (pvz., sunkiųjų metalų, chloro organinių junginių, fosforo organinių junginių). Dirbtinių nuosėdų paruošimo pavyzdys aprašytas 3 priedėlyje. Taip pat galima ruošti sausų sudedamųjų dalių mišinį, jei įrodoma, kad užpylus ant jų vandens neatsiskiria nuosėdų sudedamosios dalys (pvz., neplūduriuoja durpių dalelės) ir kad durpės ar nuosėdos yra pakankamai kondicionuotos.

Vanduo

15. Kaip bandymo vanduo tinka bet koks vanduo, kuris atitinka 2 ir 4 priedėliuose išvardytas priimtino skiedimo vandens chemines savybes. Kultūroms auginti ir bandymui atlikti tinka bet koks natūralus vanduo (paviršinis ar gruntinis), atkurtasis vanduo (žr. 2 priedėlį) ar vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, jei chironomidai jame be streso požymių išgyventų visą kultūros auginimo ir bandymo laikotarpį. Bandymo pradžioje vandens pH vertė turėtų būti nuo 6 iki 9, o suminis kietumas, išreikštas CaCO_3 , ne didesnis kaip 400 mg/l. Tačiau, jei įtariama, kad yra sąveika tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį (todėl šiuo atveju nereikėtų naudoti Elendt M4 terpės). Visą tyrimo laikotarpį reikėtų naudoti to paties tipo vandenį. 4 priedėlyje išvardytas vandens kokybės charakteristikas reikėtų matuoti ne rečiau kaip du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad jos gerokai pakito.

Pradiniai tirpalai. Sodrintas vanduo

16. a. Bandymo koncentracijos vertės skaičiuojamos pagal vandens sluoksnio, t. y. vandens virš nuosėdų koncentracijos vertes. Pasirinktų koncentracijos verčių bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pageidautina, kad pradiniai tirpalai būtų ruošiami bandomąją cheminę medžiagą ištirpinant bandymo vandenyje. Kartais gali tekti naudoti tirpiklius arba dispergentus, kad būtų galima gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą. Tinkamas tirpiklis, pavyzdžiui, gali būti acetonas, metoksietanolis, etilenglikolio dimetileris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Kaip dispergentą galima naudoti Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Soliubilizavimo priemonės koncentracija galutinėje bandymo terpėje turėtų būti kiek įmanoma mažesnė t. y. $\leq 0,1$ ml/l) ir ir ji turėtų būti vienoda visuose veikimo induose. Naudojama soliubilizavimo priemonė neturėtų daryti reikšmingo poveikio išgyvenamumui, kurį rodytų tirpiklio kontroliniai bandiniai, palyginti su neigiamu (vandens) kontroliniu bandiniu. Tačiau reikėtų dėti visas pastangas, kad būtų išvengta tokių medžiagų naudojimo.

Pradiniai tirpalai. Sodrintos nuosėdos

16. b. Pasirinktos koncentracijos sodrintos nuosėdos paprastai ruošiamos tiesiogiai į nuosėdas įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo. Dejonizuotame vandenyje ištirpintas bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas maišomas su dirbtinėmis nuosėdomis valciniu malūnu, pašarų maišikliu arba rankiniu būdu. Jei bandomoji cheminė medžiaga blogai tirpsta vandenyje, ją galima ištirpinti kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., heksano, acetono arba chloroformo) kiekyje. Šis tirpalas maišomas su 10 g smulkaus kvarcinio smėlio vienam bandymo indui. Palaukiama tol, kol tirpiklis išgaruoja ir visiškai pašalinamas iš smėlio; tada smėlis sumaišomas su reikiamu nuosėdų kiekiu. Bandomajai cheminei medžiagai soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik labai lakias medžiagas. Reikėtų turėti omenyje, kad

į smėlio kiekį, gautą su bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišiniu, turi būti atsižvelgta ruošiant nuosėdas (t. y. jas reikėtų ruošti imant mažiau smėlio). Reikėtų imtis priemonių užtikrinant, kad į nuosėdas įterpta bandomoji cheminė medžiaga būtų visiškai ir tolygiai paskirstyta nuosėdose. Prireikus galima analizuoti mažesnius bandinius vienalytiškumo laipsniui nustatyti.

BANDYMO SCHEMA

17. Pagal bandymo schemą parenkamas bandymo koncentracijos verčių skaičius, tarpai tarp jų, kiekvienos koncentracijos indų skaičius, lervų skaičius inde, kristalizatorių ir veisimo narvelių skaičius. EC_x, NOEC ir ribinio bandymo schemos aprašytos toliau.

Regresinės analizės schema

18. Bandymas turėtų apimti poveikio koncentraciją (EC₅₀) ir dominantę koncentracijos verčių intervalą, kuriame pasireiškia bandomosios cheminės medžiagos poveikis, taip, kad vertinamosios baigties nereikėtų ekstrapoliuoti už gautų duomenų ribų. Reikėtų vengti ekstrapoliuoti iki daug mažesnės nei mažiausioji ir virš daug didesnės nei didžiausioji koncentracijos verčių. Parengiamasis intervalo nustatymo bandymas pagal C.27 ar C.28 bandymo metodus gali padėti pasirenkant tinkamą bandymo koncentracijų intervalą.
19. EC_x nustatyti reikia naudoti ne mažiau kaip penkias koncentracijos vertes ir aštuonis kartotinius vienos koncentracijos bandinius. Kiekvienai koncentracijai reikėtų naudoti du veisimo narvelius (A ir B). Aštuoni kartotiniai bandiniai padalijami į dvi grupes po keturis kartotinius bandinius, skirtus kiekvienam veisimo narveliui. Kartotinių bandinių grupavimas yra būtinas, atsižvelgiant į reikiamą mašalų skaičių narvelyje, kad būtų galima patikimai įvertinti reprodukciją. Tačiau 2-oji karta irgi turi aštuonis kartotinius bandinius, gautus iš veikiamų populiacijų veisimo narvelių. Koncentracijos verčių skirtumo faktorius neturėtų būti didesnis nei du (išimtis galima tais atvejais, kai dozės ir atsako kreivės krypties koeficientas yra mažas). Kiekvienos apdorojimo dozės kartotinių bandinių skaičių galima sumažinti iki šešių (po tris kiekvienam veisimo narveliui), jei skirtingą atsaką sukeliančių bandymo koncentracijos verčių skaičius yra padidėjęs. Didinant kartotinių bandinių skaičių arba mažinant tarpus tarp bandymo koncentracijos verčių gaunami siauresni EC_x pasiklovimo intervalai.

NOEC įvertinimo schema

20. Jei norima nustatyti NOEC, reikėtų naudoti penkias koncentracijos vertes ir ne mažiau kaip aštuonis kartotinius vienos koncentracijos bandinius (po 4 kiekvienam veisimo A ir B narveliui), o koncentracijos verčių skirtumo faktorius neturėtų būti didesnis nei du. Kartotinių bandinių skaičius turėtų būti pakankamas, kad būtų užtikrinta reikiama statistinė galia 20 % skirtumui su kontroliniais bandiniais aptikti, esant 5 % reikšmingumo lygiui ($\alpha = 0,05$). Vystymosi spartai, vislumui ir vaisingumui paprastai tinka dispersinė analizė (ANOVA), po to taikant Dunnett ar Williams kriterijų (22–25). Išsinerimo santykiui ir lyčių santykiui gali tikti Cochran-Armitage, Fisher tikslusis kriterijus (su Bonferroni pataisa) ar Mantel-Haentzel kriterijai.

Ribinis bandymas

21. Ribinį bandymą galima atlikti (viena bandymo koncentracija ir kontrolinis (-iai) bandinys (-iai)), jei atliekant neprivalomą parengiamąjį intervalo nustatymo bandymą nebuvo nustatyta jokių poveikių. Ribinio bandymo tikslas – įrodyti, kad bandomosios cheminės medžiagos toksinis poveikis pasireiškia esant koncentracijai, kuri yra didesnė nei bandyta ribinė koncentracija. Vandeniui siūloma 100 mg/l, o nuosėdoms 1 000 mg/kg (sausos medžiagos masės) koncentracija. Paprastai būtini ne mažiau kaip aštuoni kartotiniai apdorojimo dozės ir kontroliniai bandiniai. Reikėtų įrodyti, kad yra reikiama statistinė galia 20 % skirtumui su kontroliniais bandiniais aptikti, esant 5 % reikšmingumo lygiui ($\alpha = 0,05$). Metrinių vienetų atsakui (pvz., vystymosi sparta) tinkamas statistinis metodas yra *t* kriterijus, jei duomenys atitinka šio kriterijaus reikalavimus (normalusis pasiskirstymas ir vienalytė dispersija). Jei duomenys neatitinka šių reikalavimų, galima taikyti nelygių dispersijų *t* kriterijų arba neparametrinį, pvz., Wilcoxon-Mann-Whitney kriterijų. Išsinerimo santykiui tinka Fisher tikslusis kriterijus.

PROCEDŪRA

Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos*Vandens ir nuosėdų sistemos paruošimas (vandens sodrinimas)*

22. a. Į kiekvieną bandymo indą ir kristalizatorių įdedamas atitinkamas dirbtinių nuosėdų kiekis (žr. 13–14 pastraipas ir 3 priedėlį), kad susidarytų ne plonesnis kaip 1,5 cm sluoksnis (kristalizatoriaus sluoksnis galėtų būti šiek tiek plonesnis), bet ne storesnis kaip 3 cm. Vanduo (žr. 15 pastraipą) įpilamas taip, kad nuosėdų sluoksnio storio ir vandens gylio santykis būtų ne didesnis kaip 1:4. Paruošus bandymo indus, nuosėdų ir vandens sistemą reikėtų nestipriai aeruoti maždaug septynias dienas prieš įdedant 1-osios arba 2-osios kartos pirmosios stadijos lervas (žr. 14 pastraipą ir 3 priedėlį). Kristalizatorių nuosėdų ir vandens sistema bandymo metu neaeruojama, nes jie neturi užtikrinti lervų išgyvenamumo (prieš išsiritimą kiaušinėlių krūvelės jau yra surinktos). Prieš pilant vandenį ant nuosėdų, jas galima uždengti plastikiniu disku, kad nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir smulkiosios dalelės nebūtų iš naujo suspenduotos vandens sluoksnyje. Po to diskas nedelsiant išimamas. Taip pat galima naudoti kitus įtaisus.

Vandens ir nuosėdų sistemos paruošimas (nuosėdų sodrinimas)

22. b. Sodrintos nuosėdos, paruoštos pagal 16b pastraipą, dedamos į indus ir kristalizatorių ir ant jų užpilama tiek vandens, kad nuosėdų ir vandens tūrio santykis būtų 1:4. Nuosėdų sluoksnio storis turėtų būti nuo 1,5 iki 3 cm (kristalizatoriaus sluoksnis galėtų būti šiek tiek plonesnis). Prieš pilant vandenį ant nuosėdų, jas galima uždengti plastikiniu disku, kad nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir smulkiosios dalelės nebūtų iš naujo suspenduotos vandens sluoksnyje, o paskui diskas nedelsiant išimamas. Taip pat galima naudoti kitus įtaisus. Pageidautina, kad paruoštas sodrintas nuosėdas užpylus vandeniu, būtų palikta laiko bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp nuosėdų ir vandeninės fazės (4) (5) (7) (18). Būtų gerai, jei tai būtų daroma bandymo temperatūros ir aeravimo sąlygomis. Reikiama pusiausvirinimo trukmė priklauso nuo nuosėdų ir cheminės medžiagos savybių ir gali būti nuo kelių valandų iki kelių dienų, o retais atvejais – iki penkių savaičių. Kadangi per tą laiką galėtų įvykti daugelio cheminių medžiagų suskaidymas, pusiausvyros nelaukiama ir rekomenduojamas 48 h pusiausvirinimo laikotarpis. Tačiau, jei žinoma, kad cheminės medžiagos skaidymo nuosėdose pusėjimo trukmė yra ilga (žr. 8 pastraipą), pusiausvirinimo trukmę galima pailginti. Šio papildomo pusiausvirinimo laikotarpio pabaigoje reikėtų matuoti bandomosios cheminės medžiagos bent didžiausios ir mažiausios dozės koncentraciją vandenyje virš nuosėdų, porų vandenyje ir nuosėdose (žr. 38 pastraipą). Pagal šiuos bandomosios cheminės medžiagos analizės duomenis, atsižvelgiant į išmatuotas koncentracijos vertes, galima apskaičiuoti masės balansą ir pateikti rezultatus.
23. Bandymo indus reikėtų uždengti (pvz., stiklinėmis plokštelėmis). Prireikus tyrimo metu leidžiama įpilti vandens iki pradinio tūrio garavimo nuostoliams kompensuoti. Reikėtų pilti distiliuotą arba dejonizuotą vandenį, kad būtų išvengta galimo druskų kaupimosi. Kristalizatorių veisimo narveliuose uždengti nereikia ir garavimo nuostolius bandymo laikotarpiu galima kompensuoti, bet nebūtina, nes kiaušinėlių krūvelių sąlytis su vandeniu trunka tik maždaug vieną dieną ir kristalizatoriai naudojami tik trumpą bandymo tarpą.

Bandymo organizmų įdėjimas

24. Keturias ar penkias dienas prieš įdedant 1-osios kartos pirmosios stadijos lervas kiaušinėlių krūveles reikėtų paimti iš kultūros ir sudėti į mažus indus su auginimo terpe. Galima naudoti pradinės kultūros terpę arba paimti iš naujo paruoštą terpę. Abiem atvejais į auginimo terpę reikėtų įdėti truputį maisto, pvz., kelis lašus smulkiai sumaltų žuvų maisto dribsnių suspensijos filtrato (žr. 2 priedėlį). Reikėtų naudoti tik neseniai padėtų kiaušinėlių krūveles. Paprastai lervos ima risti praėjus kelioms dienoms po kiaušinėlių padėjimo (nuo 2 iki 3 dienų *C. riparius* 20 °C ir nuo 1 iki 4 dienų *C. dilutus* 23 °C ir *C. yoshimatsui* 25 °C), ir lervos auga per keturias stadijas, iš kurių kiekviena trunka 4–8 dienas. Atliekant bandymą reikėtų naudoti pirmosios stadijos lervas (ne vėliau kaip 48 h po išsiritimo). Pirmosios stadijos lervas būtų galima atpažinti pagal galvos kapsulės plotį (7).

25. Dvidešimt 1-osios kartos pirmosios stadijos lervų buka pipete atsitiktinai paskirstoma į kiekvieną bandymo indą su nuosėdų ir vandens sistema. Vandens aeravimas nutraukiamas dedant lervas į bandymo indą ir dar 24 h neaeruojamas po lervų įdėjimo (žr. 32 pastraipą). Atsižvelgiant į taikomą bandymo schemą (žr. 19 ir 20 pastraipas) vienai koncentracijai turi tekti ne mažiau kaip 120 lervų (6 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), jei nustatoma EC_{50} ir 160 lervų (8 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jei nustatoma NOEC. Taikant sodrintų nuosėdų schemą, bandomoji medžiaga įterpiama nuo lervų įdėjimo etapo.

Vandens virš nuosėdų sodrinimas

26. Po dvidešimt keturių valandų nuo 1-osios kartos pirmosios stadijos lervų įdėjimo vanduo virš nuosėdų sodrinamas bandomąja chemine medžiaga ir vėl pradedama nestipriai aeruoti (dėl galimų nedidelių bandymo schemos pakeitimų žr. 7 pastraipą). Maži bandomosios cheminės medžiagos tirpalų tūriai pipete įterpiami po vandens paviršiumi. Tada vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Taikant sodrinto vandens schemą, bandomoji medžiaga įterpiama nuo vandens sodrinimo (t. y. praėjus vienai dienai po lervų įdėjimo) etapo.

Suaugusių mašalų surinkimas

27. Išsinėrę 1-osios kartos mašalai surenkami iš bandymo indų siurbtuku, ištraukiamuoju arba panašiu įtaisu (žr. 5 priedėlį) mažiausiai kartą, bet geriau – du kartus per dieną (žr. 36 pastraipą). Reikėtų imtis specialių atsargumo priemonių, kad mašalai nebūtų sužaloti. Iš keturių tos pačios bandomosios dozės indų surinkti mašalai išleidžiami į veisimo narvelį, kuriam jie buvo prieš tai priskirti. Pirmojo (patino) išsinėrimo dieną kristalizatoriai sodrinami, pipete įlašinant nedidelį bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo tūrį žemiau vandens paviršiaus (sodrinto vandens schema). Tada vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Į kristalizatorius įpiltos bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nominaliai atitinka bandymo indų, kurie yra priskirti tam konkrečiam veisimo narveliui, koncentraciją. Jei taikoma sodrintų nuosėdų schema, kristalizatoriai paruošiami maždaug 11 dieną nuo veikimo bandomąja medžiaga pradžios (t. y. nuo lervų 1-osios kartos įdėjimo), taigi jų pusiausvirinimas gali vykti maždaug 48 h iki atsiranda pirmosios kiaušinėlių krūvelės.

28. Kiaušinėlių krūvelės surenkamos iš kristalizatorių ir pincetu arba buka pipete pernešamos į veisimo narvelį. Kiekviena kiaušinėlių krūvelė dedama į indą su auginimo terpe iš to kristalizatoriaus, iš kurio ji buvo paimta (pvz., į 12 duobučių mikrotitravimo plokštelės duobutę kartu su ne mažiau kaip 2,5 ml terpės). Indai su kiaušinėlių krūvelėmis uždengiami dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo.

Kiaušinėlių krūvelės paliekamos stebėti ne mažiau kaip šešias dienas nuo jų gavimo, taigi jas galima klasifikuoti kaip vaisingas arba nevaisingas. 2-oji karta pradedama iš kiekvieno veisimo narvelio pasirenkant ne mažiau kaip tris, bet geriau šešias vaisingų kiaušinėlių krūveles, ir paliekama išsiristi, pridėjus truputį maisto. Kiaušinėlių krūvelės turėtų būti gautos didžiausio kiaušinėlių dėjimo momentu, kuris kontroliniuose bandiniuose paprastai būna maždaug 19 bandymo dieną. Geriausia būtų, kad visų bandomosios medžiagos dozių 2-oji karta būtų pradėta tą pačią dieną, bet tai gali būti ne visuomet įmanoma dėl su chemine medžiaga susijusio poveikio lervų vystymuisi. Tokiu atveju didesnės koncentracijos bandinių 2-oji karta būtų pradėta vėliau nei mažesnės dozės ir kontrolinis (tirpiklio) bandiniai.

29. a. Taikant sodrinto vandens schemą, 2-ajai kartai skirta nuosėdų ir vandens sistema ruošama vandens virš nuosėdų sluoksnį sodrinant bandomąja chemine medžiaga maždaug 1 h prieš įdedant pirmosios stadijos lervas į bandymo indus. Pipete įlašinami nedideli bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalų tūriai žemiau vandens paviršiaus. Paskui vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Po sodrinimo nestipriai aeruojama.
29. b. Taikant sodrintų nuosėdų schemą, 2-ajai kartai skirta veikimo indų nuosėdų ir vandens sistema ruošama taip pat, kaip ir 1-ajai kartai.
30. Dvidešimt 2-osios kartos pirmosios stadijos lervų (ne vėliau kaip 48 h po išsiritimo) buka pipete atsitiktinai paskirstoma į kiekvieną bandymo indą su sodrinta nuosėdų ir vandens sistema. Vandens aeravimas

nutraukiamas į bandymo indus dedant pirmą pirmosios stadijos lervą ir dar 24 h neaeruojamas po lervų įdėjimo. Atsižvelgiant į taikomą bandymo schemą (žr. 19 ir 20 pastraipas) vienai koncentracijai turi tekti ne mažiau kaip 120 lervų (6 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), jei nustatoma EC_{50} ir 160 lervų (8 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jei nustatoma NOEC.

Maistas

31. Lervas bandymo induose būtina maitinti, pageidautina, kiekvieną dieną ar bent tris kartus per savaitę. Per pirmąsias jaunų lervų vystymosi 10 parų turėtų pakakti 0,25–0,5 mg (*C. yoshimatsui* lervoms 0,35–0,5 mg) per dieną žuvų maisto (vandeninės suspensijos arba smulkiai sumalto maisto, pvz., Tetra-Min arba Tetra-Phyll, išsami informacija pateikta 2 priedėlyje). Vyresnėms lervoms pašaro gali prireikti šiek tiek daugiau: likusiai bandymo trukmės daliai turėtų pakakti 0,5–1 mg vienai lervai per dieną. Maisto kiekį reikėtų sumažinti visų veikimo dozių ir kontrolinių bandinių atvejais, jei nustatomas grybelio augimas arba stebimas kontrolinės grupės gyvūnų gaištamumas. Jei grybelio augimo nepavyksta sustabdyti, bandymą reikėtų pakartoti.

Toksikologinio poveikio per virškinamąjį traktą svarba paprastai yra didesnė tų cheminių medžiagų, kurios rodo didelį giminingumą organinei angliai arba su nuosėdomis jungiasi kovalentinėmis jungtimis, atveju. Todėl bandant tokių savybių medžiagas, lervų išgyvenamumui ir natūraliam augimui užtikrinti maistą į dirbtines nuosėdas reikia dėti prieš stabilizavimo laikotarpį, atsižvelgiant į taikomus reguliavimo įstaigų reikalavimus. Siekiant išvengti vandens kokybės blogėjimo, vietoj žuvų maisto reikėtų naudoti augalines medžiagas, pvz., dėti 0,5 % (sausos medžiagos masės) smulkiai sumaltų didžiosios dilgėlės (*Urtica dioica*), baltojo šilkmedžio (*Morus alba*), persinio dobilo (*Trifolium repens*), daržinio špinato (*Spinacia oleracea*) lapų arba kitokių augalinių medžiagų (*Cerophyl* arba α -celiuliozės). Viso organinio maisto šaltinio pridėjimas į nuosėdas prieš sodrinimą nėra nereikšmingas, kalbant apie vandens kokybę ir biologines charakteristikas (21), be to, jis nėra standartizuotas metodas, bet nauji tyrimai pateikia įrodymų, kad šis metodas yra efektyvus (19) (26). Suaugusių mašalų veisimo narveliuose paprastai maitinti nereikia, bet vislumas ir vaisingumas padidėja, kai sočiajame sacharozės tirpale įmirkytas medvilninis tamponas duodamas kaip išsinėrusių mašalų maisto šaltinis (34).

Inkubavimo sąlygos

32. Praėjus 24 h po abiejų kartų pirmos pirmosios stadijos lervos įdėjimo, pradedama nestipriai aeruoti vandenį virš nuosėdų bandymo induose ir toliau aeruojama per visą bandymo trukmę (būtina užtikrinti, kad ištirpusio deguonies koncentracija nesumažėtų iki mažesnės kaip 60 % soties ore vertės (ASV)). Aeruojama per stiklinę Pastero pipetę, kurios išėjimo anga yra 2–3 cm virš nuosėdų paviršiaus ir per kurią tiekiami keli burbuliukai per sekundę. Bandant lakiąsias chemines medžiagas, reikėtų pagalvoti apie tai, kad nuosėdų ir vandens sistema nebūtų aeruojama, bet tuo pačiu metu ji atitiktų ne mažesnės kaip 60 % ASV (10 pastraipa) tinkamumo kriterijų. Kitos rekomendacijos pateiktos (16).
33. Bandymas su *C. riparius* atliekamas pastovioje 20 °C ($\pm$ 2 °C) temperatūroje. *C. dilutus* ir *C. yoshimatsui* rekomenduojama 23 °C ir 25 °C ($\pm$ 2 °C) temperatūra. Naudojama 16 h dienos šviesos trukmė, o apšvieta turėtų būti nuo 500 liuksų iki 1 000 liuksų. Veisimo narveliams galima numatyti vienos valandos aušros ir sutemų tarpinį.

Ekspozicijos trukmė

34. Sodrinto vandens schema: 1-osios kartos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis prasideda, kai į bandymo indų vandenį virš nuosėdų įpurškiama bandomoji cheminė medžiaga (praėjus vienai dienai po lervų įdėjimo; dėl galimų bandymo schemos pakeitimų žr. 7 pastraipą). 2-osios kartos veikimas bandomąja medžiaga prasideda nedelsiant, nes lervos įdedamos į jau sodrintą nuosėdų ir vandens sistemą. Maksimali *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* 1-osios kartos veikimo trukmė yra 27 dienos, o 2-osios – 28 dienos (1-osios kartos lervos vieną dieną induose būna neveikiamos bandomąja medžiaga). Atsižvelgiant į sanklotą, visa bandymo trukmė yra maždaug 44 dienos. Maksimali *C. dilutus* 1-osios kartos veikimo trukmė yra 64 dienos, o 2-osios kartos – 65 dienos. Visa bandymo trukmė yra maždaug 100 dienų.

Sodrintų nuosėdų schema: veikimas prasideda nuo lervų įdėjimo ir abiejų kartų *C. riparius* bei *C. yoshimatsui* maksimali trukmė yra 28 dienos, o *C. dilutus* abiejų kartų maksimali trukmė – 65 dienos.

Stebėjimai

Išsinėrimas

35. Nustatoma abiejų kartų vystymosi trukmė ir suminis visiškai išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius. Patinai nesunkiai atpažįstami pagal jų plunksniškus čiuptuvėlius ir plono kūno padėtį.
36. Abiejų kartų bandymo indus reikėtų apžiūrėti ne mažiau kaip tris kartus per savaitę, kad būtų galima vizualiai įvertinti kokią nors nenormalų lervų elgesį (pvz., pasišalinimą iš nuosėdų, neįprastą plaukimą) palyginti su kontroliniais bandiniais. Išsinėrimo laikotarpiu, kuris prasideda praėjus maždaug 12 dienų nuo *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* lervų įdėjimo (*C. dilutus* – 20 dienų), atsiradę mašalai suskaičiuojami ir mažiausiai kartą, bet geriau – du kartus per dieną (anksti ryte ir vėlyvą popietę) nustatoma jų lytis. Identifikuoti 1-osios kartos mašalai atsargiai išimami iš indų ir pernešami į veisimo narvelius. Identifikuoti 2-osios kartos mašalai nužudomi. Visos kiaušinėlių krūvelės, padėtos 1-osios kartos bandymo induose, turėtų būti surenkamos atskirai ir kartu su ne mažiau kaip 2,5 ml vietinio vandens pernešamos į 12 duobučių mikrotitravimo plokšteles (arba kitus tinkamus indus), kurios uždengiamos dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo. Taip pat reikėtų užrašyti negyvų lervų ir vabzdžiais nevirtusių lėliukių skaičius. Veisimo narvelio, bandymo indo ir ištraukiamojo įtaiso pavyzdžiai pateikti 5 priedėlyje.

Reprodukcija

37. Poveikis reprodukcijai vertinamas pagal 1-osios kartos mašalų padėtų kiaušinėlių krūvelių skaičių ir šių kiaušinėlių krūvelių vaisingumą. Kartą per dieną kiaušinėlių krūvelės surenkamos iš kristalizatorių, padėtų į kiekvieną veisimo indą. Reikėtų paimti kiaušinėlių krūveles su ne mažiau kaip 2,5 ml vietinio vandens ir pernešti į 12 duobučių mikrotitravimo plokšteles (viena kiaušinėlių krūvelė kiekvienoje duobutėje) arba į kitokius tinkamus indus, kurie uždengiami dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo. Užrašomos ir dokumentuojamos šios kiekvienos kiaušinėlių krūvelės charakteristikos: gavimo diena, dydis (normalus, t. y. $1,0 \pm 0,3$ cm, ar mažas, paprastai $\leq 0,5$ cm) ir sandara (normali – banano formos su spiraline kiaušinėlių virtine ar nenormali, pvz., nespiralinė kiaušinėlių virtinė) ir vaisingumas (vaisinga ar nevaisinga). Kiaušinėlių krūvelės vaisingumas vertinamas šešių dienų laikotarpiu po jos gavimo. Kiaušinėlių krūvelė laikoma vaisinga, jei ne mažiau kaip iš trečdalio kiaušinėlių išsivertė lervos. Į veisimo narvelį įdėtų patelių suminis skaičius naudojamas vienai patelei tenkančių kiaušinėlių krūvelių ir vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičiui nustatyti. Prireikus galima įvertinti kiaušinėlių skaičių kiaušinėlių krūvelėje neardomuoju būdu, taikant žiedinį skaičiavimo metodą (išsamiai aprašytas 32 ir 33 nuorodose).

Analiziniai matavimai

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija

38. Reikėtų matuoti bent didžiausios ir mažiausios dozės vandens virš nuosėdų, porų vandens ir nuosėdų bandinių koncentraciją veikimo bandomąja medžiaga pradžioje (vandens sodrinimo atveju reikėtų matuoti vieną valandą po medžiagos įdėjimo) ir bandymo pabaigoje. Tai taikytina abiejų kartų indams. Veisimo narvelių kristalizatorių atveju analizuojamas tik vanduo virš nuosėdų, nes tik su juo liečiasi kiaušinėlių krūvelės (jei taikoma sodrinamų nuosėdų schema, būtų galima numatyti nuosėdų koncentracijos analizinį patvirtinimą). Galima atlikti papildomus nuosėdų, porų vandens ar vandens virš nuosėdų koncentracijos matavimus bandymo eigoje, jei manoma, kad tai yra būtina. Šis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nustatymas suteikia informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos elgesį ir (arba) pasiskirstymą vandens ir nuosėdų sistemoje. Jei imami nuosėdų ir porų vandens bandiniai bandymo pradžioje ir jo eigoje (žr. 39 pastraipą), reikia turėtų papildomų bandymo indų analizei atlikti. Jei taikoma sodrinto vandens schema, matuoti koncentraciją nuosėdose galėtų būti nebūtina, jei bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų buvo aiškiai nustatytas atliekant vandens ir nuosėdų tyrimą palyginamomis sąlygomis (pvz., nuosėdų ir vandens santykio, taikymo tipo, nuosėdų organinės anglies kiekio) arba jei buvo įrodyta, kad išmatuota koncentracija vandenyje virš nuosėdų yra nuo 80 % iki 120 % nominaliosios arba išmatuotos pradinės koncentracijos.
39. Kai atliekami tarpiniai matavimai (pvz., 7 ir (arba) 14 dieną) ir jei analizei reikia turėti didesnius bandinius, kurių negalima paimti iš bandymo indų nepaveikiant bandymo sistemos, analizę reikėtų atlikti imant bandinius iš taip pat paruoštų (įskaitant bandymo organizmų buvimą) papildomų bandymo indų su bandomąja medžiaga, kurie nebūtų naudojami biologiniams stebėjimams.

40. Rekomenduojama intersticinio (t. y. porų) vandens atskyrimo procedūra yra 30 min trukmės centrifugavimas, pvz., 10 000 g 4 °C temperatūroje. Tačiau, jei įrodoma, kad bandomosios cheminės medžiagos filtrai neadsorbuoja, taip pat galėtų tikti filtravimas. Kartais dėl per mažo bandinio tūrio gali būti neįmanoma analizuoti porų vandens koncentracijų.

Fizikiniai ir cheminiai parametrai

41. Tinkamu būdu reikėtų išmatuoti bandymo indų ir kristalizatorių vandens pH, bandymo vandenyje ištirpusio deguonies ir temperatūros vertes (žr. 10 pastraipą). Bandymo pradžioje ir jo pabaigoje reikėtų išmatuoti kontrolinių bandinių bei vieno bandymo indo ir kristalizatoriaus su didžiausia koncentracija vandens kietumą ir amoniako kiekį.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Šio gyvavimo ciklo bandymo tikslas – nustatyti cheminės medžiagos poveikį reprodukcijai ir dviejų kartų vystymosi spartai bei visiškai išsėdusių ir gyvų mašalų patinų ir patelių suminiam skaičiui. Patinų ir patelių išsėdimo santykio duomenis reikėtų sujungti. Jei nėra statistiškai reikšmingų atskirų lyčių vystymosi spartos jautrių skirtumų, galima sujungti statistinei analizei skirtus patinų ir patelių rezultatus.
43. Poveikio koncentracijos vertės, išreikštos kaip koncentracija vandenyje virš nuosėdų (sodrinto vandens) arba nuosėdose (sodrintų nuosėdų), paprastai apskaičiuojamos pagal ekspozicijos pradžioje išmatuotas koncentracijos vertes (žr. 38 pastraipą). Todėl, jei sodrinamas vanduo, abiejų kartų bandymo indų ir kristalizatorių vandens virš nuosėdų koncentracijos vertės, paprastai išmatuotos veikimo bandomąją medžiagą pradžioje, suvidurkinamos kiekvienai bandomosios medžiagos dozei. Jei sodrinamos nuosėdos, abiejų kartų bandymo indų (ir gal būt kristalizatorių) koncentracijos vertės, paprastai išmatuotos veikimo bandomąją medžiagą pradžioje, suvidurkinamos kiekvienai bandomosios medžiagos dozei.
44. Siekiant apskaičiuoti taškinį įvertį, t. y. EC_x , indo ir veisimo narvelio statistiniai duomenys gali būti naudojami kaip tikrieji kartotiniai bandiniai. Skaičiuojant EC_x pasiklivimo lygmenį, reikėtų atsižvelgti į kintamumą tarp indų arba reikėtų įrodyti, kad šis kintamumas yra toks mažas, kad į jį galima nekreipti dėmesio. Kai modelio atitiktis tikrinama mažiausiųjų kvadratų metodu, reikėtų atlikti indo statistinių duomenų transformaciją, kad būtų pagerintas dispersijos vienalytiškumas. Tačiau EC_x vertes reikėtų skaičiuoti po to, kai atsakas yra transformuotas atgal į pradinę vertę (31).
45. Kai statistinės analizės tikslas yra NOEC nustatymas tikrinant hipotezę, reikia atsižvelgti į kintamumą tarp indų, ir tai įmanoma taikant ANOVA metodus (pvz., Williams ir Dunnett kriterijų procedūras). Williams kriterijus tiktų, kai daroma teorinė prielaida, kad dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška, o Dunnett kriterijus tiktų, jei monotoniškumo hipotezė nepasitvirtina. Kaip alternatyvą tais atvejais, jei pažeidžiamos įprastinės ANOVA prielaidos (31), būtų galima taikyti patikimesnius kriterijus (27).

Išsėdimo santykis

46. Išsėdimo santykiai yra dichotominiai duomenys ir juos galima analizuoti mažėjimo tvarka taikant Cochran-Armitage kriterijų, jei manoma, kad dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška ir duomenys atitinka šią prielaidą. Jei neatitinka, galima taikyti tikslųjį Fisher arba Mantel-Haentzel kriterijų, darant Bonferroni-Holm p verčių pataisą. Jei yra įrodymų, kad tarp kartotinių vienos koncentracijos bandinių kintamumas yra didesnis nei pagal binominį skirstinį (dažnai vadinamas perversiniu binominiu kintamumu), tada reikėtų taikyti stiprųjį Cochran-Armitage arba tikslųjį Fisher kriterijų, kuris pateiktas (27).

Nustatoma vieno indo išsiritusių gyvų mašalų (patinų ir patelių) skaičiaus suma n_e ir padalijama iš įdėtų lervų skaičiaus n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a},$$

čia:

ER – išsinerimo santykis;

n_e – vieno indo išsinerusių gyvųjų mašalų skaičius;

n_a – į vieną indą įdėtų lervų skaičius (paprastai 20).

Kai n_e yra didesnis kaip n_a (t. y., jei netyčia buvo įdėtas didesnis nei numatyta lervų skaičius), n_a reikėtų sulyginti su n_e .

47. Alternatyvus būdas, kuris labiausiai tinka didelio dydžio imtims, kai yra perviršinė binominio pasiskirstymo dispersija, – tai laikyti, kad išsinerimo santykis yra tolydusis atsakas, ir taikyti tokius ER duomenis atitinkančias procedūras. Šiuo atveju didelė imtis apibrėžiama kaip išsinerusių mašalų skaičius ir neišsinerusių lervų skaičius, kuris yra didesnis nei penki vienam kartotiniam bandiniui (indui).
48. Norint taikyti ANOVA metodus, iš pradžių reikėtų atlikti ER verčių kvadratinės šaknies arksinuso arba Tukey-Freeman transformaciją, kad būtų gautas apytikriai normalusis skirstinys ir būtų išlygintos dispersijos. Naudojant absoliučiuosius dažnumus galima taikyti Cochran-Armitage, Fisher tikslųjį (Bonferroni) arba Mantel-Haentzel kriterijus. Kvadratinės šaknies arksinuso transformacija yra ER kvadratinės šaknies atvirkstinio sinuso ($\sin^{-1}$) skaičiavimas.
49. Išsinerimo santykių EC_x vertės apskaičiuojamos taikant regresinę analizę (pvz., probit, logit arba Weibull modelius (28)). Jei regresinė analizė nepavyksta (pvz., kai yra mažiau kaip du daliniai atsakai), galima taikyti kitus neparametrinius metodus, pvz., slenkamojo vidurkio arba paprastosios interpoliacijos.

Vystymosi sparta

50. Vidutinė vystymosi trukmė yra vidutinis laikotarpis nuo lervų įdėjimo (0 bandymo diena) iki bandymo mašalų kartos išsinerimo (apskaičiuojant tikrąją vystymosi trukmę, reikėtų atsižvelgti į lervų amžių, kai jos buvo įdedamos). Vystymosi sparta (vienetas: 1/dieną) yra vystymosi trukmės atvirkštinis dydis ir atitinka lervų vienos dienos vystymosi dalį. Vertinant šiuos nuosėdų toksiškumo tyrimus, vystymosi spartai teikiama pirmenybė, nes jos dispersija yra mažesnė, ji yra labiau vienalytė ir arčiau normaliojo pasiskirstymo, palyginti su vystymosi trukme. Taigi vystymosi spartai, kitaip nei vystymosi trukmei, galima taikyti didesnės galios parametrinių kriterijų procedūras. Vystymosi spartos kaip tolydžiojo atsako EC_x vertės galima įvertinti atliekant regresinę analizę (pvz., (29) (30)). Vidutinę vystymosi trukmės NOEC vertę galima įvertinti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus. Kadangi patinai išsineria anksčiau nei patelės, t. y. jų vystymosi sparta yra didesnė, pravartu be visų mašalų vystymosi spartos apskaičiuoti kiekvienos lyties vystymosi spartą atskirai.
51. Taikant statistinius kriterijus daroma prielaida, kad x tikrinimo dieną pastebėtų mašalų skaičius išsinerė per laiko intervalo nuo x dienos iki $x - 1$ dienos vidurį (1 – tikrinimo intervalo ilgis, paprastai 1 diena). Vidutinė vystymosi sparta indui ($\bar{x}$) apskaičiuojama pagal:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e},$$

čia:

$\bar{x}$ – vidutinė indui gauta vystymosi sparta;

i – tikrinimo intervalo indeksas;

m – maksimalus tikrinimo intervalų skaičius;

f_i – per tikrinimo intervalą i išsinėrusių mašalų skaičius;

n_e – suminis iki bandymo pabaigos išsinėrusių mašalų skaičius ($= \Sigma f_i$);

x_i – per intervalą i išsinėrusių mašalų vystymosi sparta;

$$x_i = 1 / \text{diena}_i - \frac{l_i}{2},$$

čia:

diena_i – tikrinimo diena (dienos nuo lervų įdėjimo);

l_i – tikrinimo intervalo i trukmė (dienos, paprastai 1 diena).

Lyčių santykis

52. Lyčių santykiai yra dichotominiai duomenys, todėl juos reikėtų įvertinti taikant Fisher tikslųjį kriterijų arba kitus tinkamus metodus. Natūralus *C. riparius* lyčių santykis yra lygus vienetui, t. y. patinų ir patelių skaičius yra vienodas. Abiejų kartų lyčių santykių duomenis reikėtų apdoroti vienodai. Kadangi maksimalus vienam indui tenkančių mašalų skaičius (t. y. 20) yra per mažas reikšmingai statistinei analizei atlikti, gaunamas visų vienos apdorojimo dozės indų kiekvienos lyties išsinėrusių ir gyvų mašalų suminis skaičius. Šie netransformuoti duomenys tikrinami 2×2 faktorinės analizės lentelėje (tirpiklio) kontrolinio bandinio arba sujungtų kontrolinių bandinių duomenų atžvilgiu.

Reprodukcija

53. Reprodukcija, kaip vislumas, skaičiuojama kaip vienai patelei tenkančių kiaušinėlių krūvelių skaičius. Tikslesnė išraiška būtų veisimo narvelyje gautų kiaušinėlių krūvelių suminio skaičiaus dalmuo iš į tą narvelį įdėtų gyvų ir nesužalotų patelių suminio skaičiaus. Vislumo NOEC vertę galima nustatyti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus.
54. Kiaušinėlių krūvelės vaisingumas naudojamas vienai patelei tenkančių vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičių kiekybiniam skaičiavimui. Veisimo narvelyje gautų vaisingų kiaušinėlių krūvelių suminis skaičius dalijamas iš į tą narvelį įdėtų gyvų ir nesužalotų patelių suminio skaičiaus. Vaisingumo NOEC vertę galima nustatyti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus.

Bandymo ataskaita

55. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- fizikinė būseną bei fizikinės ir cheminės savybės (tirpumas vandenyje, garų slėgis, $\log K_{ow}$, pasiskirstymo dirvožemyje koeficientas (arba nuosėdose, jei žinomas), stabilumas vandenyje bei nuosėdose ir kt.);
- cheminio identifikavimo duomenys (bendrasis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir kt.), įskaitant grynumą ir bandomosios cheminės medžiagos kiekybinio nustatymo metodą.

Bandomųjų gyvūnų rūšys:

- naudoti bandymo organizmai: rūšys, mokslinis pavadinimas, organizmo gavimo šaltinis ir veisimo sąlygos;
- informacija apie kiaušinėlių masės ir lervų apdorojimą;

- informacija apie išsinėrusių 1-osios kartos mašalų apdorojimą, naudojant ištraukiamąjį įtaisą ir kt. (žr. 5 priedėlį);
- 1-osios ir 2-osios kartos bandymo organizmų amžius jų įdėjimo į bandymo indus momentu.

Bandymo sąlygos:

- naudotos nuosėdos, t. y. natūralios ar atkurtosios (dirbtinės) nuosėdos;
- natūralios nuosėdos: nuosėdų ėminių ėmimo vieta ir jos aprašymas, įskaitant, jei įmanoma, užteršimą; nuosėdų charakteristikos: pH, organinės anglies kiekis, C/N santykis ir granuliuotinė sudėtis (jei tinka).
- dirbtinės nuosėdos: paruošimas, sudedamosios dalys ir charakteristikos (organinės anglies kiekis, pH, drėgmės kiekis ir kt., išmatuotos bandymo pradžioje);
- bandymo vandens paruošimas (jei naudojamas atkurtasis vanduo) ir charakteristikos (deguonies koncentracija, pH, kietumas ir kt., išmatuotos bandymo pradžioje);
- bandymo indų ir kristalizatorių nuosėdų ir vandens virš nuosėdų sluoksnių storis;
- vandens virš nuosėdų ir porų vandens tūris; bandymo indų ir kristalizatorių drėgnųjų nuosėdų su porų vandeniu ir be jo masė;
- bandymo indai (medžiaga ir matmenys);
- kristalizatoriai (medžiaga ir matmenys);
- veisimo narveliai (medžiaga ir matmenys);
- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir bandymo indų bei kristalizatorių bandymo koncentracijos;
- bandomosios medžiagos įdėjimo į bandymo indus ir kristalizatorius būdas: bandymo koncentracijos vertės, kartotinių bandinių skaičius ir tirpikliai, jei būtini;
- inkubavimo bandymo induose sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta, aeravimas (burbuliukų skaičius per sekundę);
- inkubavimo veisimo narveliuose ir kristalizatoriuose sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta;
- kiaušinėlių krūvelių inkubavimo mikrotitravimo plokštelėse (arba kitokiuose induose) sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta;
- išsami informacija apie maitinimą, įskaitant maisto tipą, paruošimą, kiekį ir maitinimo režimą.

Rezultatai:

- nominaliosios bandymo koncentracijos vertės, išmatuotos bandymo koncentracijos vertės ir visų bandymo induose bei kristalizatoriuose esančios bandomosios cheminės medžiagos analizės rezultatai;
- vandens bandymo induose kokybė, t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies kiekis, kietumas ir amoniako kiekis;
- išgaravusio bandymo vandens papildytas kiekis, jei buvo papildomas;
- 1-osios ir 2-osios kartos išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius, tenkantis vienam indui per dieną;
- visiškai išsinėrusių ir gyvų 1-osios ir 2-osios kartos mašalų lyčių santykis vienai bandomosios medžiagos dozei;
- 1-osios ir 2-osios kartos lervų, kurios neišsinėrė kaip mašalai, skaičius, gautas vienam indui;
- 1-osios ir 2-osios kartos išsinėrusių mašalų (mašalų patinus ir pateles skaičiuojant kartu) procentinė dalis arba dalis, gauta vienam kartotiniam bandiniui ir bandymo koncentracijai;
- visiškai išsinėrusių ir gyvų 1-osios ir 2-osios kartos mašalų vidutinė vystymosi sparta (patinų ir patelių atskirai ir kartu), gauta vienam kartotiniam bandiniui ir bandymo koncentracijai;

- vieno veisimo narvelio kristalizatoriuose per dieną padėtų kiaušinėlių krūvelių skaičius;
- kiekvienos kiaušinėlių krūvelės charakteristikos (dydis, forma ir vaisingumas);
- vislumas – suminis kiaušinėlių krūvelių skaičius, padalytas iš į veisimo narvelį įdėtų patelių suminio skaičiaus;
- vaisingumas – suminis vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičius, padalytas iš į veisimo narvelį įdėtų patelių suminio skaičiaus;
- toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai, pvz., EC_x (ir susiję pasiklivimo intervalai), NOEC ir statistiniai metodai, kurie buvo taikomi įverčiams nustatyti;
- rezultatų aptarimas, įskaitant poveikį bandymo rezultatams dėl nukrypimų nuo šio bandymo metodo.

NUORODOS

- (1) Šio priedo C.28 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant vandenį su įterpta bandomąja medžiaga.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRC, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja medžiaga.

- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
 - (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
 - (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
 - (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
 - (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
 - (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
 - (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
 - (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
 - (24) 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.
 - (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
 - (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J. Soils Sediments*, 9: 94-102.
 - (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
 - (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
 - (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
 - (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
 - (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
 - (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
 - (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
 - (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.
-

*1 priedėlis***Apibrėžtys**

Šiame bandymo metode taikomos šios apibrėžtys:

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Dirbtinės nuosėdos arba sukurtosios, atkurtosios ar sintetinės nuosėdos – mišinys medžiagų, naudojamų natūralių nuosėdų fiziniams komponentams modeliuoti.

Vanduo virš nuosėdų – vanduo, užpildas ant nuosėdų bandymo inde.

Intersticinis vanduo arba porų vanduo – vanduo, užimantis erdvę tarp nuosėdų ir dirvožemio dalelių.

Sodrintas vanduo – bandymo vanduo, į kurį įdedama bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

2 priedėlis

Rekomendacijos dėl *Chironomus riparius* auginimo

1. *Chironomus* lervas galima auginti kristalizatoriuose ar didesnėse talpyklose. Ant talpyklos dugno paskleidžiamas maždaug nuo 5 mm iki 10 mm storio smulkaus kvarco smėlio sluoksnis. Taip pat įrodyta, kad tinkamas substratas yra diatomitas (pvz., Merck, Art 8117) (pakanka plonesnio vos kelių mm storio sluoksnio). Po to įpilama vandens iki kelių centimetrų gylio. Prireikus įpilama papildomai vandens, kad būtų kompensuoti garavimo nuostoliai ir būtų išvengta išdžiūvimo. Prireikus vandenį galima pakeisti. Reikėtų užtikrinti nestiprų aeravimą. Lervų veisimo indus reikėtų laikyti tinkamame narvelyje, kad išsinėrę suaugę mašalai negalėtų išskristi. Narvelis turėtų būti gana erdvus, kad išsinėrusiems suaugusiems mašalams būtų vietos spiestis; antraip kopuliacija gali neįvykti (mažiausi matmenys yra maždaug 30 × 30 × 30 cm).
2. Narvelius reikėtų laikyti kambario temperatūroje arba pastovių aplinkos sąlygų patalpoje 20 ± 2 °C temperatūroje; šviesiojo laikotarpio trukmė 16 val. (apšvieta apie 1 000 liuksų), 8 val. tamsos. Buvo pranešta, kad dėl mažesnės kaip 60 % RH drėgmės gali sumažėti reprodukcija.

Skiedimo vanduo

3. Galima naudoti bet kokią tinkamą natūralų ar atkurtąjį vandenį. Paprastai naudojamas šulinio vanduo, vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, ir dirbtinės terpės (pvz., Elendt M4 arba M7 terpė, žr. toliau). Prieš naudojant vanduo turi būti aeruojamas. Prireikus panaudotą kultūrų auginimo vandenį galima atnaujinti jį nupilant arba išsiurbiant iš kultūrų auginimo indų taip, kad nebūtų pažeisti lervų vamzdeliai.

Lervų maitinimas

4. *Chironomus* lervas reikėtų maitinti žuvų maisto dribsniais (Tetra Min®, Tetra Phyll® ar kito panašaus prekių ženklo žuvų maistu) maždaug po 250 mg indui per dieną. Maistą galima duoti kaip sausus miltelius arba kaip vandeningą suspensiją: 1,0 g maisto dribsnių įdedama į 20 ml skiedimo vandens ir maišoma, kad būtų gautas vienalytis mišinys. Šio preparato davimo norma būtų apie 5 ml vienam indui per dieną (prieš naudojant supurtoma). Vyresnėms lervoms galima duoti daugiau.
5. Maitinimas koreguojamas atsižvelgiant į vandens kokybę. Jei auginimo terpė susidrumsčia, duodamo maisto kiekį reikėtų sumažinti. Duodamo maisto kiekį reikėtų kruopščiai kontroliuoti. Jei jo duodama per mažai, lervos migruoja į vandens sluoksnį, jei per daug – didėja mikrobinis aktyvumas ir sumažėja deguonies koncentracija. Abiem atvejais gali sumažėti augimo sparta.
6. Į naujai ruošiamus kultūros indus taip pat galima įdėti kai kurių žaliųjų dumblių (pvz., *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) ląstelių.

Išsinėrusių mašalų maitinimas

7. Kai kurie tyrėjai pasiūlė išsinėrusių mašalų maisto šaltiniu naudoti sočiajame sacharozės tirpale įmirkytą medvilninį tamponą.

Išsinėrimas

8. Esant 20 ± 2 °C temperatūrai, suaugę mašalai pradeda atsirasti auginimo induose maždaug po 13–15 dienų. Patinai nesunkiai atpažįstami pagal jų plunksniškus čiuptuvėlius ir ploną kūną.

Kiaušinėlių krūvelės

9. Suaugusiems mašalams esant veisimo narvelyje, visus lervų auginimo indus reikėtų tikrinti tris kartus per savaitę, ar juose nėra padėta lipnių kiaušinėlių krūvelių. Jei kiaušinėlių krūvelių yra, jas reikėtų atsargiai paimti. Jas reikėtų pernešti į mažas lėkšteles su auginimo vandens bandiniu. Kiaušinėlių krūvelės naudojamos ruošiant naujus kultūros indus (pvz., 2–4 kiaušinėlių krūvelės / indui) arba atliekant toksiškumo bandymus.
10. Pirmosios stadijos lervos turėtų išsiriti po 2–3 dienų.

Naujų kultūros indų ruošimas

11. Turint sukurtas kultūras, turėtų būti įmanoma kas savaitę ar rečiau paruošti naują kultūros indą lervoms auginti, atsižvelgiant į bandymo reikalavimus, ir pašalinti senus indus, išsinėrus suaugusiems mašalams. Taikant šią sistemą, be didelių pastangų bus reguliariai tiekiami suaugę mašalai.

M4 ir M7 bandymo tirpalų ruošimas

12. Elendt (1990) aprašė M4 terpę. M7 terpę ruošama kaip M4 terpę, išskyrus 1 lentelėje išvardytas chemines medžiagas, kurių M7 koncentracijos vertės yra keturis kartus mažesnės palyginti su M4. Bandymo tirpalo nereikėtų ruošti pagal Elendt ir Bias (1990), nes pradiniais tirpalams paruošti nurodytos $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 ir K_2HPO_4 koncentracijos vertės nesutampa.

M7 terpės ruošimas

13. Kiekvienas pradinis tirpalas (I) ruošiamas atskirai ir iš šių pradinių tirpalų (I) ruošiamas jungtinis pradinis tirpalas (II) (žr. 1 lentelę). M7 terpę ruošama, 50 ml jungtinio pradinio tirpalo (II) ir 2 lentelėje nurodytus kiekvieno makroelemento pradinio tirpalo kiekius skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro. Vitaminų pradinis tirpalas ruošiamas į dejonizuotą vandenį įdėjus 3 lentelėje nurodytą trijų vitaminų kieki, ir 0,1 ml jungtinio vitaminų pradinio tirpalo įpilama į galutinę M7 terpę prieš pat ją naudojant. Vitaminų pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Terpė aeruojama ir stabilizuojama.

1 lentelė.

M4 ir M7 terpės mikroelementų pradiniai tirpalai

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro	Pradinis tirpalas (II) ruošiamas maišant šiuos pradinių tirpalų (I) tūrius (ml) ir skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro		Galutinės bandymo tirpalų koncentracijos vertės (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro	Pradinis tirpalas (II) ruošiamas maišant šiuos pradinių tirpalų (I) tūrius (ml) ir skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro		Galutinės bandymo tirpalų koncentracijos vertės (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Šių medžiagų kiekiai M4 ir M7 skiriasi, kaip nurodyta pirmiau.

⁽²⁾ Šie tirpalai ruošiami atskirai, supilami kartu ir nedelsiant apdorojami autoklave.

2 lentelė.

M4 ir M7 terpių mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai

	Kiekis, skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro (mg)	Mitybinių makroelementų pradinių tirpalų tūris, įpilamas ruošiant M4 ir M7 terpes (ml/l)	Galutinės bandymo tirpalų M4 ir M7 koncentracijos vertės (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

3 lentelė.

M4 ir M7 terpių vitaminų pradinis tirpalas

Visi trys vitaminų tirpalai sumaišomi, kad būtų gautas vienas vitaminų pradinis tirpalas.

	Kiekis, skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro (mg)	Vitaminų pradinių tirpalų tūris, įpilamas ruošiant M4 ir M7 terpes (ml/l)	Galutinės bandymo tirpalų M4 ir M7 koncentracijos vertės (mg/l)
Tiamino hidrochloridas	750	0,1	0,075
Cianokobalaminas (B12)	10	0,1	0,0010
Biotinas	7,5	0,1	0,00075

NUORODOS

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

3 priedėlis

Dirbtinių nuosėdų paruošimas

NUOSĖDŲ SUDĖTIS

Dirbtinių nuosėdų sudėtis turėtų būti tokia:

Sudedamoji dalis	Charakteristika	% sausų nuosėdų masės
Durpės	Kiminių durpės, pH kuo artimesnis 5,5–6,0 vertei, jokių matomų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 1 mm) ir išdžiovintos ore	4–5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: > 50 % dalelių turėtų būti 50–200 μm intervale	75–76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20
Organinė anglis	Kiekis reguliuojamas įdedant durpių ir smėlio	2 ($\pm 0,5$)
Kalcio karbonatas	CaCO_3 , milteliai, chemiškai grynas	0,05–0,1
Vanduo	Laidis $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$	30–50

RUOŠIMAS

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai. Iš reikiamo durpių miltelių kiekio ruošiama suspensija dejonizuotame vandenyje, maišant didelio našumo homogenizavimo įtaisu. Šios suspensijos pH vertė, lygi $5,5 \pm 0,5$ nustatoma CaCO_3 . Švelniai maišoma suspensija kondicionuojama ne trumpiau kaip dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje, kad nusistovėtų pH ir būtų sukurta stabili mikroorganizmų populiacija. pH matuojamas dar kartą ir turėtų būti $6,0 \pm 0,5$. Durpių suspensija maišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolinu) ir dejonizuotu vandeniu, kad būtų gautos homogenizuotos nuosėdos, kurių vandens kiekis sudarytų 30–50 procentų sausų nuosėdų masės. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas CaCO_3 nuo 6,5 iki 7,5. Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Prieš chironomidų toksiškumo bandymą dirbtines nuosėdas rekomenduojama septynias dienas kondicionuoti tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą.

LAIKYMAS

Sausas dirbtinių nuosėdų sudėtinės dalis galima laikyti sausoje, vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštų dirbtinių (šlapių) nuosėdų nereikėtų laikyti prieš jas naudojant bandymui. Jas reikėtų panaudoti iš karto po 7 dienų kondicionavimo laikotarpio, kuris yra jų ruošimo procedūros pabaiga.

NUORODOS

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludge worms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

4 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

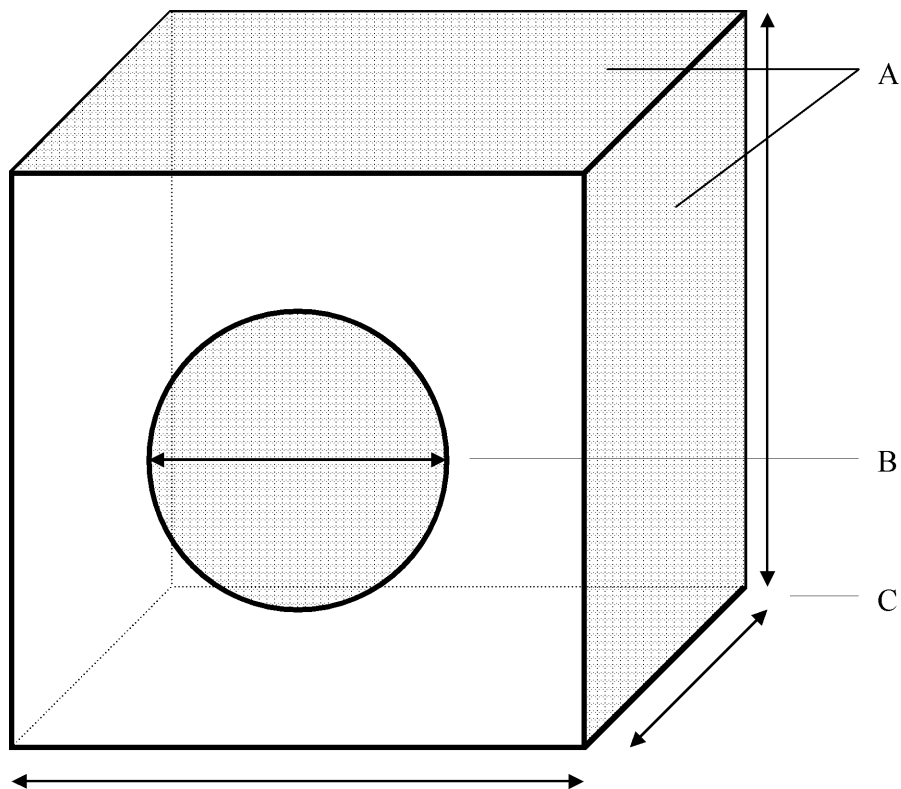
SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Kietumas kaip CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

(*) Tačiau reikėtų pabrėžti, kad, įtarus sąveiką tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį (todėl šiuo atveju nereikėtų naudoti Elendt Medium M4 terpės).

5 priedėlis

Bandymo atlikimo rekomendacijos

Veisimo narvelio pavyzdys:

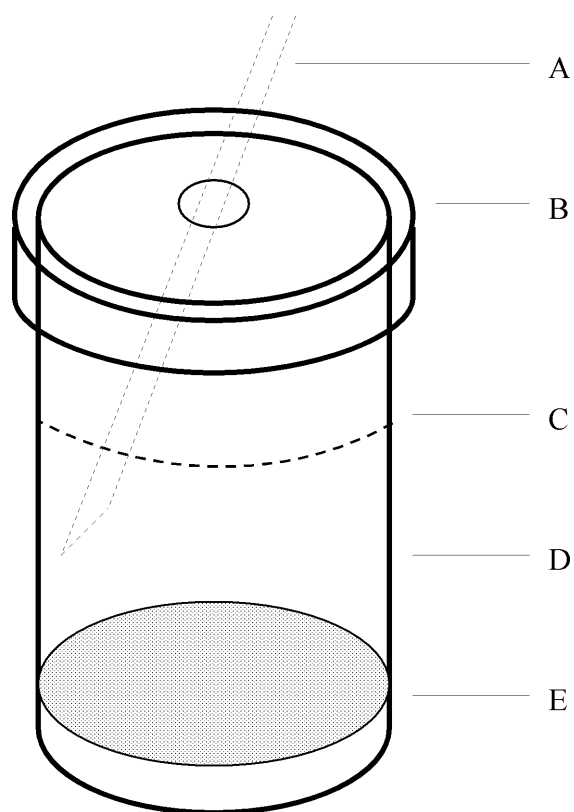


A: metalinis tinklelis narvelio viršuje ir mažiausiai iš vieno šono (akučių dydis maždaug 1 mm);

B: anga suaugusiems mašalams įleisti į veisimo narvelį ir padėtoms kiaušinėlių krūvelėms išimti iš kristalizatorių (šiam paveikslėlyje nepavaizduoti);

C: veisimo narvelio matmenys: ilgis ne mažesnis kaip 30 cm, aukštis – 30 cm, plotis – 30 cm.

Bandymo indo pavyzdys:



A: Pastero pipetė orui tiekti į vandenį virš nuosėdų;

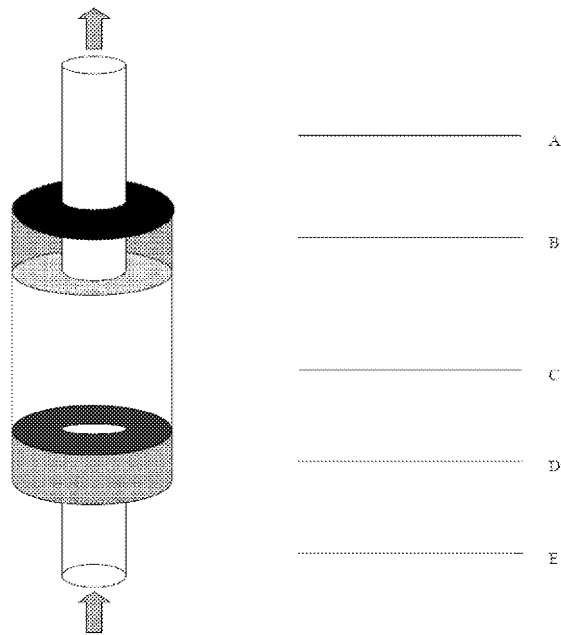
B: stiklinis dangtis, skirtas skraidantiems išsinėrusiems mašalams sulaikyti;

C: vandens sluoksnio paviršius;

D: bandymo indas (ne mažesnio kaip 600 ml tūrio cheminė stiklinė);

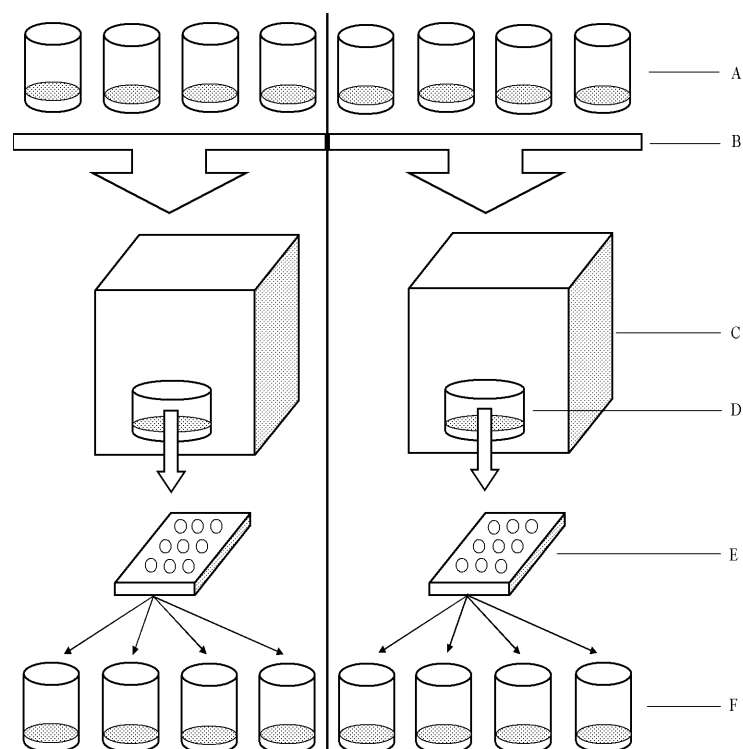
E: nuosėdų sluoksnis.

Ištraukiamojo įtaiso, skirto suaugusiems mašalams gaudyti, pavyzdys (rodyklės žymi oro srauto kryptį):



- A: stiklinis vamzdelis (vidinis skersmuo maždaug 5 mm), prijungtas prie savisiurbio siurblio;
- B: vulkanizuotos gumos kamštis su anga stikliniam vamzdeliui (A). Iš vidaus stiklinio vamzdelio (A) anga uždengta marle ir metaliniu tinkleliu (akučių dydis maždaug 1 mm), kad į ištraukiamąjį įtaisą siurbiami mašalai nebūtų sužaloti;
- C: skaidrus indas (plastikinis arba stiklinis, ilgis maždaug 15 cm) sugautiems mašalams laikyti;
- D: vulkanizuotos gumos kamštis su anga stikliniam vamzdeliui (E). Kamštis D ištraukiamas iš indo C, kad mašalus būtų galima išleisti į veisimo narvelį;
- E: stiklinis vamzdelis (vidinis skersmuo maždaug 8 mm) suaugusiems mašalams surinkti iš indo.

Gyvavimo ciklo bandymo scheminis vaizdas:



- A: 1-oji karta – bandymo indai su nuosėdų ir vandens sistema, aštuoni kartotiniai bandiniai, 20 pirmosios stadijos lervų vienam indui;
- B: po keturis bandymo indus kiekvienam veisimo narveliui A ir B;
- C: veisimo narveliai (A ir B), skirti spiestis, poruotis ir dėti kiaušinėlius;
- D: kristalizatoriai kiaušinėlių krūvelėms dėti;
- E: mikrotitravimo plokštelės, po vieną duobutę kiekvienai kiaušinėlių krūvelei;
- F: 2-oji karta – bandymo indai su nuosėdų ir vandens sistema, aštuoni kartotiniai bandiniai, 20 pirmosios stadijos lervų vienam indui.

C.41. ŽUVŲ LYTINIO VYSTYMOSI BANDYMAS

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 234 (2011). Jis pagrįstas 1998 m. sprendimu sukurti naujus arba atnaujinti esamus endokrininę sistemą galinčių ardyti cheminių medžiagų atrankos ir bandymo metodus. Žuvų lytinio vystymosi bandymas (FSDT) buvo identifikuotas kaip perspektyvus bandymo metodas, apimantis jautrią žuvų gyvenimo stadiją, kurioje reaguojama į estrogenines ir androgenines chemines medžiagas. Nuo 2006 m. iki 2010 m. buvo atliekamas bandymo metodo tinkamumo patvirtinimo tarplaboratorinis tyrimas, kurio metu buvo patvirtintas Japoninės medakos (*Oryzias latipes*), zebrinės danijos (*Danio rerio*) ir trispyglės dyglės (*Gasterosteus aculeatus*) tinkamumas, o juodosios drūtagalvės rainės (*Pimephales promelas*) tinkamumas buvo patvirtintas iš dalies (41) (42) (43). Į šį protokolą įtraukta japoninė medaka, trispyglė dyglė ir zebrinė danija. Protokolas iš esmės yra patobulintas EBPO TG 210 *Žuvų ankstyvųjų gyvenimo stadijų toksiskumo bandymas* (1) kuriame bandomąja medžiaga veikiama tol, kol žuvis atskiriamos pagal lytį, t. y. maždaug 60 dienų po japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos išsiritimo (dph) (vėliau patvirtintų kitų rūšių ekspozicijos laikotarpis gali būti trumpesnis ar ilgesnis), įtraukiant su endokrinine sistema susijusias vertinamąsias baigtis. Atliekant FSDT, įvertinami poveikiai ir galimi lytiniam vystymuisi neigiami padariniai, kuriuos ankstyvosiomis gyvenimo stadijomis sukelia cheminės medžiagos, galinčios ardyti endokrininę sistemą (pvz., estrogenai, androgenai ir steroidinių hormonų sintezės inhibitoriai). Turint dviejų esminių endokrininių vertinamųjų baigčių, vitelogenino (VTG) koncentracijos ir fenotipinių lyčių santykio derinį, bandymo keliu galima parodyti bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą. Dėl su populiacija susijusio fenotipinių lyčių santykio kitimo FSDT gali būti taikomas pavojui ir rizikai vertinti. Tačiau, jei bandymas naudojamas pavojui ir rizikai vertinti, trispyglės dyglės nereikėtų naudoti, nes dabar turimi tinkamumo patvirtinimo duomenys parodė, kad bandomųjų cheminių medžiagų sukelti šios rūšies fenotipinių lyčių santykio pokyčiai buvo neįprasti.
2. Protokolas pagrįstas žuvų veikimu bandomųjų cheminių medžiagų tirpalais lytiniu požiūriu nestabiliu laikotarpiu, kai žuvis, kaip manoma, yra labiausiai jautrios endokrininę sistemą galinčioms ardyti cheminėms medžiagoms, trukdančioms lytiškai vystytis. Kaip su endokrinine sistema susijusių vystymosi nukrypimų rodikliai matuojamos dvi esminės vertinamosios baigtys – VTG koncentracijos vertės ir lyčių santykiai (lyčių proporcijos), nustatyti atliekant gonadų histologiją. Gonadų histopatologija (ovocitų ir spermatogeninių ląstelių įvertinimas ir stadijos nustatymas) neprivaloma. Be to, nustatoma genetinė lytis, jei įmanoma (pvz., japoninės medakos ir trispyglės dyglės). Genetinės lyties žymenų buvimas yra didelis pranašumas, nes padidina lyčių santykio statistinio kriterijaus galią ir galima aptikti kiekvieno individo fenotipinės lyties pasikeitimą. Kitos apikalinės vertinamosios baigtys, kurias būtų galima išmatuoti, yra išsiritimo laipsnis, išgyvenamumas ir kūno ilgis bei masė. Bandymo metodą būtų galima pritaikyti kitoms nei pirmiau išvardytos rūšims, jei būtų atliktas jų tinkamumo patvirtinimas, atitinkantis japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos patvirtinimą, jei kontrolinės žuvis būtų atskirtos lytiškai bandymo pabaigoje, jei VTG lygiai būtų pakankamai dideli, kad būtų galima aptikti su chemine medžiaga susijusius reikšmingus pokyčius ir jei bandymo sistemos jautris būtų nustatytas pagal endokrininės sistemos aktyviasias etalones chemines medžiagas ((anti)-estrogenus, (anti)-androgenus, aromatazės inhibitorius ir kt.). Be to, tinkamumo patvirtinimo ataskaitą (-as), kurioje (-iose) pateikti kitų rūšių FSDT duomenys, turėtų peržiūrėti EBPO ir tinkamumo patvirtinimo rezultatas būtų laikomas priimtiniu.

Pradiniai aspektai ir apribojimai

3. VTG paprastai gamina kiaušinius dedančių moteriškos lyties stuburinių gyvūnų kepenys, kaip atsaką į cirkuliuojantį vidinį estrogeną (2). Jis yra kiaušinio trynio baltymų pirmtakas ir, pagamintas kepenyse, keliauja krauju į kiaušidę, kurioje jį įsisavina ir modifikuoja besivystantys ovocitai. Nesubrendusios žuvis ir žuvų patinai VTG sintezuoja mažai, nors ir aptinkamais kiekiais, nes estrogeno cirkuliacija yra nepakankama. Tačiau kepenys gali sintetinti ir išskirti VTG, kaip atsaką į išorinį stimuliuojamą estrogenais (3) (4) (5).
4. Matuojant VTG galima aptikti chemines medžiagas, kurios veikia kaip estrogenai, antiestrogenai ir androgenai, ir chemines medžiagas, kurios trukdo sintetinti steroidus, pvz., aromatazės inhibitorius. Aptikti estrogenines chemines medžiagas įmanoma matuojant VTG atsiradimą žuvų patinuose, ir šis matavimas buvo plačiai dokumentuotas mokslinėje apžvalginėje literatūroje. VTG atsiradimas taip pat buvo įrodytas žuvis paveikus aromatizuojamais androgenais (6) (7). Sumažėjus estrogenų cirkuliacijai patelėse lygiui, pvz., jei inhibuojama aromatazė, kuri vidinį androgeną paverčia natūraliu estrogenu 17β-estradioliu, mažėja VTG koncentracija, naudojama aromatazės inhibavimo savybių turinčioms cheminėms medžiagoms arba, plačiau, steroidų sintezės inhibitoriams aptikti (33). Yra nustatyta ir plačiai dokumentuota VTG atsako po estrogenų ar aromatazės

inhibavimo biologinė svarba (8) (9). Tačiau įmanoma, kad VTG gamybai patelėse įtaką taip pat daro bendrasis toksikumas ir neendokrininio toksinio veikimo būdai.

5. Buvo sėkmingai sukurti ir standartizuoti keli matavimo metodai, skirti įprastinėmis sąlygomis kiekybiškai nustatyti VTG kraujyje, kepenyse, viso kūno arba galvos ir uodegos homogenato ėminiuose, surinktuose iš atskirų žuvų. Taip yra zebrinės danijos, trispyglės dyglės ir japoninės medakos atveju, taip pat iš dalies patvirtintos juodosios drūtagalvės rainės rūšys, kurių VTG galima nustatyti rūšių specifinės imunofermentinės analizės (ELISA) metodu, taikant imunochemiją (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Atliekant bandymus su japonine medaka ir zebrine danija, gauta gera koreliacija tarp VTG, išmatuoto kraujo plazmoje, kepenyse ir homogenato ėminiuose, nors homogenatams paprastai gaunamos šiek tiek mažesnės vertės palyginti su plazma (17) (18) (19). 5 priedėlyje pateiktos VGT analizės ėminių ėmimo procedūros.
6. Fenotipinių lyčių santykio (lyčių dalių) kitimas yra lyties pasikeitimą rodanti vertinamoji baigtis. Iš esmės, įtaką bręstančių žuvų lyčių santykiui gali daryti estrogenai, antiestrogenai androgenai, antiandrogenai ir steroidų sintezę inhibuojančios cheminės medžiagos (20). Buvo įrodyta, kad zebrinės danijos lyties pasikeitimas yra iš dalies grįžtamasis (21) po veikimo estrogeno tipo chemine medžiaga, bet lyties pasikeitimas po veikimo androgeno tipo chemine medžiaga yra negrįžtamas (30). Lytis, kuri atskiroms žuvims nustatoma atliekant gonadų histologinį tyrimą, apibrėžiama kaip moteriškoji, vyriškoji, hermafroditinė (vienoje gonadoje ovocitai ir spermatozoidus gaminančios ląstelės) arba nediferencijuota. Rekomendacijos pateiktos 7 priedėlyje ir EBPO gairėse, skirtose su endokrine sistema susijusios žuvų gonadų histopatologijos diagnozei nustatyti (22).
7. Genetinė lytis tiriama naudojant genetinius žymenis, jei jų turi tam tikra žuvų rūšis. Galima aptikti japoninės medakos moteriškąjį XX arba vyriškąjį XY genus atliekant polimerazės grandininę reakciją (PCR), arba galima analizuoti su Y susijusio DM domeno geną (DMY) (DMY neigiamas ar teigiamas), kaip aprašyta (23) (24). Lygiavertis trispyglės dyglės genetinės lyties nustatymo PCR metodas aprašytas 10 priedėlyje. Jei genetinę lytį galima atskirai susieti su fenotipine lytimi, kriterijaus galia padidėja, todėl reikėtų nustatyti rūšių genetinę lytį, jei jos turi dokumentuotus genetinės lyties žymenis.
8. Dviejų esminių endokrininių vertinamųjų baigčių – vitelogenino (VTG) koncentracijos ir fenotipinių lyčių santykio – derinys gali parodyti bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą (MOA) (1 lentelė). Lyčių santykis yra su populiacija susijęs biologinis žymuo (25) (26) ir FSDT rezultatai gali būti naudojami kai kurių tinkamai apibūdintų veikimo būdų pavojams ir rizikai vertinti, kai jų tinkamumą patvirtina reguliavimo institucija. Šiuo metu šie veikimo būdai yra estrogenai, androgenai ir steroidų sintezės inhibitoriai.

1 lentelė.

Endokrininių vertinamųjų baigčių atsakas į skirtingo cheminių medžiagų veikimo būdus:

↑ – didėjantis, ↓ – mažėjantis, – – netirta

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Lyčių santykis	Nuorodos
Silpnas estrogeno agonistas	↑	↑	↑♀ arba ↑nedif.	(27) (40)
Stiprus estrogeno agonistas	↑	↑	↑♀ arba ↑nedif., Ne. ♂	(28) (40)
Estrogeno antagonistas	—	—	↓♀, ↑nedif.	(29)
Androgeno agonistas	↓ arba –	↓ arba –	↑ ♂, Ne ♀	(28) (30)
Androgeno antagonistas	—	—	↑♀ ↑Hermafroditas	(31)
Aromatazės inhibitorius	↓	↓	↓♀	(33)

9. Į FSDT neįtrauktas reprodukcinis žuvų gyvenimo tarpsnis, todėl cheminės medžiagos, kurios, kaip įtariama, veikia reprodukciją, kai jų koncentracija yra mažesnė nei lytinę vystymąsi veikiančios koncentracijos vertės, turėtų būti tiriamos atliekant reprodukciją apimančią bandymą.
10. Šio bandymo metodo apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.
11. FSDT *in vivo* tikslas – nustatyti chemines medžiagas, turinčias androgeninių ir estrogeninių savybių, taip pat antiandrogeninių, antiestrogeninių ir steroidų sintezės inhibitorių savybių. FSDT tinkamumo patvirtinimo tarpsniai (1 ir 2) aprėpė estrogenines, androgenines chemines medžiagas ir steroidų sintezės inhibitorius. Estrogenų ir androgenų antagonistų poveikį, nustatytą atliekant FSDT, galima matyti 1 lentelėje, bet šie veikimo būdai šiuo metu yra mažiau dokumentuoti.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Atliekant bandymą, žuvis nuo tik ką apvaisinto ikro iki lytinės diferenciacijos pabaigos veikiama ne mažiau kaip trijų skirtingų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų vandeniniuose tirpaluose. Bandymas turėtų būti atliekamas pratekėjimo sąlygomis, išskyrus atvejus, kai tai neįmanoma dėl pratekėjimo sistemos nebuvimo arba bandomosios cheminės medžiagos tipo (pvz., ribotas tirpumas). Bandymas pradedamas tik ką apvaisintus ikrus (prieš blastodisko pasidalijimą) įdedant į bandymo kameras. Kiekvienos rūšies kamerų įkrova aprašyta 27 pastraipoje. Jei tai patvirtinto tinkamumo bandomųjų gyvūnų rūšys (japoninė medaka, trispyglė dyglė ir zebrinė danija), bandymas baigiamas 60 dienų po išsiritimo. Baigus bandymą, visos žuvis humaniškai numarinamos. Paimamas kiekvienos žuvies VTG analizei skirtas biologinis ėminys (kraujo plazmos, kepenų arba galvos ir uodegos homogenato), o likusi dalis fiksuojama, kad, atliekant histologinį gonadų įvertinimą, būtų galima nustatyti fenotipinę lytį; arba būtų galima atlikti histopatologiją (pvz., gonadų stadijos nustatymą, hermafroditizmo požymių rimtumą). Atitinkamus žymenis turinčių rūšių biologinis ėminys (analinio arba nugarinio peleko) paimamas genetinei lyčiai nustatyti (9 ir 10 priedėliai).
13. Tinkamų bandymo sąlygų, kurios turi būti sudarytos patvirtintoms bandomųjų gyvūnų rūšims – japoninei medakai, trispyglei dyglei ir zebrinei danijai – apžvalga pateikta 2 priedėlyje.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

14. Reikėtų turėti ūmaus toksiškumo arba kito trumpalaikio toksiškumo tyrimo [pvz., C.14 bandymo metodo (34) ir EBPO TG 210 (1)], atlikto su šiam bandymui pasirinktomis rūšimis, rezultatus. Tai reiškia, kad reikia žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje ir garų slėgį, be to, turėti patikimą cheminės medžiagos nustatymo bandymo kameroje analizės metodą, kurio tikslumas bei aptikimo riba yra žinomi ir pateikiami ataskaitoje.
15. Kitą naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, cheminės medžiagos grynumas, tabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pKa, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (C.4 bandymo metodas) (35).

Bandymo priimtino kriterijai

16. Kad bandymo rezultatai būtų priimtini, turi būti laikomasi šių sąlygų:
 - ištirpusio deguonies koncentracija visą bandymą turėtų būti ne mažesnė kaip 60 procentų soties vertės (ASV);
 - bandymo kamerų temperatūra bet kuriuo veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio momentu neturėtų skirtis daugiau $\pm 1,5$ °C ir būtų palaikoma bandomųjų gyvūnų rūšims nurodytos temperatūros intervale (2 priedėlis);
 - reikėtų turėti patvirtintą bandymui naudojamos cheminės medžiagos analizės metodą, kurio aptikimo riba būtų gerokai mažesnė nei mažiausia nominalioji koncentracija ir reikėtų surinkti duomenis, kurie įrodytų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo užtikrinta ± 20 % vidutinių išmatuotų verčių tikslumu;

- suminis apvaisintų ikrų išgyvenamumas kontroliniuose ir, jei reikia, tirpiklio kontroliniuose induose turėtų būti lygus arba didesnis nei 2 priedėlyje nurodytos ribos;
- su augimu ir lyčių santykiu bandymo pabaigoje susiję priimtumo kriterijai turėtų būti pagrįsti kontrolinių grupių duomenimis (sujungtų tirpiklio ir vandens kontrolinių bandinių arba vien tik tirpiklio bandinių, jei jie labai skiriasi):

		Japoninė medaka	Zebrinė danija	Trispyglė dyglė
Augimas	Žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Ilgis (standartinis ilgis)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Lyčių santykis (% patinų ar patelių)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

- kai naudojamas tirpiklis, jis neturėtų daryti statistiškai reikšmingos įtakos išgyvenamumui ir nesukelti jokių endokrininės sistemos ardymo poveikių arba kito neigiamo poveikio ankstyvosiomis gyvenimo stadijomis, kurį rodytų tirpiklio kontroliniai bandiniai;

Jei stebimas nuokrypis nuo bandymo priimtumo kriterijų, į padarinius reikėtų atsižvelgti įvertinant bandymo duomenų patikimumą ir šie svarstymai turėtų būti įtraukti į ataskaitą.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo kameros

- Galima naudoti bet kokias stiklines, nerūdijančiojo plieno ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos kameras. Kameros turėtų būti gana didelių matmenų, kad atitiktų toliau nurodytus įkrovos kriterijus. Bandymo kameras pageidautina išdėstyti bandymo plote atsitiktinai. Palyginti su visiško atsitiktinio išdėstymo schema, geresnė būtų atsitiktinai išdėstytų blokų schema, kai kiekviename bloke yra kiekvienos koncentracijos bandinys. Bandymo kameros turėtų būti apsaugotos nuo nepageidaujamų trikdžių.

Rūšių parinkimas

- Rekomenduojamos žuvų rūšys nurodytos 2 priedėlyje. Naujų rūšių įtraukimo procedūros pateiktos 2 pastraipoje.

Tėvų kartos žuvų laikymas

- Informacijos apie tėvų kartos žuvų laikymą tinkamomis sąlygomis galima rasti EBPO TG 210(1). Tėvų kartos žuvis reikėtų maitinti tinkamu maistu vieną ar du kartus per dieną.

Embrionų ir lervų apdorėjimas

- Iš pradžių embrionai ir lervos gali būti veikiami į pagrindinę kamerą įdėtose mažesnėse stiklinėse ar nerūdijančiojo plieno kameroje, kurių šoninės ar galinės sienelės pakeistos tinklu, kad tirpalas galėtų tekėti per kamerą. Tekėjimą per tas mažas kameras be turbulencijos galima užtikrinti pakabinant jas ant svirties, įrengtos taip, kad ji indus keltų ir nuleistų, bet organizmai visą laiką būtų panardinti.
- Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkeliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame inde laikyti, išsiritus lervoms, šitos apribojimo priemonės turėtų būti pašalintos, tačiau reikia palikti tinkelius, kurie neleistų žuvis ištrūkti. Jei lervas reikia pernešti, jų neturėtų veikti oras, o žuvis iš ikrų talpyklų išleisti neturėtų būti naudojami tinklai. Šio pernešimo laikas įvairioms rūšims skirtingas ir nebūtina jas visuomet pernešti.

Vanduo

22. Bandymams tinka bet koks vanduo, kuriame kontrolinės grupės žuvų išgyvenamumas būtų bent ne blogesnis nei 3 priedėlyje aprašytame vandenyje. Vandens kokybė visą bandymo laiką turėtų būti vienoda. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo nedarytų per didelės įtakos bandymo rezultatui (pvz., reaguodamas su bandomąja medžiaga) ar nedarytų neigiamo poveikio neršiančių žuvų elgesiui, kartkarčiais reikėtų imti vandens ėminių ir juos analizuoti. Suminės organinės anglies, laidžio, pH ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turėtų būti atliekama, pvz., kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) ir pesticidų analizė turėtų būti atliekama, jei abejojama vandens kokybe. Informacijos apie vandens ėminių ėmimą ir cheminę analizę galima rasti 34 pastraipoje.

Bandymo tirpalai

23. Jei praktiškai įgyvendinama, reikėtų naudoti pratekamąją sistemą. Bandymuose su pratekamuoju vandeniu būtina sistema, kuri visą laiką dozuotų ir skiestų bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojamasis siurblys, proporcingasis skiestuvas, sotintuvo sistema), kad į bandymo kameras būtų galima tiekti kelių bandymo koncentracijų verčių tirpalus. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai kartkartėmis turi būti tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Srautas, atitinkantis bent penkis bandymo kameros tūrius per 24 h (1) pasirodė esąs tinkamas. Reikėtų imtis priemonių, kad nebūtų naudojami plastikiniai vamzdeliai ar kitos medžiagos, nes kai kurios iš jų gali turėti biologiškai veiklių cheminių medžiagų arba gali adsorbuoti bandomąją cheminę medžiagą.
24. Pradinį tirpalą reikėtų ruošti nenaudojant tirpiklių, tiesiog sumaišant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu naudojant mechanines priemones (pvz., purtant arba naudojant ultragarsą). Jei bandomoji cheminė medžiaga sunkiai tirpsta vandenyje, reikėtų taikyti procedūras, aprašytas EBPO gairėse apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (36). Reikėtų vengti naudoti tirpiklius, bet kartais jie gali būti būtini, kad būtų galima gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą. Tinkamų tirpiklių pavyzdžiai pateikti (36).
25. Pusiau statinių bandymo sąlygų reikėtų vengti, išskyrus atvejus, kai jų naudojimas pagrįstas įtikinamomis priežastimis, susijusiomis su bandomąja chemine medžiaga (pvz., stabilumas, galimybė gauti, didelė kaina ar pavojus). Pusiau statinio bandymo metodo atveju galima taikyti dvi skirtingas atnaujinimo procedūras. Nauji bandymo tirpalai ruošiami švariose kamerose ir į jas atsargiai pernešami išgyvenę ikrai ir lervos arba bandymo organizmai paliekami bandymo kamerose, bet dalis (ne mažiau kaip du trečdaliai) vandens kasdien keičiama.

PROCEDŪRA**Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos***Ikrų surinkimas ir trukmė*

26. Siekiant išvengti genetinio poslinkio, ikrai renkami iš ne mažiau kaip trijų tėvų kartos porų ar grupių, sumaišytų ir atsitiktinai pasirinktų bandymui pradėti. Trispyglės dyglės dirbtinis apvaisinimas aprašytas 11 priedėlyje. Bandymą reikėtų pradėti kiek įmanoma greičiau apvaisinus ikrus, o embrionus pageidautina dėti į bandymo tirpalus prieš blastodisko dalijimosi pradžią arba kuo greičiau prasidėjus šiai stadijai, bet ne vėliau kaip 12 h po apvaisinimo. Bandymą reikėtų tęsti iki kontrolinės grupės lytinės diferenciacijos pabaigos (60 dienų po japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos išsiritimo).

Įkrova

27. Apvaisintų ikrų skaičius bandymo pradžioje turėtų būti ne mažesnis kaip 120 ikrų vienai koncentracijai, padalytų ne mažiau kaip 4 kartotinių bandinių induose (kontroliniams bandiniams priimtinas kvadratinei šakniai proporcingas priskyrimas). Ikrus reikėtų atsitiktinai paskirstyti tarp apdorojimo koncentracijų verčių (pagal statistines randomizavimo lenteles). Įkrovos dydis (žr. apibrėžties 1 priedėlyje) turėtų būti pakankamai mažas, kad be tiesioginio kamerų aeravimo jose ištirpusio deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 60 % soties ore vertės. Naudojant pratekamąją sistemą, rekomenduojamas 24 h vidutinis įkrovos dydis yra ne didesnis kaip 0,5 g/l, o bet kuriuo momentu – ne didesnis kaip 5 g/l tirpalo. Ne vėliau kaip 28 dieną po apvaisinimo kartotinių bandinių indų žuvų skaičių reikėtų perskirstyti, kad kiekviename inde būtų kuo vienodesnis žuvų skaičius. Jei pastebimas su veikimu bandomąja medžiaga susijęs gaištamumas, reikėtų atitinkamai mažinti kartotinių bandinių indų skaičių, kad koncentracijos vertėms tenkančių žuvų tankis būtų kuo vienodesnis.

Šviesa ir temperatūra

28. Dienos šviesos trukmė ir vandens temperatūra turėtų būti pritaikyta bandomųjų gyvūnų rūšims (dėl FSDT bandymo sąlygų žr. 2 priedėlį).

Maitinimas

29. Maistas ir maitinimas yra svarbiausi veiksniai ir svarbu, kad kiekvienai stadijai tinkamas maistas būtų tiekiamas reikiama laiko tarpais ir tokiu kiekiu, kurio pakanka normaliam augimui užtikrinti. Maitinti reikėtų iki soties, bet perteklius turėtų būti kuo mažesnis. Siekiant užtikrinti pakankamą augimo spartą, žuvis reikėtų maitinti mažiausiai du kartus per dieną (savaitgaliais priimtinas maitinimas vieną kartą per dieną), intervalas tarp maitinimų turi būti bent trys valandos. Prireikus maisto perteklių ir išmatas reikėtų pašalinti, kad nesikauptų atliekos. Įgijus patirties, maistas ir maitinimo režimai nuolat tobulinami, kad būtų pagerintas išgyvenamumas ir optimizuotas augimas. Todėl reikėtų imtis priemonių, kad pasiūlytą režimą patvirtintų pripažinti ekspertai. Maitinimą reikėtų nutraukti likus 24 h iki bandymo pabaigos. Atitinkamų maisto produktų pavyzdžiai išvardyti 2 priedėlyje (taip pat žr. EBPO *Fish Testing Framework* (39)).

Bandymo koncentracijos vertės

30. Bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos vertės turėtų būti išdėstytos taip, kaip aprašyta 4 priedėlyje. Reikėtų naudoti ne mažiau kaip tris bandymo koncentracijos vertes ir ne mažiau kaip keturis jų kartotinius bandinius. Renkantis bandymo koncentracijos verčių intervalą, reikėtų išnagrinėti turimų ūmaus toksiškumo tyrimų LC_{50} sąsajos su veikimo laikotarpiu kreivę. Jei duomenys bus naudojami rizikai įvertinti, reikėtų imti penkias bandymo koncentracijos vertes.
31. Nereikia naudoti cheminės medžiagos koncentracijos, kuri būtų didesnė kaip 10 % suaugusių žuvų ūmaus toksiškumo LC_{50} arba 10 mg/l, jei ši mažesnė. Maksimali bandymo koncentracija turėtų būti 10 % lervų arba mailiaus stadijos LC_{50} .

Kontroliniai bandiniai

32. Be bandymo koncentracijos bandinių reikėtų bandyti skiedimo vandens kontrolinius bandinius (≥ 4 kontroliniai bandiniai) ir, jei tinka, tirpiklio kontrolinius bandinius (≥ 4 kontroliniai bandiniai). Atliekant bandymą, reikėtų naudoti tik tuos tirpiklius, kuriuos ištyrus įrodyta, kad jie nedaro jokios statistiškai reikšmingos įtakos bandymo vertinamosioms baigtims.
33. Jei naudojamas tirpiklis, jo galutinė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,1 ml/l (36) ir ji turėtų būti vienoda visose bandymo kameroje, išskyrus skiedimo vandens kontrolinių bandinių kameras. Tačiau reikėtų imtis priemonių, kad toks tirpiklis nebūtų naudojamas arba jo koncentracija būtų kuo mažesnė.

Analizinių nustatymų ir matavimų dažnumas

34. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos cheminė analizė turėtų būti atliekama prieš bandymo pradžią, kad būtų patikrinta atitiktis priimtino kriterijams. Visi kartotiniai bandiniai turėtų būti analizuojami atskirai bandymo pradžioje ir pabaigoje. Vienos bandymo koncentracijos kartotinis vienas bandinys turėtų būti analizuojamas mažiausiai kartą per savaitę, bandymo metu sistemingai keičiant kartotinius bandinius (1, 2, 3, 4, 1, 2...). Jei ėminiai laikomi tam, kad jų analizė būtų atlikta vėliau, iš pradžių reikėtų patvirtinti ėminių laikymo metodo tinkamumą. Ėminius reikėtų filtruoti (pvz., 0,45 μ m akučių filtra) arba centrifuguoti, kad būtų atliekamas tikrojo cheminės medžiagos tirpalo nustatymas.
35. Bandymo laikotarpiu reikėtų matuoti visų bandymo kamerų ištirpusio deguonies koncentraciją, pH, suminį kietumą, laidį, druskingumą (jei tinka) ir temperatūrą. Ištirpusio deguonies koncentraciją, druskingumą (jei tinka) ir temperatūrą reikėtų matuoti ne rečiau kaip kartą per savaitę, o pH, laidį ir kietumą – bandymo pradžioje ir pabaigoje. Būtų gerai, kad bent vienoje bandymo kameroje būtų nepertraukiamai kontroliuojama temperatūra.
36. Rezultatai turėtų būti pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau, jei visą bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma ± 20 % nominaliosios koncentracijos tikslumu, bandymo rezultatus galima pagrįsti nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis.

Stebėjimai ir matavimai*Embrioninio vystymosi stadija*

37. Ekspoziciją reikėtų pradėti kuo greičiau po apvaisinimo ir prieš blastodisko dalijimosi pradžią, bet ne vėliau kaip 12 h po apvaisinimo, kad veikimas bandomąja medžiaga būtų užtikrintas ankstyvuoju embriono vystymosi laikotarpiu.

Išsiritimas ir išgyvenamumas

38. Išsiritimo ir išgyvenamumo stebėjimai turi būti daromi bent kartą per dieną, o gauti skaičiai užrašomi. Negyvus embrionus, lervas ir mailių reikėtų iš karto, kai tik bus pastebėti, pašalinti, nes jie greitai suyra ir gali būti sudraskyti kitų žuvų. Negyvus individus reikėtų šalinti labai atsargiai, kad nebūtų užgauti ar fiziškai sužaloti šalia esantys ikrai ir (arba) lervos, kadangi jie yra labai gležni ir jautrūs. Žūties kriterijai kinta pagal gyvenimo stadiją:
- ikrų: gerokas skaidrumo sumažėjimas ir spalvos pokytis ypač ankstyvosiomis stadijomis dėl baltymo koaguliacijos ir (arba) nusėdimo, todėl atsiranda baltas matinis atspalvis;
 - lervų ir mailiaus: nejudrumas ir (arba) kvėpavimo judesių, ir (arba) širdies plakimo nebuvimas, ir (arba) balta matinė centrinės nervų sistemos spalva ir (arba) reakcijos į mechaninius dirgiklius nebuvimas.

Nenormali išvaizda

39. Turėtų būti užrašytas kūno formos anomalijų turinčių lervų ir žuvų skaičius ir aprašyta išsigimimo išvaizda bei prigimtis. Reikėtų pastebėti, kad nenormalūs embrionai ir lervos pasitaiko natūraliai ir kai kurių rūšių gali būti keli kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) procentai. Nenormalūs gyvūnai turėtų būti pašalinti iš bandymo indų tik jiems nugaišus. Tačiau pagal 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, jei išsigimimo pasekmė – skausmas, kančios ir išsekimas arba ilgalaikė žala, o mirtį galima patikimai prognozuoti, gyvūnai turėtų būti anestezuojami ir numarinami pagal 44 pastraipą ir įtraukiami į analizės duomenis kaip nugaišę.

Nenormalus elgesys

40. Anomalijos, pvz., hiperventiliacija, nekoordinuotas plaukimas, netipiškas nejudrumas ir netipiškas elgesys maitinant turėtų būti užrašytas, kai tik pasirodo.

Masė

41. Pasibaigus bandymui visas išgyvenusias žuvis reikėtų numarinti (anestezuoti, jei reikėtų imti kraujo ėminius) ir išmatuoti atskirų šlapių žuvų (sausai nušluostytų filtravimo popieriumi) masę.

Ilgis

42. Pasibaigus bandymui reikėtų išmatuoti atskirų žuvų ilgį (standartinį ilgį).
43. Po šių stebėjimų ataskaitoje bus galima pateikti visus arba dalį šių duomenų:
- suminis gaištamumas;
 - sveikų žuvų bandymo pabaigoje skaičius;
 - išsiritimo pradžios ir pabaigos laikas;
 - išgyvenusių gyvūnų ilgis ir masė;
 - deformuotų lervų skaičiai;
 - žuvų, kurios elgiasi neįprastai, skaičius.

Žuvų imčių ėmimas

44. Žuvų imtys imamos pasibaigus bandymui. Paimtas žuvis reikėtų numarinti, pvz., MS-222 (100–500 mg/l, buferuoto 200 mg/l NaHCO_3 tirpalu) arba FA-100 (4-alil-2-metoksifenoliu, eugenoliu), ir atskirai išmatuoti bei pasverti, nurodant šlapio kūno (sausai nušluostyto filtravimo popieriumi), arba anestezuoti, jei reikėtų imti kraujo ėminius (žr. 49 pastraipą).

Imčių ėmimas VTG analizei ir lyčiai nustatyti atliekant histologinį įvertinimą

45. Visas žuvis reikėtų paimti ir paruošti lyties bei VTG analizei. Reikėtų atlikti visų žuvų histologinę analizę lyčiai nustatyti. Atliekant VTG matavimus, priimtinas ne mažiau kaip 16 žuvų imties dalies iš kiekvieno kartotinio bandinio indo ėmimas. VTG analizei reikėtų paimti daugiau žuvų, jei pasirodytų, kad gauti imties dalies rezultatai yra neaiškūs.
46. VTG analizei ir lyčiai nustatyti skirtų ėminių ėmimo procedūra priklauso nuo VTG analizės metodo:

VTG analizės metodas imant galvos ir uodegos homogenatą

47. Žuvis numarinama. Kiekvienos žuvies galva ir uodega atskiriamos nuo kūno, pjaunant skalpeliu iš karto už krūtininio peleko ir prieš pat nugarinį peleką (žr. 1 paveikslą). Kiekvienos žuvies galva ir uodega sudedamos kartu, pasveriamos, atskirai sunumeruojamos, užšaldomos skystajame azote ir laikomos – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje VTG analizei. Likusi žuvies kūno dalis numeruojama ir fiksuojama atitinkame fiksatoriuje histologiniam įvertinimui atlikti (22). Taikant šį metodą, įvertinamas kiekvieno gyvūno VTG ir histopatologija, todėl galimas VTG lygio kitimas gali būti susietas su žuvies (japoninės medakos ir trispyglės dyglės) fenotipine arba genetinė lytimi. Papildoma informacija pateikta homogenizavimo (5 priedėlis) ir VTG kiekybinio nustatymo (6 priedėlis) rekomendacijose.

VTG analizės metodas imant kepenų homogenatą

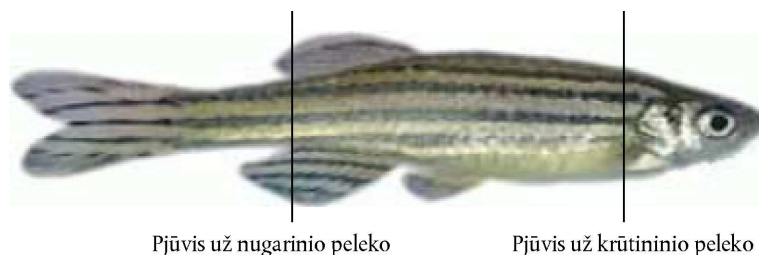
48. Žuvis numarinama. Kepenys išpjaunamos ir laikomos –70 °C arba žemesnėje temperatūroje. Rekomenduojamos kepenų išpjovimo ir pradinio apdorojimo procedūros pateiktos EBPO TG 229 (37) arba šio priedo C.37 priedėlyje (38). Kepenys atskirai homogenizuojamos, kaip aprašyta EBPO TG 229 arba šio priedo C.37 priedėlyje. Surinktame skystyje virš nuosėdų matuojamas VTG, taikant homologinį ELISA metodą (zebrinės danijos VTG kiekybinio nustatymo pavyzdys pateiktas 6 priedėlyje, japoninės medakos – EBPO TG 229 (37)). Pagal šį metodą taip pat galima gauti atskirų žuvų VTG ir gonadų histologijos duomenis.

VTG analizės metodas imant kraujo plazmą

49. Iš anestezuotos žuvies kraujas paimamas, atliekant širdies punkciją, iš uodegos venos arba nupjaunant uodegą, ir centrifuguojamas 4 °C temperatūroje plazmai paimti. Plazma laikoma – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje iki bus panaudota. Visa žuvis numarinama ir fiksuojama histologijai. Plazmos ėminiai ir žuvis atskirai numeruojamos, kad būtų galima susieti VTG lygį ir žuvies lytį.

1 paveikslas.

Kaip perpjauti žuvį, kad būtų galima matuoti VTG galvos ir uodegos homogenate ir atlikti vidurinės dalies histologinį įvertinimą



Genetinės lyties nustatymas

50. Genetinei lyčiai nustatyti paimamas atitinkamus žymenis turinčių rūšių žuvų biologinis ėminys. Imamas japoninės medakos analinio arba nugarinio peleko ėminys. Išsamus aprašymas, įskaitant audinių ėminių ėmimą ir lyties nustatymą PCR metodu, pateiktas 9 priedėlyje. Trispyglės dyglės audinių ėminių ėmimo ir lyties nustatymo PCR metodu aprašymas pateiktas 10 priedėlyje.

VTG matavimas

51. VTG matavimas turėtų būti pagrįstas patvirtintu kiekybinės analizės metodu. Reikėtų turėti informacijos apie tam tikroje laboratorijoje taikomo metodo laboratorinių ir tarplaboratorinių nustatymų kintamumą. Laboratorinio ir tarplaboratorinio kintamumo (labiausiai tikėtinas) šaltinis yra žuvų populiacijos skirtingos vystymosi stadijos. Atsižvelgiant į VTG matavimo kintamumą, vien tik šia vertinamąja baigtimi pagrįstas NOEC vertes reikėtų aiškinti labai atsargiai. Yra skirtingų metodų, kuriais būtų galima įvertinti šiame tyrime nagrinėjamų žuvų rūšių VTG gamybą. Palyginti jautrus ir specifinis matavimo metodas – tai proteinų koncentracijos nustatymas, taikant imunofermentinę analizę (ELISA). Reikėtų naudoti homologinius antikūnius (išaugintus tos pačios rūšies VTG) ir svarbiausius homologinius etalonus.

Lyties nustatymas

52. Atsižvelgiant į VTG ėminių ėmimo procedūrą, visa žuvis arba jos likusi vidurinioji dalis dedama į iš anksto paženklintą apdorojimo kasetę ir fiksuojama atitinkamame fiksatoriuje, kad būtų galima atlikti histologinį lyties nustatymą (taip pat galima įvertinti gonadų stadiją). Fiksavimo ir įliejimo rekomendacijos pateiktos 7 priedėlyje, tai pat EBPO gairėse, skirtose su endokrine sistema susijusios žuvų gonadų histopatologijos diagnozei (22). Apdorota žuvis įliejama į parafino blokus. Atskiras žuvis reikėtų dėti išilgai į parafino bloką. Gaunami ne mažiau kaip šeši (3–5 µm storio) kiekvienos žuvies išilginiai pjūviai priekinėje plokštumoje, įskaitant abiejų gonadų audinį. Atstumas tarp šių pjūvių turėtų būti lygus maždaug 50 µm patinams ir 250 µm patelėms. Tačiau dėl to, kad kiekviename bloke dažnai gali būti patinai ir patelės (jei į vieną bloką įlietas ne vienas gyvūnas), tarpas tarp šių blokų pjūvių turėtų būti maždaug 50 µm tol, kol negaunami mažiausiai šeši kiekvieno patino gonadų pjūviai. Paskui tarpą tarp pjūvių patelėms galima padidinti iki maždaug 250 µm. Pjūviai dažomi hematoksilinu bei eozinu ir tiriami optiniu mikroskopu, kaip stebėjimo tikslą turint lytį (patinas, patelė, hermafroditas arba nediferencijuota lytis). Hermafroditizmas apibrėžiamas kaip daugiau nei vieno ovocito buvimas sėklidėje, išanalizavus 6 pjūvius, arba su spermatogeninėmis ląstelėmis kiaušidėse (taip/ne). Histopatologija ir kiaušidžių bei sėklidžių stadijos nustatymas neprivalomi, tačiau, jei atliekamas tyrimas, reikėtų atlikti statistinę rezultatų analizę ir juos pateikti ataskaitoje. Pažymėtina, kad kai kurios žuvų rūšys (pvz., japoninė medaka ir kartais zebrinė danija) natūraliai neturi visiškai išsivysčiusios gonadų poros ir gali būti tik viena gonada. Visus šiuos stebėjimus reikėtų užrašyti.
53. Atskirų japoninės medakos žuvų genetinė lytis nustatoma pagal tai, ar yra vyriškosios lyties genas DMY ant Y chromosomos. Medakos genotipinę lytį galima identifikuoti nustatant DMY geno seką DNR, ekstrahuotos, pvz., iš analinio ar nugarinio peleko gabaliuko. Neatsižvelgiant į fenotipą, DMY buvimas rodo XY individą (patiną), o DMY nebuvimas rodo XX individą (patelę) (23). Audinių ruošimo ir PCR metodo rekomendacijos pateiktos 9 priedėlyje. Atskirų trispyglės dyglės žuvų genetinė lytis taip pat nustatoma 10 priedėlyje aprašytu PCR metodu.
54. Ataskaitoje reikėtų pateikti informaciją apie hermafroditų (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) buvimą.

Antriniai lytiniai požymiai

55. Tokių rūšių kaip japoninė medaka antrinius lytinius požymius valdo endokrininė sistema, todėl, jei įmanoma, žuvų fizinę išvaizdą reikėtų stebėti veikimo bandomąja medžiaga pabaigoje. Spenelių susidarymas japoninės medakos patelių analinio peleko užpakalinėje dalyje yra jautrus androgenams. Šio priedo C.37 skyriuje (38) pateiktos atitinkamos patinų ir androgenų paveiktų patelių antrinių lytinių požymių nuotraukos.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

56. Svarbu, kad vertinamosios baigtys būtų nustatomos taikant patvirtintą tinkamiausią statistinę analizę. Statistinis vienetas yra kartotinis bandinys, bet į statistinę analizę reikėtų įtraukti kartotinių bandinių kintamumą. 8 priedėlyje pateikta sprendimo priėmimo eigos schema, siekiant padėti pasirinkti bandymo duomenimis pagrįstą tinkamiausią statistinį kriterijų. Visų įtrauktų vertinamųjų baigčių statistinis reikšmingumo lygis yra 0,05.

Lyčių santykis ir genetinė lytis

57. Jei dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška, taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų (tendencijos kriterijų) reikėtų išanalizuoti lyčių santykį, siekiant nustatyti, ar veikimas bandomąja medžiaga jam padarė reikšmingą poveikį (NOEC/LOEC metodas). Jei nustatoma, kad priklausomybė nėra monotoniška, reikėtų taikyti priklausomybės paporiui kriterijų. Taikomas Dunnett'o kriterijus, jei galima gauti normalųjį pasiskirstymą ir homogenišką sklaidą. Taikomas Tamhane-Dunnetto kriterijus, jei sklaida heterogeniška. Kitais atvejais taikomas tikslusis Mann-Whitney kriterijus ir Bonferroni-Holm pataisa. Schema, kurioje aprašyta lyčių santykio statistika, pateikta 8 priedėlyje. Patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų lyčių santykius reikėtų pateikti lentelėse, kaip priklausomybės nuo koncentracijos verčių santykius $\pm$ SD. Reikėtų pažymėti statistinio reikšmingumo lygį. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42). Genetinė lytis turėtų būti pateikta ataskaitoje kaip patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų fenotipinės lyties reversijos procentinė dalis.

VTG koncentracijos vertės

58. VTG koncentracijos vertės turėtų būti išanalizuotos siekiant nustatyti, ar veikimas bandomąja medžiaga joms padarė reikšmingą poveikį (NOEC/LOEC metodas). Geriau taikyti Dunnett kriterijų nei t kriterijų darant Bonferroni pataisą. Jei taikoma Bonferroni pataisa, tinkamesnė yra Bonferroni-Holm pataisa. Tikslinga būtų taikyti VTG logaritminę transformaciją, kad būtų gautas normalusis pasiskirstymas ir homogeniška sklaida. Toliau, jei koncentracijos ir atsako priklausomybė yra monotoniška, pirmenybė, palyginti su visais pirmiau išvardytais kriterijais, teikiama Jonckheere Terpstra kriterijui. Jei taikomi t kriterijai arba Dunnetto kriterijus, nereikia naudoti ANOVA reikšmingumo Fisherio kriterijaus, kad analizę būtų galima tęsti. Duomenys pateikti 8 priedėlio scheme. Rezultatus, kaip patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų koncentracijos vidurkius $\pm$ SD, reikėtų pateikti lentelėse. Reikėtų pažymėti fenotipinių patelių ir fenotipinių patinų statistinį reikšmingumą. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42).

Bandomosios cheminės medžiagos faktinės koncentracijos vertės

59. Bandomosios cheminės medžiagos faktinę koncentraciją kameroje reikėtų nustatyti 34 pastraipoje nurodytu dažnumu. Rezultatus reikėtų pateikti lentelėse kaip vidutinę koncentraciją $\pm$ SD pagal kartotinius bandinius, taip pat pagal koncentraciją kartu su informacija apie ėminių skaičių, pažymint riktus vidutinės apdorojimo koncentracijos $\pm$ 20 % atžvilgiu. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42).

Rezultatų aiškinimas

60. Rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, jei išmatuotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės yra arti taikomo analizės metodo aptikimo ribos.

Bandymo ataskaita

61. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės; cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos grynumo duomenis ir jos kiekybinio nustatymo metodą.

Bandymo sąlygos

- taikytos bandymo procedūros (pvz., pratekamoji, pusiau statinė ar atnaujinimo); bandymo schema, įskaitant bandomosios medžiagos koncentracijos vertes, pradinių tirpalų paruošimo būdą (priede), atnaujinimo dažnumą (soliubilizavimo priemonę, jei naudojama, ir jos koncentraciją);
- nominaliosios bandymo koncentracijos vertės, bandymo kameroje išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartinis nuokrypis, šių verčių gavimo metodas (taikytą analizės metodą reikėtų pateikti priede; įrodymai, kad matuojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tikrame tirpale;
- kamerų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;
- išsami informacija apie maitinimą (pvz., maisto rūšį (-is), šaltinis, duodamas kiekis ir davimo dažnumas, teršalų analizės duomenys (pvz., PCB, PAH ir organinių chloro pesticidų kiekis), jei tinka.

Rezultatai

- įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka tinkamumo kriterijus: duomenis apie išsiritimo laipsnį reikėtų pateikti lentelėse kaip procentinę dalį pagal kartotinius bandinius ir koncentracijos vertes. Kontrolinių bandinių priimtumo kriterijų neatitinkantys riktai turėtų būti pažymėti. Išgyvenamumo duomenis reikėtų pateikti kaip procentinę dalį pagal kartotinius bandinius ir koncentracijos vertes. Kontrolinių bandinių tinkamumo kriterijų neatitinkantys riktai turėtų būti pažymėti;
 - aiškiai nurodyti atskirų stebimų vertinamųjų baigčių rezultatai: embrionų išgyvenamumo ir išsiritimo sėkmė; išoriniai nenormalios išvaizdos požymiai; ilgis ir masė; VTG matavimai (ng/g homogenato, ng/ml plazmos arba ng/mg kepenų); gonadų histologija, lyčių santykis, genetinių lyčių duomenys; visų žuvų neįprastų reakcijų atvejų dažnumas ir bandomosios cheminės medžiagos sukelti matomi poveikiai.
62. Rezultatus reikėtų pateikti kaip vidutines vertes $\pm$ standartinis nuokrypis (SD) arba standartinė paklaida (SE). Statistinius duomenis reikėtų pateikti bent pagal NOEC ir LOEC, nurodant pasiklioavimo intervalus. Reikėtų laikytis statistinio apdorojimo schemas (8 priedėlis).

NUORODOS

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors“, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“, *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.

- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction“, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*“, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“, *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone“, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), *Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish*, *Sexual Development* 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*“, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.

- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations“, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake“, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C. R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)“, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)“, *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development“, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Šio priedo C.14 skyrius. Žuvų mailiaus augimo bandymas.
- (35) Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Šio priedo C.37 skyrius. 21 dienos trukmės žuvų tyrimas. Trumpalaikis estrogeninio bei androgeninio veikimo ir aromatazės slopinimo atrankos tyrimas.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*“ *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
 - (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
 - (44) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33.
-

1 priedėlis

Santrumpos ir apibrėžtys

Apikalinė vertinamoji baigtis – sukelianti poveikį populiacijos lygiu

ASV – soties ore vertė

Biologinis žymuo – sukeliantis poveikį individo lygiu

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys

Dph – dienos po išsiritimo

DMY – Y specifinis DM domeno genas, kurio reikia medaka rūšies žuvų patinams vystytis

ELISA – fermentų absorbcijos imunocheminis tyrimas (imunofermentinė analizė)

Žuvies masė – žuvies šlapio kūno masė (sausai nušluostyto filtravimo popieriumi)

FSDT – žuvų lytinio vystymosi bandymas

HPG ašis – pagumburio-hipofizės-gonadų ašis

Hermafroditinė žuvis – žuvis su daugiau kaip vienu ovocitu sėklidėje, išanalizavus 6 pjūvius, arba su spermatogoninėmis ląstelėmis kiaušidėse (taip/ne)

Įkrovos dydis – šlapios žuvies masė vandens tūrio vienetui

MOA – veikimo būdas

RT-PCR – atvirkštinės transkriptazės polimerazės grandininė reakcija

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Nediferencijuota žuvis – žuvis, kurios gonados neturi įžiūrimų lytinių ląstelių.

VTG – vitelogeninas

2 priedėlis

FSDT bandymo sąlygos (gėlavandenės rūšys)

1. Rekomenduojamos rūšys	Japoninė medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrinė danija (<i>Danio rerio</i>)	Trispyglė dyglė (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Bandymo tipas	Pratekėjimo ar pusiau statinis	Pratekėjimo ar pusiau statinis	Pratekėjimo ar pusiau statinis
3. Vandens temperatūra	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Apšvietimo kokybė	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)
5. Apšvieta	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)
6. Apšvietimo laikotarpiai	12–16 h šviesa, 8–12 h tamsa	12–16 h šviesa, 8–12 h tamsa	16 h šviesa, 8 h tamsa
7. Minimalus kameros tūris	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l
8. Bandymo tirpalų tūrio pakeitimas	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną
9. Bandymo organizmų amžius ekspozicijos pradžioje	Tik ką apvaisinti ikrai (ankstyvoji blastulės stadija)	Tik ką apvaisinti ikrai (ankstyvoji blastulės stadija)	Tik ką apvaisinti ikrai
10. Vienos apdorojimo koncentracijos ikrų skaičius	Ne mažesnis kaip 120	Ne mažesnis kaip 120	Ne mažesnis kaip 120
11. Bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)
12. Vienos apdorojimo koncentracijos kartotinių bandinių skaičius	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)
13. Maitinimo režimas	Gyvos <i>Artemia</i> , šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną	Specialus mailiaus maistas, gyvos <i>Artemia</i> , šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną	Gyvos <i>Artemia</i> , šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną

14. Aeravimas	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 60 % soties	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 60 % soties	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 70 % soties
15. Skiedimo vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo
16. Veikimo bandomąja chemine medžiaga trukmė	60 dienų po išsiritimo	60 dienų po išsiritimo	60 dienų po išsiritimo
17. Biologinės vertinamosios baigtys	Išsiritimo sėkmė, išgyvenamumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, genetinė lytis, lyčių santykis	Išsiritimo sėkmė, išgyvenamumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, lyčių santykis	Išsiritimo sėkmė, išgyvenamumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, lyčių santykis
18. Bandymo priimtumo kriterijai naudojant jungtinius kartotinius kontrolinius bandinius	Išsiritimo sėkmė > 80 %	Išsiritimo sėkmė > 80 %	Išsiritimo sėkmė > 80 %
	Išgyvenamumas po išsiritimo $\geq$ 70 %	Išgyvenamumas po išsiritimo $\geq$ 70 %	Išgyvenamumas po išsiritimo $\geq$ 70 %
	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 150 mg	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 75 mg	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 120 mg
	Ilgis (standartinis ilgis) > 20 mm	Ilgis (standartinis ilgis) > 14 mm	Ilgis (standartinis ilgis) > 20 mm
	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %

3 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

4 priedėlis

Rekomendacijos dėl bandymo koncentracijos verčių, paimtos iš C.14 bandymo metodo

Stulpelis (koncentracijos verčių tarp 100 ir 10 arba 10 ir 1 skaičius) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Stulpelyje galima pasirinkti trijų (ar daugiau) viena po kitos einančių koncentracijos verčių seką. Stulpelio (x) koncentracijų vidurio taškai pateikti stulpelyje (2x + 1). Išvardytos vertės gali būti išreikštos procentine tūrio ar masės koncentracija (mg/l ar µg/l). Vertės gali būti padaugintos ar padalytos iš 10, pakelto bet kuriuo laipsniu, jei reikia. 1 stulpelį galima būtų naudoti, jei buvo didelė toksiškumo lygio neapibrėžtis.

5 priedėlis

Zebrinės danijos, juodosios drūtagalvės rainės, trispyglės dyglės ir japoninės medakos mailiaus galvos ir uodegos homogenizavimo rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti procedūras, kurios taikomos prieš VTG koncentracijos kiekybinį nustatymą. Galima taikyti kitas procedūras, kurios užtikrina palyginamą VTG kiekybinį nustatymą. Vietoj VTG koncentracijos nustatymo galvos ir uodegos homogenate ją galima nustatyti kraujo plazmoje arba kepenyse.

Procedūra

1. Žuvis anestezuojama ir numarinama pagal bandymo aprašymą.
2. Žuvies galva ir uodega nupjaunamos pagal bandymo aprašymą. **Svarbu:** visus skrodimo įrankius ir pjaustymo lentą po kiekvienos atskiros žuvies apdorojimo reikėtų tinkamai plauti ir valyti (pvz., 96 % etanoliu), kad patelės arba paveikti patinai neužterštų VTG nepaveiktų patinų.
3. Kiekvienos žuvies kartu sudėtos galvos ir uodegos masė nustatoma mg tikslumu.
4. Pasvertos dalys dedamos į atitinkamus (pvz., 1,5 ml Ependorfo) mėgintuvėlius ir užšaldomos – 80 °C temperatūroje iki homogenizavimo pradžios arba iš karto homogenizuojamos ant ledo dviem plastikinėmis piestelėmis. (Galima taikyti kitus metodus, jei jie atliekami ant ledo ir gaunama vienalytė masė). **Svarbu:** mėgintuvėlius reikėtų tinkamai sunumeruoti, kad žuvies galvą ir uodegą būtų galima susieti su atitinkama liemens dalimi, naudojama gonadų histologijai.
5. Gavus vienalytę masę, įpilama ledu atšaldyto **homogenizavimo buferinio skysčio** (*), kurio kiekis 4–10 kartų didesnis už audinio masę (užrašomas praskiedimas). Toliau maišoma piestelėmis, kad būtų gautas vienalytis mišinys. **Svarbi pastaba:** kiekvienai žuviai naudojamos naujos piestelės.
6. Ėminiai laikomi ant ledo iki bus centrifuguojami 30 min 4 °C temperatūroje, esant 50 000 g.
7. Skysčio virš nuosėdų nuo 20 iki 50 µl (užrašomas tūris) porcijos pipete įpilamos į **mažiausiai du** mėgintuvėlius, pipetės galą panardinant žemiau riebalų sluoksnio paviršiuje ir atsargiai išsiurbiant skystį virš nuosėdų be riebalų arba nuosėdų frakcijų.
8. Mėgintuvėliai laikomi – 80 °C iki naudojimo.

(*) Homogenizavimo buferinis skystis:

50 mmol tris-HCl, pH 7,4; 1 % proteazės inhibitoriaus mišinio (Sigma): 12 ml tris-HCl, pH 7,4, + 120 µl proteazės inhibitoriaus mišinio (arba lygiaverčių proteazės inhibitorių mišinių).

TRIS: TRIS (tris(hidroksimetil)aminometanas) YPAČ GRYNAS (ICN)

Proteazės inhibitoriaus mišinys: iš Sigma (žinduolių audiniams). Produkto numeris **P 8340**.

Pastaba: homogenizavimo buferinis skystis turėtų būti naudojamas tą pačią dieną, kurią pagamintas. Naudojant dedamas ant ledo

6 priedėlis

Zebrinės danijos (*Danio rerio*) galvos ir uodegos homogenato vitelogenino kiekybinio nustatymo rekomendacijos (modifikuotas Holbech ir kt., 2001 metodas). galima taikyti kitas procedūras, kai naudojami homologiniai antikūnai, ir kitus etalonus

1. Mikrotitravimo plokštelės (sertifikuotos Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark), iš anksto padengtos 5 µg/ml zebrinės danijos lipovitellino anti-IgG atšildomos ir 3 kartus plaunamos plovimo buferiniu skysčiu (*).
2. Išgrynintas zebrinės danijos vitelogenino etalonas ⁽¹⁾ skiedžiamas skiedimo buferiniu skysčiu (**), kad būtų gauta 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 ir 20 ng/ml tirpalų serija, o ėminiai skiedžiami skiedimo buferiu mažiausiai 200 kartų (matricos efektui išvengti) ir užlašinami ant plokštelių. Imami du tyrimo kontroliniai mėginiai. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl. Įlašinama po du etalonų mėginius ir tris bandinių mėginius. Inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje ant purtyklės.
3. Plokštelės plaunamos 5 kartus plovimo buferiniu skysčiu (*).
4. Su dekstrano (pvz., AMDEX A/S, Denmark) grandine sujungtos HRP (krienų peroksidazės) ir antikūnų konjugatas skiedžiamas plovimo buferiniu skysčiu; faktinis skiedimas skiriasi priklausomai nuo partijos ir amžiaus. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl ir plokštelės 1 h inkubuojamos ant purtyklės kambario temperatūroje.
5. Plokštelės 5 kartus plaunamos plovimo buferiniu skysčiu (*), o plokštelių apačia kruopščiai nuvaloma etanolu.
6. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidino) plus (**). Plokštelė ant purtyklės apsaugoma nuo šviesos alavo folija ir stebimas spalvos atsiradimas.
7. Gavus kalibravimo kreivę, fermento aktyvumas slopinamas į kiekvieną duobutę įlašinant 150 µl 0,2 mol/l H₂SO₄.
8. Optinis tankis matuojamas esant 450 nm (pvz., *Molecular Devices Thermomax* plokštelių spektrofotometru). Duomenys analizuojami naudojant susijusią programinę įrangą (pvz., *Softmax*).

(*) Plovimo buferinis skystis:

PBS pradinis tirpalas (****)	500,0 ml
BSA (jaučio serumo albuminas)	5,0 g
Tween 20	5,0 ml

Nustatoma pH vertė lygi 7,3 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H₂O iki 5 l. Laikoma 4 °C.

(**) Skiedimo buferinis skystis:

PBS pradinis tirpalas (****)	100,0 ml
BSA	3,0 g
Tween 20	1,0 ml

Nustatoma pH vertė lygi 7,3 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H₂O iki 1 l. Laikoma 4 °C.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), grynintas pagal: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

(***) TMB plus yra naudoti paruoštas substratas, kurį gamina KemEnTec (Danija). Jis jautrus šviesai. Laikomas 4° C.

(****) PBS pradinis tirpalas

NaCl	160,0	g
KH ₂ PO ₄	4,0	g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	26,6	g
KCl	4,0	g

pH vertė pakoreguojama, kad būtų 6,8 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H₂O iki 2 l. Laikoma kambario temperatūroje.

7 priedėlis

Lyties ir gonadų stadijos nustatymui skirtų audinių pjūvių ruošimo rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti procedūras, atliekamas prieš histologinių pjūvių įvertinimą. Galima taikyti kitas procedūras, kurias taikant gaunami panašūs lyties ir gonadų stadijos nustatymo rezultatai.

Be kelių išimčių, japoninei medakai (JMD) ir zebrinei danijai (ZF) taikomos procedūros yra panašios.

Numarinimas, skrodimas ir audinių fiksavimas*Tikslai:*

1. Humaniškai numarinti žuvį.
2. Gauti reikiamus kūno masės ir matmenų duomenis.
3. Įvertinti antrinius lytinius požymius.
4. Išskirsti audinius VTG analizei atlikti.
5. Fiksuoti gonadas.

Procedūros:

1. Žuvis reikėtų numarinti prieš pat skrodimą. Todėl, jei nėra daug skrodėjų, vienu metu nereikėtų numarinti daug žuvų.
2. Graibšteliu žuvis paimama iš bandymo kameros ir transportavimo inde pernešama į skrodimo vietą.
3. Žuvis dedama į numarinimo tirpalą. Žuvis išimama iš tirpalo, kai ji nustoja kvėpuoti ir nereaguoja į išorinius dirgiklius.
4. Šlapia žuvis pasverama.
5. VTG analizės audinius galima ruošti, žuvį padėjus ant skrodimo mikroskopo stalo kamščiamedžio plokštės.
 - a. Zebrinės danijos galva nupjaunama iškart už krūtininio peleko, o uodega – iškart už nugarinio peleko.
 - b. Japoninės medakos pilvo ertmė atidaroma per atsargiai padarytą įpjovą, kuri eina išilgai pilvo vidurio linijos nuo krūtinės juostos iki pat priekinio išeinamosios angos taško. Kepenys atsargiai išimamos mažų pincetu ir žirkutėmis.
6. VTG analizei skirti bandiniai dedami į Ependorfo mėgintuvėlius ir nedelsiant užšaldomi skystame azote.
7. Skerdena su gonadomis dedama į iš anksto paženklintą plastikinę audinių kasetę, kuri perkeliama į Davidsono ar Bouin fiksatorių. Fiksatoriaus tūris turėtų būti ne mažiau kaip 10 kartų didesnis nei apytikriai apskaičiuotas audinių tūris. Indas su fiksatoriumi švelniai purtomas penkias sekundes, kad iš kasetės būtų pašalinti oro burbuliukai.
8.
 - a. Visi audiniai paliekami Davidsono fiksatoriuje per naktį ir kitą dieną pernešami į atskirus indus su 10 % formalino neutraliame buferiniame tirpale. Indai su kasetėmis švelniai purtomi 5 sekundes, kad būtų užtikrintas reikiamas formalino įsiskverbimas į kasetes.
 - b. Audiniai paliekami Bouin fiksatoriuje 24 h, po to perkeliama į 70 % etanolį.

Audinio apdorojimas

Tikslai:

1. Dehidratuoti audinį, kad į jį galėtų tinkamai įsiskverbti parafinas.
2. Impregnuoti audinį parafinu, kad būtų užtikrintas audinio vientisumas ir gautas tvirtas paviršius mikrotomijai atlikti.

Procedūros:

3. Paženklintos audinių kasetės išimamos iš formalino ar etanolio talpyklų ir pernešamos į apdorojimo krepšį (-ius). Apdorojimo krepšys dedamas į audinių apdorojimo įtaisą.
4. Pasirenkamas apdorojimo režimas.
5. Audinių apdorojimo įtaisui baigus apdorojimo ciklą, krepšį (-ius) galima pernešti į įliejimo įrenginį.

Įliejimas

Tikslas:

Tinkamai orientuoti mėginį sustingusiame parafine, kad būtų galima atlikti mikrotomiją.

Procedūros:

1. Kasečių krepšys (-iai) išimamas (-i) iš apdorojimo įtaiso ir panardinamas (-i) į parafinu pripildytą įliejimo įrenginio terminio skyriaus priekinę kamerą arba kasetės dedamos į atskirą parafino šildymo įtaisą.
2. Pirmą įliejimui skirtą kasetę išimama iš terminio skyriaus priekinės kameros arba iš parafino šildymo įtaiso. Kasetės dangtis nuimamas ir išmetamas, o kasetės etiketė tikrinama pagal užrašus apie kiekvieną gyvūną, kad prieš įliejant neliktų galimų nesutapimų.
3. Pasirenkama reikiamų matmenų įliejimo forma.
4. Forma statoma po dozavimo įrenginio snapeliu ir pripildoma išlydyto parafino.
5. Bandinys išimamas iš kasetės ir dedamas į išlydyto parafino pripildytą formą. Tai kartojama su 4–8 kiekvienos parafino liejimo formos mėginiais. Atskiros žuvies padėtis pažymima žuvį nr. 1 dedant 180 laipsnių kampą 2–4/8 žuvų atžvilgiu.
6. Įpilama papildomai parafino mėginiui uždengti.
7. Forma su kasetės pagrindu dedama ant šildymo įrenginio plokštės.
8. Parafinui sukietėjus, blokas (t. y. sukietėjęs parafinas su audiniais ir kasetės pagrindu) išimamas iš formos.

Mikrotomija

Tikslas:

Išpjauti ir uždėti dažymui skirtus histologinius pjūvius.

Procedūros:

1. Pradinis mikrotomijos tarpsnis, vadinamas „apdaila“, atliekamas taip:
 - a. Parafino blokas dedamas į mikrotomo griebtuvą.
 - b. Griebtuvas stumiamas į priekį, sukant mikrotomo ratą, ir storos dalys pjaustomos nuo bloko parafino paviršiaus tol, kol peilis pasiekia lietus audinius.

- c. Mikrotomo pjūvio storis nustatomas nuo 3 iki 5 mikronų. Griebtuvas stumiamas į priekį ir iš bloko pjaunama daug pjūvių, kad būtų pašalinti visi artefaktai, susidarę audinio pjūvio paviršiuje grubaus pjaustymo metu.
 - d. Bloką galima išimti iš griebtuvo ir padėti priekiniu paviršiumi žemyn ant ledo, kad audinys įmirkėtų.
2. Kitas mikrotomijos tarpsnis – galutinis pjovimas ir audinių pjūvių padėjimas ant objektinių stiklelių. Šios procedūros atliekamos taip:
- a. Jei blokas buvo padėtas ant ledo, jis paimamas nuo ledo ir įstatomas atgal į mikrotomo griebtuvą.
 - b. Mikrotomo pjūvio storis nustatomas nuo 3 iki 5 mikronų ir griebtuvas stumiamas į priekį, sukant mikrotomo ratą. Pjūviai pjaunami iš bloko tol, kol gaunama „juosta“, turinti bent vieną priimtina gonadų turintį pjūvį. (Prireikęs pjaunamas blokas gali būti išimtas iš griebtuvo, padėtas ant ledo, kad audinys įmirkėtų, ir vėl įstatytas į griebtuvą).
 - c. Pjūviai padedami ant vandens paviršiaus vandens vonioje. Stengiamasi gauti nors vieną pjūvį, ant kurio nebūtų raukšlių ir po juo pagautų oro burbuliukų.
 - d. Po geriausiu pjūviu panardinamas mikroskopo objektinis stiklis ir ant jo pjūvis iškeliamas iš vandens. Šis procesas vadinamas pjūvio uždėjimu ant objekcinio stiklelio.
 - e. Žuvų grupei paruošiami trys pjūviai. Antrasis ir trečiasis pjūviai paimami 50 mikronų tarpais nuo pirmojo pjūvio. Jei žuvis su savo gonadomis nėra įlietus tame pačiame pjovimo lygyje, turi būti daroma daugiau pjūvių, siekiant užtikrinti, kad kiekvienai žuviai būtų gauti ne mažiau kaip šeši pjūviai su gonadomis.
 - f. Objektinių stiklelių žymekliu ant stiklelio užrašomas pjūvio bloko numeris.
 - g. Objektinis stiklis dedamas į dažymo laikiklį.
 - h. Blokas išimamas iš griebtuvo ir padedamas saugoti priekiniu paviršiumi žemyn.

Dažymas, dengiamojo stiklelio uždėjimas ir objekcinio stiklelio ženklėjimas

Tikslai:

- Nudažyti histopatologiniam tyrimui skirtus pjūvius.
- Visam laikui užsandarinti uždėtus ir nudažytus pjūvius.
- Visam laikui pažymėti nudažytus pjūvius taip, kad būtų užtikrintas visiškas jų atsekamumas.

Procedūros:

1. Dažymas

- a. Prieš dažant objektiniai stikleliai pernakt džiovinami.
- b. Pjūviai dažomi hematoksilinu ir eozinu.

2. Dengiamojo stiklelio uždėjimas

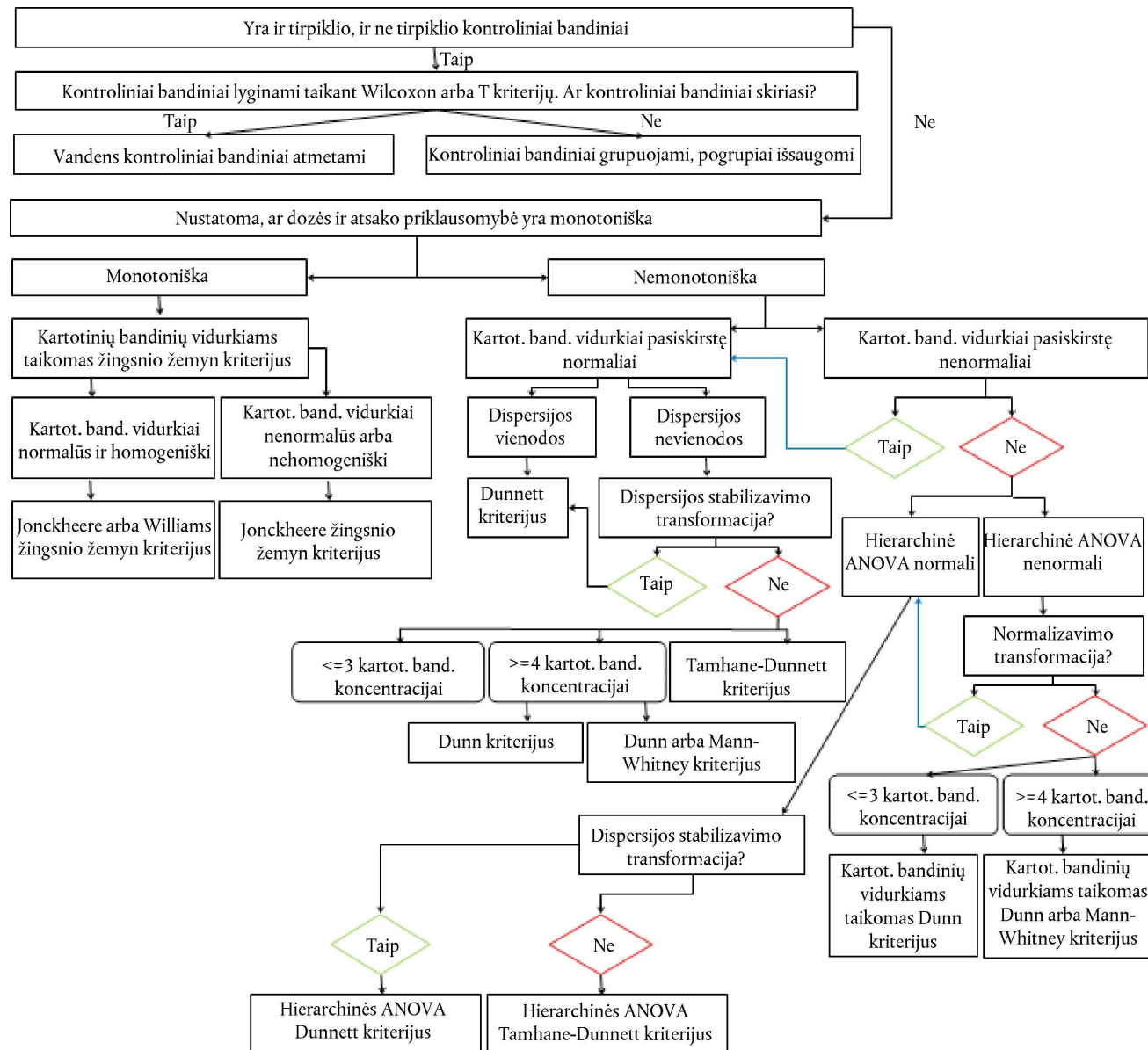
- a. Dengiamąjį stiklį galima uždėti rankiniu būdu arba automatiškai.
- b. Stiklis įmerkiamas į ksileną ar TissueClear ir ksileno ar TissueClear perteklius švelniai nukratomas nuo stiklelio.
- c. Arti objekcinio stiklelio nematinio galo ar ant dengiamojo stiklelio užlašinama maždaug 0,1 ml uždėjimo terpės.
- d. Dengiamasis stiklis pakreipiamas mažu slydimo kampu ir uždedamas ant objekcinio stiklelio.

3. Ženklinimas

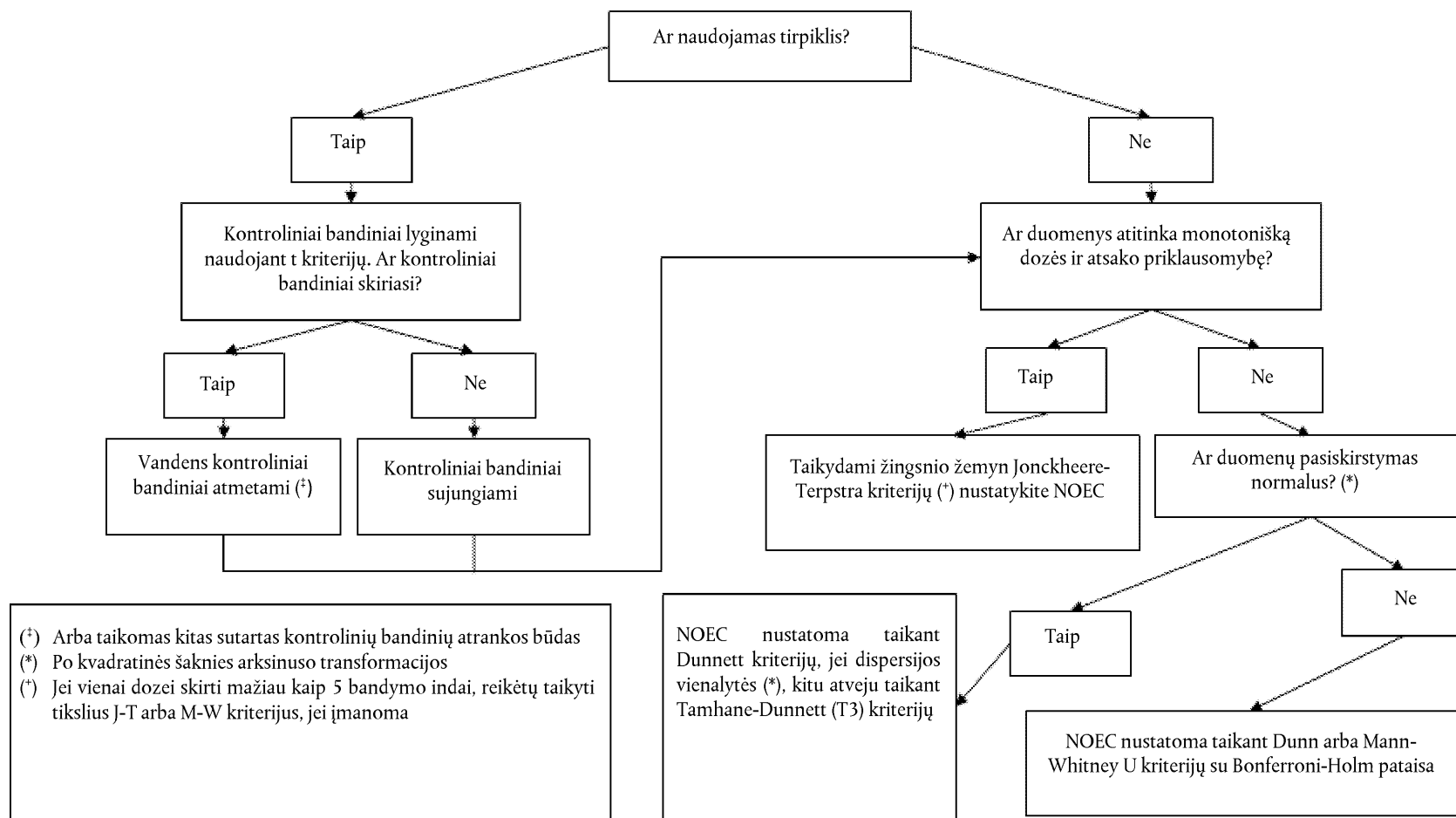
e. Kiekvieno objektinio stiklelio etiketėje turėtų būti ši informacija.

- i. Laboratorijos pavadinimas
 - ii. Rūšis
 - iii. Bandinio nr. / Objektinio stiklelio nr.
 - iv. Cheminė medžiaga / bandomoji grupė
 - v. Data
-

Vitelogenino analizės statistinio tyrimo schema



Lyčių santykio analizės statistinio tyrimo schema



9 priedėlis

Genetinės lyties nustatymui PCR metodu skirtų audinių ėminių ėmimo rekomendacijos**Audinių ėminių ėmimas, paruošimas ir laikymas prieš nustatant medakų genetinę lytį PCR metodu (parengė „Bayer CropScience AG“ vandens organizmų laboratorija)**

1. Kiekvienos atskiros žuvies analinis ir nugarinis pelekai nupjaunami žirkutėmis ir dedami į mėgintuvėlį su 100 µl 1 ekstrakavimo buferinio skysčio (informacija apie buferinio skysčio ruošimą pateikta toliau). Žirkutės nuvalomos po kiekvienos atskiros žuvies jas įmerkiant į stiklinę su distiliuotu H₂O ir nusausinamos popierine servetėle.
2. Paskui pelekų audiniai homogenizuojami mikromėgintuvėlių teflonine piestele ląstelių lizei atlikti. Kiekvienam mėgintuvėliui naudojama kita piestelė, kad nepatektų teršalų. Piestelės laikomos per naktį 0,5 mol/l NaOH, plaunamos 5 min distiliuotu H₂O ir iki kito karto laikomos etanolyje arba steriliai po apdorojimo autoklave.
3. Pelekų audinį taip pat galima laikyti nenaudojant 1 ekstrakavimo buferinio skysčio, bet audinį dedant ant sausojo ledo ir tada į -80 °C šaldytuvą, kad būtų išvengta DNR irimo. Vis dėlto ekstrakavimas veikia geriau, jei DNR būtų ekstrahuota tuo pačiu metu (apie apdorojimą žr. pirmiau; ėminus po laikymo – 80 °C reikėtų atšildyti ant sausojo ledo prieš įpilant buferio į mėgintuvėlius).
4. Po homogenizavimo visi mėgintuvėliai dedami į vandens vonią ir virinami 15 min 100 °C temperatūroje.
5. Paskui į kiekvieną mėgintuvėlį pipete įlašinama 100 µl 2 ekstrakavimo buferinio skysčio (informacija apie buferinio skysčio ruošimą pateikiama toliau). Ėminiai 15 min laikomi kambario temperatūroje, tuo pačiu metu juos švelniai purtant ranka.
6. Toliau visi mėgintuvėliai dar kartą dedami į vandens vonią ir virinami 15 min 100 °C temperatūroje.
7. Iki paskesnės analizės mėgintuvėliai laikomi užšaldyti – 20 °C.

Buferinio skysčio ruošimas**1 PCR buferinis skystis:**

500 mg N-lauroilsarkozino (pvz., Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5 mol/l NaCl

įpilama 100 ml distiliuoto H₂O

→ apdorojama autoklave

2 PCR buferinis skystis:

20 g Chelex dervos (pvz., Biorad, Munich, GE)

Brinkinama 100 ml distiliuoto H₂O

→ apdorojama autoklave

Medakų genetinės lyties nustatymas (PCR metodu) (parengė Bayer CropScience AG vandens organizmų laboratorija ir Universität Würzburg Biozentrum)

Paruošti ir užšaldyti mėgintuvėliai (aprašyti pirmiau pateiktame skyriuje) atšildomi ant ledo. Tada jie centrifuguojami Ependorfo centrifuga (30 s, maksimaliu greičiu, kambario temperatūroje). Taikant PCR, naudojamas nuo nuosėdų atskirtas skaidrus skystis. Būtina užtikrinti, kad Chelex (susikaupusio nuosėdose) pėdsakų nepatektų į PCR, nes tai sutrukdytų Taq polimerazės aktyvumą. Skystis virš nuosėdų gali būti naudojamas iškart arba užšaldomas (-20 °C) ir prieš vėliau atliekamą analizę gali būti atšildomas kelis ciklus be neigiamo poveikio DNR.

1. „Reakcijos mišinio“ ruošimas (25 µl ėminiui):

	Tūris	Galutinė koncentracija
Matricos DNR	0,5 µl-2 µl	
10 × PCR buferinio skysčio su MgCl ²	2,5 µl	1 ×
Nukleotidai (kiekvieno dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mmol)	200 µmol
Tiesioginis pradmuo (10 µmol) (žr. toliau 3–5)	0,5 µl	200 nmol
Atvirkštinis pradmuo (10 µmol) (žr. toliau 3–5)	0,5 µl	200 nmol
DMSO	1,25 µl	5 %
Vanduo (PCR markės)	iki 25 µl	
Taq E polimerazė	0,3 µl	1,5 U

10 × PCR buferinio skysčio su MgCl₂: 670 mmol Tris/HCl (pH 8,8, 25 °C), 160 mmol (NH₄)₂SO₄, 25 mmol MgCl₂, 0,1 % Tween 20

Kiekvienai PCR (žr. toliau 3–5) būtinas specialus pradmuo, kaip naujas „reakcijos mišinio“ ir matricos DNR kiekvienam ėminiui atitinkamo kiekio derinys (žr. pirmiau). Atitinkami tūriai įlašinami pipete į naujus mėgintuvėlius. Po to visi mėgintuvėliai uždaromi, maišomi (maždaug 10 s) ir centrifuguojami (10 s kambario temperatūroje). Dabar galima paleisti atitinkamas PCR programas. Papildomai kiekvienoje PCR programoje naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys (pavyzdinis žinomo aktyvumo ir aiškių rezultatų DNR bandinys) ir neigiamas kontrolinis bandinys (1 µl distiliuoto H₂O).

2. Agarozės gelio (1 %) paruošimas, veikiant PCR programoms:

- 3 g agarozės ištirpinama 300 ml 1 × TAE buferio (1 % agarozės gelis);
- šis tirpalas virinamas mikrobangų krosnelėje (maždaug 2–3 min);
- karštas tirpalas supilamas į specialią ant ledo padėtą liejimo formą;
- maždaug po 20 min agarozės gelis paruoštas naudoti;
- Agarozės gelis laikomas 1 × TAE buferyje iki PCR programų pabaigos.

3. Aktinų PCR programa:

Šios PCR reakcijos tikslas – įrodyti, kad bandinio DNA nepažeista.

- Specialus pradmuo:

„Mact1(upper/forward)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(lower/reverse)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (35 kartus):

Denatūravimas → 45 s, 95 °C

Renatūravimas → 45 s, 56 °C

Ilginimas → 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

4. X ir Y genų PCR programa:

Šioje PSR programoje naudojami bandiniai su nepažeista DNR, kad būtų aptikti X ir Y genai. Patinų DNR turėtų turėti dvigubą juostą, o patelių DNR – viengubą juostą (po dažymo ir gelelektroforezės). Taikant šią programą, reikėtų įtraukti vieną teigiamą patinų kontrolinį bandinį (XY bandinys) ir vieną patelių (XX bandinį).

— Specialus pradmuo:

„PG 17.5“ (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6“ (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (40 kartų):

Denatūravimas → 45 s, 95 °C

Renatūravimas → 45 s, 55 °C

Ilginimas → 1 min 30 s, 68 °C

15 min, 68 °C

5. Y geno PCR programa, kaip X ir Y genų „kontrolinė“ PCR programa:

Šia programa tikrinami „X ir Y genų PCR programos“ rezultatai. „Patinų“ turėtų rodyti vieną juostą, o „patelių bandiniai“ – jokios juostos (po dažymo ir gelelektroforezės).

— Specialus pradmuo:

„DMTYa (upper/forward)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (40 kartų):

Denatūravimas → 45 s, 95 °C

Renatūravimas → 45 s, 56 °C

Ilginimas → 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

6. PCR bandinių dažymas:

Dažiklio tirpalas:

50 % glicerolio

100 mmol EDTA

1 % SDS

0,25 % bromfenolio mėlynojo

0,25 % ksilencianolio

Į kiekvieną atskirą mėgintuvėlį pipete įlašinama 1 µl dažiklio tirpalo

7. Gelelektroforezės pradžia:

— paruoštas 1 % agarozės gelis supilamas į gelelektroforezės kamerą, pripildytą 1 × TAE buferio;

— 10–15 µl kiekvieno dažyto PCR bandinio pipete įlašinama į agarozės gelio plyšį;

- į atskirą plyšį pipete įlašinama 5–15 µl 1kb žymens (Invitrogen);
- pradedama elektroforezė, esant 200 V;
- baigiama po 30–45 min.

8. *Juostų nustatymas:*

- agarozės gelis plaunamas distiliuotu H₂O;
 - agarozės gelis 15–30 min pernešamas į etidžio bromidą;
 - daroma agarozės gelio nuotrauka UV šviesoje;
 - galiausiai bandiniai analizuojami teigiamo kontrolinio bandinio juostos (juostų) ir žymens atžvilgiu.
-

10 priedėlis

Genetinės lyties nustatymui PCR metodu skirtų trispyglės dyglės audinių ėminių ėmimo rekomendacijos**Audinių ėminių ėmimas ir DNR ekstrahavimas**

DNR galima ekstrahuoti naudojant daugelį prekyboje esančių reagentų ir rankinio bei automatinio valdymo ekstrahavimo sistemas. Toliau aprašytas Cefas Weymouth laboratorijoje taikomas protokolas, o prireikus įtraukiami kiti alternatyvūs metodai.

1. Žirklutėmis iš dorsolateralinės srities (nupjovus galvą ir uodegą VTG analizei), išpjauamas mažas (10–20 mg) kiekvienos atskiros žuvies gabaliukas. Audinys įdedamas į mėgintuvėlį ir iš karto dedamas į skystąjį azotą (kad būtų laikomas – 80 °C) arba užpilamas 70 % etanolio (transportuoti ir vėliau laikyti 4 °C temperatūroje). Žirklutės nuvalomos po kiekvienos atskiros žuvies 70 % etanolio, paskui distiliuotu H₂O ir nusausinamos popierine servetėle.
2. Etanolis (jei yra) nusiurbiamas, o audinys skaidomas per naktį proteinaze K 400 µl ATL buferinio skysčio (Qiagen). Alikvotinė hidrolizato (200 µl) dalis pernešama į 96 duobučių S bloką (Qiagen) ir DNR ekstrahuojama taikant 96 duobučių formatą ir naudojant Qiagen Universal BioRobot sistemą bei Qlamp Investigator BioRobot rinkinį. DNR išplaunama 50 µl DNazės ir RNazės neturinčio vandens. Jei DNR ekstrahuojama iš kietųjų audinių (pvz., dyglio ar krūtininio peleko), ėminių gali tekti homogenizuoti lizės buferiniame skystyje, naudojant FastPrep® audinių skaidymo įrenginį arba lygiavertę audinių skaidymo sistemą.

Arba

- (a) audinys skaidomas per naktį proteinaze K 400 µl G2 lizės buferinio skysčio (Qiagen) ir DNR ekstrahuojama iš 200 µl hidrolizato, naudojant EZ-1 DNA easy tissue rinkinį ir EZ-1 biorobot įrenginį arba DNA easy tissue mini kit rinkinį. DNR išplaunamas į 50 µl tūrį.
 - (b) Audiniai apdorojami naudojant DNAzol reagentą. Trumpai tariant, audinio ėminiai 10 min skaidomi 1ml DNAzol reagento 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje ir hidrolizatas 5 min centrifuguojamas 13 000 aps/min greičiu, kad būtų pašalintos visos kietosios dalelės. Paskui tirpalas supilamas į kitą 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį su 500 µl 100 % molekulinės biologijos markės etanolio ir 10 min centrifuguojamas 13 000 aps/min, kad būtų nusodinta DNR. Etanolis pašalinamas ir pakeičiamas 400 µl 70 % molekulinės biologijos grynumo etanolio, tirpalas 5 min centrifuguojamas 13 000 aps/min greičiu ir DNR nuosėdos ištirpinamos 50 µl 50 µl DNazės ir RNazės neturinčio vandens. Be to, kai naudojami kietieji audiniai (krūtininis pelekas), prieš DNR ekstrahavimą ėminių gali tekti homogenizuoti lizės buferiniame skystyje, naudojant FastPrep® audinių skaidymo įrenginį arba lygiavertę audinių skaidymo sistemą.
3. DNR laikoma – 20 °C iki jos prireiks.

Svarbi pastaba: atliekant procedūras, būtina mūvėti pirštines.

Polimerazės grandininės reakcijos (PCR) analizė

Amplifikacija buvo atliekama naudojant 2,5 µl DNR ekstrakto 50 µl reakcijos tūryje ir Idh (izocitrato dehidrogenazės) lokuso pradmenis (kaip aprašyta Peichel ir kt., 2004, Current Biology 1:1416-1424):

Tiesioginis pradmuo 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Atvirkštinis pradmuo 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Yra daug tinkamų PCR reagentų tiekėjų. Toliau aprašytas metodas šiuo metu taikomas Cefas Weymouth laboratorijoje.

1. Reakcijos mišinio ruošimas (50 µl bandiniui):

Pradinis mišinys ruošiamas taip. Jį galima ruošti iš anksto ir laikyti užšaldytą – 20 °C iki prireiks. Pradinio mišinio ruošama pakankamai, kad užtektų neigiamiems kontroliniams bandiniams (tik molekulinės biologijos grynumo vanduo).

	Tūris (pradinė koncentracija)/ bandiniui	Galutinė koncentracija
5 × GoTaq® reakcijos buferiai	10 µl	1 ×
MgCl ₂	5 µl (25 mmol)	2,5 mmol
Nukleotidai (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (kiekvieno 25 mmol)	250 µmol kiekvieno
Tiesioginis pradmuo	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Atvirkštinis pradmuo	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Molekulinės biologijos grynumo vanduo	30,75 µl	
GoTaq polimerazė	0,25 µl	1,25 U

- Įlašinama 47,5 µl į paženklintą 0,5ml plonasienį PCR mėgintuvėlį.
- Į atitinkamai paženklintą mėgintuvėlį įpilama 2,5 µl grynintos DNR. Kartojama su visais bandiniais ir neigiamu kontroliniu bandiniu.
- Ant viršaus užlašinami 2 lašai mineralinės alyvos. Arba naudojamas termoblokas su šildomu dangčiu.
- Dangčiai uždengiami.
- Bandiniai buvo denatūruojami 5 min Peltier PTC-225 termobloke 94 ± 2 °C, paskui atliekami 39 ciklai 94 ± 2 °C, 1 min, 55 ± 2 °C, 1 min, 72 ± 2 °C 1 min ir galutinis ilginimas 72 ± 2 °C, 10 min.

2. Agarozės gelio (2 %) paruošimas:

Paprastai PCR produktai atskiriami naudojant 20 % agarozės gelį, turintį etidžio bromido.

Taip pat galima naudoti kapiliarinės elektroforezės sistemas.

- Pasveriamas 2 g agarozės į 100 ml 1 × TAE buferinį skystį;
- Kaitinama mikrobangų krosnelėje (maždaug 2–3 min), kad agarozė ištirptų.
- Įlašinami 2 lašai etidžio bromido, kad galutinė koncentracija būtų 0,5 µg/ml
- Karštas tirpalas supilamas į gelio stingimo įrangą.
- Gelis paliekamas sukietėti

3. Elektroforezė:

- Agarozės gelis supilamas į elektroforezės įrangą ir įpilama 1 × TAE buferio
- 20 µl kiekvieno bandinio įlašinama į atskirą duobutę, o į atsarginę duobutę įpilama molekulinės masės žymens (100bp DNA ladder, Promega).
- Elektroforezė atliekama 30–45 min, esant 120 V.

4. Amplifikavimo produktų vaizdo gavimas

Jei, kaip aprašyta pirmiau, į agarozės gelį buvo įpilta etidžio bromido, DNR produktai stebimi po UV šviesos šaltiniu. Arba agarozės gelis dažomas ant jo užpilant praskiesto etidžio bromido tirpalo (0,5 µg/ml vandens), kad po 30 min būtų galima stebėti vaizdą.

11 priedėlis

Trispyglės dyglės dirbtinio apvaisinimo procedūros rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti žuvų lytinio vystymosi bandymui skirtų trispyglės dyglės apvaisintų ikrų gavimo procedūras.

Procedūros*Patinų spermos gavimas*

1. Numarinamas reikiamos populiacijos tinkamos spalvos patinas.
2. Sėklidės išpjauamos iš abiejų žuvies pusių. *Paprastai sėklidės yra ryškios spalvos pailgos formos struktūros, nesunkiai pastebimos kūno šoninėje vidurio linijoje.* Taikomas vienas iš šių metodų:
3. Žirkliutėmis pradedama pjauti nuo kloakos ir padaroma viena 1–1,5 cm įpjova maždaug 45 laipsniu kampų.
4. Skalpelio daroma maža įpjova žuvies šone šiek tiek už pilvo ertmės ir vos prieš šonines plokšteles.
5. Sėklidės išimamos mažu pincetu ir dedamos į Petri lėkštelę.
6. Ant kiekvienos sėklidės užpilama 100 µl naujai pagaminto **Hanko galutinio tirpalo (*)**.
7. Sėklidės skustuvu arba skalpeliu supjaustomos į mažus gabaliukus. Taip išsiskiria sperma ir Hanko tirpalas įgauna balkšvą spalvą.
8. Skystis su sperma supilamas į mėgintuvėlį taip, kad į pipetę nepakliūtų jokių sėklidės gabaliukų.
9. Į mėgintuvėlį įpilama 800 µl Hanko galutinio tirpalo ir gerai sumaišoma.
10. Prireikus patinus galima konservuoti, fiksuojant 100 % etanolyje arba kitame reikiamame fiksatoriuje. Tai ypač svarbu, jei tyrimu nustatoma palikuonių tėvų kilmė.

(*) Hanko buferinis druskų tirpalas (HBSS):

HBSS būtinas spermai konservuoti ruošiantis apvaisinimui.

Svarbi pastaba: nors daugumą reikiamų pradinių tirpalų galima ruošti iš anksto, **5 pradinį tirpalą** ir vėliau **galutinį tirpalą** reikėtų gaminti **iš naujo, tą dieną, kai jis bus naudojamas.**

1 pradinis tirpalas

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Distiliuotas vanduo (DV)	100 ml

2 pradinis tirpalas

Na ₂ HPO ₄ (bevandenis)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DV	100 ml

3 pradinis tirpalas

CaCl ₂	0,72 g
DV	50 ml

4 pradinis tirpalas

MgSO₄ · 7H₂O 1,23 g

DV 50 ml

5 pradinis tirpalas (naujai paruoštas)

NaHCO₃ 0,35 g

DV 10 ml

Pastaba: turint kai kurių iš pirmiau nurodytų druskų, bet su skirtingu vandens kiekiu (t. y. 2H₂O vietoj bevandenės druskos), jas vis dar galima naudoti, tačiau iš pradžių reikia pakoreguoti masę pagal molekulinę masę).

Hanko galutinis tirpalas gaunamas sumaišius tirpalus tokia tvarka:

1 pradinis tirpalas 1,0 ml;

2 pradinis tirpalas 0,1 ml;

3 pradinis tirpalas 0,1 ml;

DV 8,6 ml;

4 pradinis tirpalas 0,1 ml;

5 pradinis tirpalas 0,1 ml.

Prieš naudojant gerai sumaišoma.

Apvaisinimas

1. Nustatomos reikiamos populiacijos didelės ikringos patelės; jos pasiruošusios ikrų išspaudimui tik tada, kai matosi iš kloakos išlindę ikrai. Pasiruošusios patelės turi būdingą „pakeltos galvos“ laikyseną.
2. Pirštu arba nykščiu švelniai braukiama išilgai žuvies šono uodegos link, siekiant paskatinti ikrų masės išstūmimą į naują Petri lėkštelę. Pakartojama su kita puse ir žuvis grąžinama į savo indą.
3. Ikrus galima paskleisti (taip, kas būtų gautas vienas sluoksnius) mažu teptuku. Svarbu sperma apvaisinti kuo daugiau ikrų, ir tai galima padaryti kuo labiau padidinant ikrų paviršiaus plotą. Svarbi pastaba: ikrai laikomi drėgni, aplink juos padedant drėgną audinį (svarbu, kad ikrai tiesiogiai nesiliestų su vandeniu, nes ikrų apvalkalas gali per anksti sukietėti ir neleisti apvaisinti). Vienos patelės išleidžiamų ikrų skaičius labai skiriasi, bet vidutiniškai iš vienos ikringos patelės nesunkiai gaunama maždaug 150 ikrų.
4. 25 µl spermos Hanko mišinyje tolygiai paskleidžiama teptuku visu ikrų paviršiumi. Prasidėjus apvaisinimui, ikrai greitai (per minutę) sukietėja ir pakeičia spalvą. Jei įvertintas ikrų skaičius didesnis kaip 150, procedūra kartojama. Taip pat, jei ikrai nesukietėja per minutę, įdedama daugiau spermos. Svarbi pastaba: apvaisinimo laipsnis, įdėjus didesnį spermos kiekį, nebūtinai turi pagerėti.
5. Ikrus ir spermos tirpalą reikėtų palikti „sąveikai“ bent 15 min, o apvaisintus ikrus reikėtų įdėti į akvariumą, kuriame jie bus veikiami bandomąja medžiaga, praėjus 1,5 h po apvaisinimo.
6. Procedūra kartojama su kita patele tol, kol surenkamas reikiamas ikrų skaičius.
7. Keli ikrai iš paskutinės partijos paliekami atsargai ir fiksuojami 10 % acto rūgštyje.

Ikrų skaičiavimas ir paskirstymas į bandymo akvariumus

1. Ikrus reikėtų vienodai paskirstyti tarp visų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių, kad būtų išvengta genetinio poslinkio. Kiekviena apvaisintų ikrų partija turėtų būti padalyta į vienodo dydžio grupes (tiek, kiek yra bandomosios medžiagos koncentracijos verčių) buku įrankiu (t. y. plačiu entomologiniu pincetu arba naudojant bakteriologinę kilpą). Jei numatyta, kad vienai bandomosios medžiagos koncentracijai imami 4 kartotiniai bandiniai ir kiekviename bandinyje yra 20 ikrų, tuomet viename bandomajame akvariume reikia paskirstyti po 80 ikrų. Svarbi pastaba: patariama įdėti papildomai 20 % (t. y. 96 ikrus vienai bandomosios medžiagos koncentracijai), jei nesate tikri, kad gaunamas 100 % apvaisinimas.
2. Trispyglės dyglės ikrai tėvo saugomo lizdo išorėje gali greitai užsikrėsti grybeline infekcija. Dėl šios priežasties labai svarbu per pirmąsias 5 bandymo dienas visus ikrus apdoroti metileno mėliu. Ruošiamas 1 mg/ml pradinis metileno mėlio tirpalas ir įpilamas į ekspozicijos akvariumus, kad maksimali galutinė koncentracija būtų 2,125 mg/l. Svarbi pastaba: trispyglės dyglės po išsiritimo neturėtų būti veikiamos metileno mėliu, todėl nuo 6 dienos sistemoje jo neturėtų būti.
3. Ikrai apžiūrimi kasdien ir užrašoma, kiek yra žuvusių arba neapvaisintų ikrų. Svarbi pastaba: iki išsiritimo ikrai niekuomet, netgi labai trumpą laiką, neturėtų būti ne vandenyje.

C.42 BIOLOGINIS SKAIDUMAS JŪROS VANDENYJE**BENDRASIS ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 306 (1992). Kai buvo sukurti pirmieji bandymo metodai, nebuvo žinoma, koku laipsniu lengvo biologinio skaidumo atrankos bandymų rezultatai, sėjimo kultūra naudojant gėlą vandenį ir nuotėkas arba aktyvintąjį dumblą, galėtų būti taikomi jūros aplinkai. Šiuo klausimu buvo paskelbta įvairių rezultatų (pvz., (1)).
2. Daug pramoninių nuotėkų, turinčių įvairių cheminių medžiagų, patenka į jūrą, kai jos išleidžiamos tiesiogiai arba per upių žiotis ir upes, kuriose buvimo trukmė yra maža palyginti su laikotarpiu, būtinu daugelio esančių cheminių medžiagų visiškam biologiniam suskaidymui. Didėjant suvokimui, kad jūros aplinką būtina saugoti nuo vis didesnės cheminių medžiagų apkrovos ir kad būtina įvertinti galimą cheminių medžiagų koncentraciją jūroje, buvo sukurti biologinio skaidumo jūros vandenyje bandymo metodai.
3. Šiame dokumente aprašytiems bandymo metodams naudojamas natūralus jūros vanduo kaip vandeninė fazė ir kaip mikroorganizmų šaltinis. Siekiant atitikti lengvo biologinio skaidumo gėlame vandenyje metodus, buvo tiriamas ultrafiltruoto bei centrifuguoto jūros vandens ir jūros dugno nuosėdų kaip sėjimo kultūros naudojimas. Šie tyrimai buvo nesėkmingi. Todėl bandymo terpė yra natūralus jūros vanduo, kuris iš anksto apdorojamas, kad būtų pašalintos stambios dalelės.
4. Jei norima įvertinti visišką biologinį skaidumą taikant kratomos kolbos metodą, dėl ištirpusios organinės anglies (DOC) analizės metodo mažo jautrio turi būti naudojama palyginti didelė bandomosios medžiagos koncentracija. Dėl to į jūros vandenį būtina įdėti mineralinių mitybinių medžiagų (N ir P), nes kitaip dėl jų mažos koncentracijos ribojamas DOC šalinimas. Be to, taikant uždarnosios kolbos metodą, dėl įdėtos bandomosios medžiagos koncentracijos būtina įdėti mitybinių medžiagų.
5. Todėl metodai nėra lengvo biologinio skaidumo bandymai, nes be jūros vandenyje jau esančių mikroorganizmų papildomai nededama jokios sėjimo kultūros. Šie bandymai nemodeliuoja jūros aplinkos, nes dedama mitybinių medžiagų ir bandomosios medžiagos koncentracija yra labai didelė palyginti su koncentracija jūroje. Dėl šių priežasčių siūlomi metodai įtraukti į naują poskyrį „Biologinis skaidumas jūros vandenyje“.

TAIKYMAS

6. Bandymų, kurie būtų taikomi, nes dėl tiriamos cheminės medžiagos naudojimo pobūdžio ji patenka į jūrą, rezultatai pateikia pradinį biologinio skaidumo jūros vandenyje vaizdą. Jei rezultatas teigiamas ($> 70\%$ DOC pašalinimas; $> 60\%$ ThOD – teorinis deguonies suvartojimas), galima daryti išvadą, kad jūros aplinka turi biologinio skaidymo potencialą. Tačiau neigiamas rezultatas nereiškia, kad tokio potencialo nėra, bet rodo, kad būtina atlikti papildomą tyrimą, pvz., naudojant kuo mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.
7. Bet kuriuo atveju, jei reikia nustatyti geriau apibrėžtą biologinio skaidymo jūros vandenyje spartos arba laipsnio vertę tam tikroje konkrečioje vietoje, reikėtų taikyti sudėtingesnius ir tobulesnius, taigi ir brangesnius metodus. Pavyzdžiui, būtų galima taikyti modeliavimo bandymą, naudojant bandomosios medžiagos koncentraciją, kuri būtų artimesnė tikėtinos aplinkos koncentracijai. Taip pat galėtų būti naudojamas iš tiriamos vietos paimtas nepadidintos koncentracijos ir iš anksto neapdorotas jūros vanduo ir po pradinio biologinio skaidymo būtų galima atlikti specifinę cheminę analizę. Tiriant visišką biologinį skaidumą, reikėtų ^{14}C žymėtųjų cheminių medžiagų, kad būtų galima išmatuoti tirpios organinės medžiagos ^{14}C išnykimo ir $^{14}\text{CO}_2$ susidarymo spartą, esant realiai aplinkos koncentracijai.

METODŲ PASIRINKIMAS

8. Taikomas metodas pasirenkamas atsižvelgiant į kelis veiksnius; toliau pateikiama lentelė, kuri turėtų padėti pasirinkti. Nors kratomos kolbos metodu negali būti bandomos cheminės medžiagos, kurių ekvivalentinis tirpumas vandenyje yra mažesnis kaip 5 mg C/l , mažai tirpios cheminės medžiagos bent jau teoriškai gali būti bandomos uždarnosios kolbos metodu.

Lentelė.

Kratomos kolbos ir uždarnosios kolbos metodų privalumai bei trūkumai

METODAS	PRIVALUMAI	TRŪKUMAI
KRATOMA KOLBA	— paprasta aparatūra, išskyrus C analizatorių — 60 d trukmė nėra problema — nėra trukdžių dėl nitrifikavimo — gali būti pritaikytas lakiosioms cheminėms medžiagoms	— reikia turėti C analizatorių — naudojant 5–40 mg DOC/l, galėtų vykti inhibavimas — sunku nustatyti mažos koncentracijos DOC jūros vandenyje (chloridų poveikis) — kartais jūros vandenyje yra didelis DOC
UŽDAROJI KOLBA	— paprasta aparatūra — paprastas pabaigos nustatymas — naudojama mažos koncentracijos bandomoji medžiaga (2 mg/l), todėl mažesnė inhibavimo tikimybė — lengvai pritaikomas lakiosioms cheminėms medžiagoms	— gali būti sunku užtikrinti kolbų sandarumą orui — dėl ant sienelių augančių bakterijų gali būti gautos klaidingos vertės — gali būti didelės tuščiojo ėminio O₂ suvartojimo vertės, ypač po 28 dienų; tai galima būtų išspręsti sendinant jūros vandenį — O₂ suvartojimo dėl nitrifikavimo gali būti trukdžiai

KRATOMOS KOLBOS METODAS

ĮVADAS

1. Šis metodas yra modifikuoto EBPO atrankos bandymo, aprašyto šio priedo C.4B skyriuje (2), jūros vandeniui skirtas variantas. Jis buvo galutinai parengtas kaip Danijos vandens kokybės instituto Europos Komisijai (EB) atlikto tarplaboratorinio tyrimo rezultatas (3).
2. Kaip ir jūros vandeniui skirto uždarnosios kolbos metodo rezultatai, šio bandymo rezultatai neturi būti laikomi lengvo biologinio skaidumo rodikliais, bet turi būti naudojami konkrečiai, kai reikia gauti informaciją apie cheminių medžiagų biologinį skaidumą jūros aplinkose.

METODO PRINCIPAS

3. Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis ištirpinamas bandymo terpėje, kad būtų gauta 5–40 mg ištirpusios organinės anglies (DOC)/l koncentracija. Jei organinės anglies analizės jautrio ribos yra geresnės, gali būti naudinga naudoti mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją, ypač medžiagoms inhibitoriams. Bandomosios medžiagos tirpalas bandymo terpėje inkubuojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje ir maišomas aerobinėmis sąlygomis pastovioje temperatūroje (reguliuojamoje ± 2 °C tikslumu), kuri paprastai yra 15–20 °C intervale. Jei tyrimo tikslas yra aplinkos situacijų modeliavimas, bandymus galima atlikti už šio normalios temperatūros intervalo ribų. Rekomenduojama maksimali bandymo trukmė yra apie 60 dienų. Skaidymas stebimas DOC matavimais (visiškas suskaidymas) ir kai kuriais atvejais atliekama specifinė analizė (pradinis skaidymas).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Siekiant sužinoti, ar bandymas gali būti taikomas tam tikrai cheminei medžiagai, turi būti žinomos kai kurios jos savybės. Turi būti nustatytas medžiagos organinės anglies kiekis, jos lakumas turi būti toks, kad nebūtų reikšmingų nuostolių bandymo eigoje, ir jos tirpumas vandenyje turėtų būti didesnis nei 25–40 mg C/l ekvivalentas. Taip pat bandomoji cheminė medžiaga neturėtų reikšmingai adsorbuotis ant stiklinių paviršių. Reikia turėti duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykinę dalis, kad gautus rezultatus būtų galima aiškinti, ypač, kai rezultatas yra arti „atitikties“ lygio.

5. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą bakterijoms, pvz., išmatuotą atliekant trumpalaikius kvėpavimo greičio bandymus (4), gali būti naudinga renkantis tinkamas bandymo koncentracijos vertes, taip pat gali būti svarbi, kad būtų tinkamai paaiškintos mažos biologinio skaidumo vertės. Tačiau tokios informacijos ne visada pakanka, kad būtų paaiškinti biologinio skaidumo bandymų rezultatai, taigi labiau tinka 18 pastraipoje aprašyta procedūra.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

6. Jūros vandens ėminio mikrobiniui aktyvumui tikrinti turi būti naudojamos tinkamos etaloninės cheminės medžiagos. Natrio benzenkarboksilatų, natrio acetatas ir anilinas gali būti šiam tikslui tinkamų cheminių medžiagų pavyzdžiai. Etaloninių cheminių medžiagų skaidymo trukmė turi būti palyginti trumpa, priešingu atveju rekomenduojama bandymą kartoti su kitu jūros vandens ėminiu.
7. Atliekant EK tarplaboratorinį tyrimą, kai jūros vandens ėminiai buvo imami iš skirtingų vietų ir skirtingais metų laikais (3), natrio benzenkarboksilatui gautas eksponentinis tarpsnis (t_i) ir laikas, per kurį pasiekiamas 50 procentų skaidymas (t_{50}), atmetus eksponentinis tarpsnis, buvo atitinkamai nuo 1 iki 4 dienų ir nuo 1 iki 7 dienų. Anilino t_i – nuo 0 iki 10 dienų, o t_{50} – nuo 1 iki 10 dienų.

METODO ATKURIAMUMAS IR JAUTRIS

8. Metodo atkuriamumas buvo nustatytas atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3). Mažiausioji bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai metodas gali būti taikomas, atliekant DOC analizę, dažniausiai priklauso nuo organinės anglies analizės aptikimo ribos (šiuo metu apie 0,5 mg C/l) ir naudojamame jūros vandenyje ištirpusios organinės anglies koncentracijos (paprastai 3–5 mg/l atvirosios jūros vandens). DOC foninė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip maždaug 20 % suminės DOC koncentracijos, įdėjus bandomąją medžiagą. Jei tai neįmanoma, DOC foninė koncentracija kartais gali būti sumažinta prieš bandymą sendinant jūros vandenį. Jei metodas taikomas atliekant tik specifinę cheminę analizę (kai matuojamas tik pradinis skaidymas), tyrėjas, pateikdamas papildomos informacijos, turi dokumentais patvirtinti, ar galima tikėtis visiško suskaidymo. Šią papildomą informaciją gali sudaryti kitų lengvojo arba būdingojo biologinio skaidumo bandymų rezultatai.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

9. Įprastinė laboratorijos aparatūra ir:
 - a. Purtyklė, į kurią telpa 0,5–2 litrų kūginės kolbos, su automatiniu temperatūros reguliavimu arba naudojama patalpoje, kurios 15–20 °C pastovi temperatūra reguliuojama ± 2 °C tikslumu;
 - b. Siaurakaklės 0,5–2 litro kūginės kolbos;
 - c. Membraninio filtravimo aparatūra arba centrifuga;
 - d. Membraniniai filtrai, 0,2–0,45 μ m;
 - e. Anglies analizatorius;
 - f. Specifinės analizės įranga (neprivaloma).

Jūros vanduo

10. Jūros vandens ėminys paimamas į gerai išvalytą talpyklą ir vežamas į laboratoriją, pageidautina, per vieną ar dvi dienas nuo paėmimo. Vežant ėminį, jo temperatūra neturi pakilti gerokai aukščiau bandymo temperatūros. Ėminio ėmimo vieta tiksliai identifikuojama ir apibūdinama, atsižvelgiant į jos užterštumo ir mitybinių medžiagų būseną. Į šį apibūdinimą, ypač priekrantės vandenų, įtraukiamas heterotrofinių mikroorganizmų kolonijų skaičius ir ištirpusio nitrato, amonio ir fosfato koncentracijos nustatymas.

11. Apie patį jūros vandens ėminį pateikiama tokia informacija:
- ėmimo data;
 - ėmimo gylis;
 - ėminio išvaizda, drumstumas ir kt.;
 - temperatūra ėmimo metu;
 - druskingumas;
 - DOC;
 - vėlinimo tarp ėminio paėmimo ir jo bandymo trukmė.
12. Jei nustatoma, kad jūros vandens ėminio DOC kiekis yra labai didelis (8 pastraipa), prieš naudojant jūros vandenį rekomenduojama jį sendinti maždaug savaitę. Sendinama laikant aerobinėmis sąlygomis bandymo temperatūroje ir tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Jei būtina, aerobinės sąlygos užtikrinamos nestipriai aeruojant. Sendinant mažėja lengvai skaidomų organinių medžiagų kiekis. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3), nebuvo nustatyta skirtumo tarp sendintų ir naujai paimtų jūros vandens ėminių skaidumo potencialo. Prieš naudojant, atliekamas jūros vandens pradinis apdorojimas, kad būtų pašalintos stambios dalelės, pvz., filtruojama per nailono filtrą arba akytąjį popierinį filtrą (ne per membraninį arba stiklo pluošto filtrus), arba sedimentacijos ir dekantavimo būdu. Taikyta procedūra turi būti nurodyta ataskaitoje. Pradinis apdorojimas, jei naudojamas, atliekamas po sendinimo.

Mineralinių mitybinių medžiagų pradiniai tirpalai

13. Iš analiziškai grynų reagentų ruošiami šie pradiniai tirpalai:

(a) Kalio divandenilio ortofosfato, KH_2PO_4	8,50 g
Dikalio vandenilio ortofosfato, K_2HPO_4	21,75 g
Dinatrio vandenilio ortofosfato dihidrato, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
Amonio chlorido, NH_4Cl	0,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu	
(b) Kalcio chlorido, CaCl_2	27,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu	
(c) Magnio sulfato heptahidrato, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu	
(d) Geležies (III) chlorido heksahidrato, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu	

Nuosėdų susidarymo (d) tirpale galima išvengti įlašinant vieną lašą koncentruotos HCl arba įdedant 0,4 g etilendiamintetracto rūgšties (EDTA, dinatrio druskos) litrui. Jei pradiniame tirpale susidaro nuosėdos, jis keičiamas naujai paruoštu tirpalu.

Bandymo terpės ruošimas

14. Vienam litrui apdoroto jūros vandens įpilama po 1 ml kiekvieno iš pirmiau nurodytų pradinių tirpalų.

Sėjinys

15. Be mikroorganizmų, kurie jau yra jūros vandenyje, specialaus sėjinio nededama. Jūros vandens bandymo terpėje (taip pat pageidautina pradinuose jūros vandens ėminiuose) nustatomas (nebūtinai) kolonijas sudarančių heterotrofų skaičius, pvz., lėkštelės kolonijų skaičius, naudojant jūros dumblių agarą. Tai ypač pageidautina naudojant priekrantės arba užterštų vietų ėminius. Tikrinamas jūros vandens heterotrofų mikrobinis aktyvumas, atliekant bandymą su etalonine medžiaga.

Kolbų ruošimas

16. Reikia užtikrinti, kad visi stikliniai indai būtų kruopščiai išplauti, bet ne būtinai steriliai (pvz., vandenilio chlorido rūgšties alkoholiniu tirpalu), prieš naudojant jie turi būti praskalauti ir išdžiovinti, kad būtų išvengta užteršimo pirmiau atliktų bandymų likučiais. Kolbos, prieš jas naudojant pirmą kartą, taip pat turi būti plaunamos.
17. Bandomosioms cheminėms medžiagoms įvertinti vienu metu naudojamos dvi kolbos, dar viena kolba naudojama etaloninei medžiagai. Atliekamas kartotinis tuščiasis bandymas be bandomosios ir be etaloninės medžiagos, naudojamos analizės tuštiesiems ėminiams nustatyti. Bandomosios medžiagos ištirpinamos bandymo terpėje, galima patogiu būdu įpilti naudojant koncentruotą pradinį tirpalą, kad būtų gautos paprastai 5–40 mg DOC/l reikiamos pradinės koncentracijos. Etaloninė medžiaga tikrinama paprastai nuo pradinės koncentracijos, atitinkančios 20 mg DOC/l. Jei naudojami bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos pradiniai tirpalai, užtikrinama, kad jūros vandens terpės druskingumas daug nepakistų.
18. Jei galima tikėtis toksinio poveikio arba jo negalima atmesti, į bandymo schemą galbūt reikėtų įtraukti kartotinį inhibavimo bandymą. Bandomoji ir etaloninė cheminės medžiagos pilamos į tą patį indą, etaloninės medžiagos koncentracijai paprastai esant lygiai kontrolinio bandymo koncentracijai (t. y. 20 mg DOC/l), kad būtų galima palyginti.
19. Reikiami bandymo tirpalų kiekiai išpilstomi į kūgines kolbas (patogus kiekis yra maždaug pusė kolbos tūrio) ir kiekviena kolba uždengiama nesandariu dangčiu (pvz., aliuminio folija), kad galėtų vykti dujų mainai tarp kolbos ir aplinkos oro. (Vatos kamščiai netinka, jei naudojama DOC analizė). Indai statomi ant purtyklės ir visą bandymą nepertraukiamai kratomi nedideliu greičiu (pvz., 100 aps/min). (15–20 °C temperatūra reguliuojama ± 2 °C tikslumu), o indai apsaugomi nuo šviesos, kad neaugtų dumbliai. Užtikrinama, kad aplinkos ore nebūtų toksinių medžiagų.

Fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymas

20. Jei įtariamas abiotinis skaidymas arba nuostolių mechanizmai, pvz., hidrolizė (tik specifinės analizės problema), garavimas arba adsorbcija, patariama atlikti fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymą. Jį galima atlikti į indus su bandomąja chemine medžiaga įdedant gyvsidabrio (II) chlorido (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50–100 mg/l), kad būtų apribotas mikrobinis aktyvumas. Reikšmingas DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimas atliekant fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymą rodo, kad yra abiotinio pašalinimo mechanizmai. (Jei naudojamas gyvsidabrio chloridas, reikėtų atkreipti dėmesį į trukdžius arba katalizatoriaus nuodijimą atliekant DOC analizę).

Kolbų skaičius

21. Atliekant tipinį bandymą, naudojamos šios kolbos:
 - 1 ir 2 kolbos – su bandomąja chemine medžiaga (bandomąja suspensija);
 - 3 ir 4 kolbos – tik su jūros vandeniu (tuščiasis ėminys);
 - 5 kolba – su etalonine chemine medžiaga (procedūros kontrolinis ėminys);
 - 6 kolba – su bandomąja ir etalonine chemine medžiaga (toksiškumo kontrolinis ėminys) – nebūtinai;
 - 7 kolba – su bandomąja chemine medžiaga ir sterilizavimo priemone (abiotinis sterilus kontrolinis ėminys) – nebūtinai.

DOC analizė

22. Bandymo eigoje tam tikrais intervalais imami DOC analizės ėminiai (1 priedėlis). Ėminiai visuomet imami bandymo pradžioje (0 dieną) ir 60 dieną. Iš viso būtina turėti ne mažiau kaip penkis ėminius skaidymo laikiniam kitimui aprašyti. Neįmanoma nurodyti tam tikro ėminių ėmimo laiko grafiko, nes biologinio skaidymo greitis yra skirtingas. Atliekamas kartotinis kiekvieno ėminio DOC nustatymas.

⁽¹⁾ Gyvsidabrio (II) chloridas (HgCl_2) yra labai toksiška cheminė medžiaga, kuri turi būti naudojama taikant tinkamas atsargumo priemones. Šios cheminės medžiagos turinčios vandeninės atliekos turėtų būti tinkamai šalinamos; jos neturėtų būti išleidžiamos į kanalizacijos sistemą.

Ėminių ėmimas

23. Reikiamas ėminių tūris priklauso nuo analizės metodo (specifinė analizė), nuo naudojamo anglies analizatoriaus ir nuo procedūros (membraninis filtravimas ar centrifugavimas), pasirinktos ėminiui apdoroti prieš anglies nustatymą (25 ir 26 pastraipos). Prieš imant ėminį, būtina įsitikinti, ar bandymo terpė yra gerai sumaišyta ir ar visa ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga yra ištirpinta arba suspenduota.
24. Paėmus ėminį, jis iš karto filtruojamas per membraninį filtrą arba centrifuguojamas. Prieš filtruotus arba centrifuguotus ėminius galima laikyti 2–4 °C temperatūroje iki 48 h arba ilgesnį laikotarpį, jei temperatūra žemesnė kaip – 18 °C (jei žinoma, kad cheminė medžiaga nebus paveikta, prieš laikymą ji parūgštinama iki pH 2).
25. Membraniniai filtrai (0,2–0,45 µm) tinka, jei užtikrinama, kad iš jų neišsiskiria anglis ir jie neadsorbuoja cheminės medžiagos filtravimo etape, pvz., polikarbonato membraniniai filtrai. Kai kurie membraniniai filtrai yra impregnuoti paviršinio aktyvumo medžiagomis hidrofiliskumui pagerinti ir iš jų gali išsiskirti gan didelis ištirpusios anglies kiekis. Tokie filtrai ruošiami juos virinant dejonizuotame vandenyje paeiliui tris kartus, kiekvieną kartą po vieną valandą. Po virinimo filtrai laikomi dejonizuotame vandenyje. Pirmieji 20 ml filtrato išpilami lauk.
26. Užuoat naudojus membraninį filtravimą, ėminius galima centrifuguoti. Centrifuguojama 40 000 m.s⁻² (~ 4 000 g) greičiu 15 min, pageidautina, aušinamąja centrifuga.

Pastaba: manoma, kad esant labai mažai koncentracijai, centrifugavimu neįmanoma atskirti suminės organinės anglies (TOC) ir DOC (TOC/DOC), nes pašalinamos ne visos bakterijos, arba anglis, kaip bakterijų plazmos dalis, vėl ištirpsta. Esant didesnei bandymo koncentracijai (> 10 mg C litrui), centrifugavimo paklaida atrodo palyginti maža.

Ėminių ėmimo dažnumas

27. Jei analizė atliekama iš karto, kai paimamas ėminys, kito ėminių ėmimo laikas įvertinamas pagal analizinio nustatymo rezultatus.
28. Jei ėminiai laikomi (24 pastraipa) analizei atlikti vėliau, imama daugiau nei penki minimaliai reikalaujami ėminiai. Iš pradžių analizuojami paskutiniai ėminiai ir analizei nuosekliai „atgaliniu būdu“ pasirenkant reikiamus ėminius, galima gauti tinkamos formos biologinio skaidymo kreivę analizuojant palyginti mažą ėminių skaičių. Jei iki bandymo pabaigos skaidymas neįvyko, kitų ėminių analizuoti nereikia ir šioje situacijoje analizės „atgaliniu būdu“ strategija gali sutaupyti daug analizei skirtų lėšų.
29. Jei biologinio skaidymo kreivės pastovioji būsena (stabilizavimasis) stebima anksčiau nei 60-ąją dieną, bandymas nutraukiamas. Jei skaidymas akivaizdžiai prasidėjo prieš 60 dieną, bet pastoviosios būsenos nepasiekė, bandymas tęsiamas toliau.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

30. Analizės rezultatai įrašomi į pridedamą specifikaciją (2 priedėlis) ir bandomosios bei etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo vertės apskaičiuojamos pagal lygtį:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100,$$

čia:

D_t – DOC skaidymas arba specifinės cheminės medžiagos pašalinimas t laiku, procentais,

C_0 – DOC arba specifinės cheminės medžiagos pradinė koncentracija bandymo terpėje,

C_t – DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracija bandymo terpėje t laiku,

$C_{bl(0)}$ – DOC arba specifinės cheminės medžiagos pradinė koncentracija tuščiajame ėminyje,

$C_{bl(t)}$ – DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracija tuščiajame ėminyje t laiku.

31. Skaidymas nurodomas kaip pašalintos DOC (visiškas suskaidymas) arba pašalintos specifinės cheminės medžiagos (pradinis skaidymas) procentinė dalis t laiku. DOC koncentracija skaičiuojama 0,1 mg litrui tikslumu, o D_t verčių vidurkiai apvalinami iki sveiko procento.
32. Skaidymo eiga pateikiama grafiškai kaip kreivė, pavaizduota „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriaus paveiksle. Jei duomenų pakanka, iš kreivės apskaičiuojamas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir 50 procentų pašalinimo nuo eksponentinio tarpsnio pabaigos trukmė (t_{50}).

Bandymo ataskaita

33. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;
- identifikavimo duomenys.

Bandymų sąlygos:

- ėminių ėmimo vietos vieta ir aprašymas; užterštumo ir mitybinių medžiagų būsena (kolonijų skaičius, nitratas, amonis, fosfatas, jei tinka);
- ėminio charakteristikos (ėmimo data, gylis, išvaizda, temperatūra, druskingumas, DOC (neprivaloma), laiko tarpas tarp paėmimo ir bandymo);
- taikytas jūros vandens sendinimo metodas (jei buvo);
- taikytas jūros vandens pradinio apdorojimo metodas (filtravimas ar sedimentacija);
- taikytas DOC nustatymo metodas;
- taikytas specifinės analizės (neprivaloma) metodas;
- heterotrofų skaičiaus jūros vandenyje nustatymo metodas (lėkštelės kolonijų skaičiaus metodas arba alternatyvi procedūra) (neprivalomas);
- kiti metodai (neprivalomi), taikyti jūros vandeniui apibūdinti (ATP matavimas ir kt.).

Rezultatai:

- analizės duomenys, pateikti specifikacijoje (2 priedėlis);
- skaidymo bandymo eiga yra grafiškai pavaizduota kreivėje, rodančioje eksponentinis tarpsnį (t_L), krypties koeficientą ir 50 procentų pašalinimo (nuo eksponentinio tarpsnio pabaigos) trukmę (t_{50}). Eksponentinis tarpsnis gali būti įvertintas grafiškai, kaip pavaizduota „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriaus paveiksle arba paprastumo dėlei imamas kaip trukmė, per kurią skaidymas įvyksta 10 procentų;
- skaidymo, išmatuoto po 60 dienų arba pasibaigus bandymui, procentinė dalis.

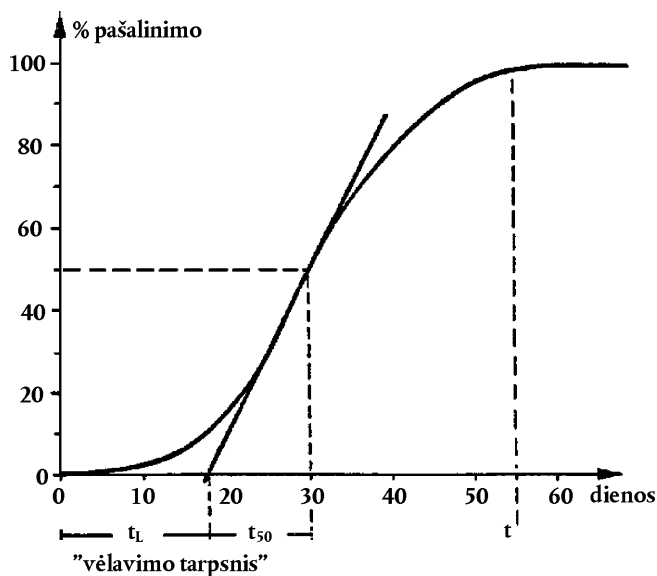
Rezultatų aptarimas.

Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas

34. Rezultatus, gautus etaloninėms cheminėms medžiagoms, pvz., natrio benzenkarboksilatui, natrio acetatui arba anilinui, turėtų būti įmanoma palyginti su tarplaboratorinio tyrimo rezultatais (3) (žr. „Etaloninės cheminės medžiagos“ skyrių, 7 pastraipą). Jei rezultatai, gauti etaloninėms cheminėms medžiagoms, yra netipiški, bandymą reikėtų pakartoti naudojant kitą jūros vandens ėminį. Nors inhibavimo bandymų rezultatus ne visuomet įmanoma tiesiogiai paaiškinti dėl bandomosios medžiagos DOC indėlio, suminio DOC šalinimo greičio reikšmingas sumažėjimas, palyginti su kontroliniu ėminiu, yra teigiamas toksinio poveikio ženklas.

35. Dėl santykinai didelių naudojamų bandymo koncentracijos verčių palyginti su dauguma natūralių sistemų (taigi nepalankaus santykio tarp bandomosios cheminės medžiagos ir kitų anglies šaltinių koncentracijos verčių), metodas turi būti laikomas parengiamuoju bandymu, kuris gali būti naudojamas parodyti, kad cheminė medžiaga lengvai biologiškai skaidoma arba neskaidoma. Todėl mažas rezultatas nebūtinai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra biologiškai skaidoma jūros aplinkoje, bet rodo, kad šiam dalykui nustatyti teks atlikti didesnę darbą.

Teorinio skaidymo bandymo pavyzdys, kuris rodo galimą t_L („eksponentinis tarpsnis“ trukmė) ir t_{50} (laiko tarpas nuo t_L), per kurį pašalinama 50 procentų, verčių įvertinimo būdą, pavaizduotas toliau pateiktame paveiksle.



UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

ĮVADAS

1. Šis metodas – tai jūros vandeniui skirtas uždarnosios kolbos metodo (5) variantas, kuris buvo galutinai parengtas kaip Danijos vandens kokybės instituto Europos Komisijai (EB) atlikto tarplaboratorinio tyrimo rezultatas (3).
2. Kaip ir kartu pateikiamo jūros vandeniui skirtos kratomos kolbos metodo rezultatai, šio bandymo rezultatai neturi būti laikomi lengvo biologinio skaidumo rodikliais, bet jie turi būti naudojami konkrečiai, kai reikia gauti informaciją apie cheminių medžiagų biologinį skaidumą jūros aplinkoje.

METODO PRINCIPAS

3. Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis ištirpinamas bandymo terpėje, kad būtų gauta paprastai 2–10 mg bandomosios cheminės medžiagos vienam litrui koncentracija (galima naudoti vieną ar kelias koncentracijos vertes). Tirpalas laikomas tamsoje pripildytoje uždarytoje kolboje pastovios temperatūros vonioje arba po gaubtu, kurių temperatūra 15–20 °C intervale reguliuojama ± 1 °C tikslumu. Jei tyrimo tikslas yra aplinkos situacijų modeliavimas, bandymus galima atlikti už šio normalios temperatūros intervalo ribų, jei padaromi reikiami temperatūros reguliavimo pritaikymai. Skaidymas stebimas atliekant deguonies analizę 28 dienų laikotarpiu.
4. Tarplaboratorinis tyrimas parodė, kad, tęsiant bandymą ilgiau kaip 28 dienas, naudingos informacijos, dažniausiai dėl didelių trukdžių, nebūtų gauta. Buvo per didelės tuščiojo ėminio biologinio deguonies suvartojimo (BOD) vertės, galbūt dėl augimo ant sienelių, kurį sukelia maišymo stoka, ir dėl nitrifikavimo. Todėl rekomenduojama trukmė – 28 dienos, tačiau, jei tuščiojo ėminio BOD vertė išlieka ne didesnė kaip 30 procentų (15 ir 40 pastraipos), bandymą būtų galima pratęsti.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Siekiant sužinoti, ar bandymas gali būti taikomas tam tikrai cheminei medžiagai, turi būti žinomos kai kurios jos savybės. Reikia žinoti empirinę formulę, kad būtų galima apskaičiuoti teorinį deguonies poreikį (ThOD) (žr. 3 priedėlį); antraip, kaip pamatinė vertė turi būti nustatytas cheminės medžiagos cheminis deguonies suvartojimas (COD). COD taikymas mažiau priimtinas, nes, atliekant COD bandymą, ne visos cheminės medžiagos visiškai oksiduojasi.
6. Cheminės medžiagos tirpumas turėtų būti ne mažesnis kaip 2 mg/l, nors iš esmės būtų galima bandyti mažiau tirpias chemines medžiagas (pvz., naudojant ultragarsą), taip pat ir lakiąsias chemines medžiagas. Reikia turėti duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykinę dalis, kad būtų galima aiškinti gautus rezultatus, ypač, kai rezultatas yra arti „atitikties“ lygio.
7. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą bakterijoms, pvz., išmatuotą atliekant trumpalaikius kvėpavimo greičio bandymus (4), renkantis tinkamas bandymo koncentracijos vertes gali būti labai naudinga, taip pat gali ji būti svarbi tinkamai paaiškinti mažas biologinio skaidumo vertes. Tačiau tokios informacijos ne visada pakanka, kad būtų paaiškinti biologinio skaidumo bandymų rezultatai, ir labiau tinka 27 pastraipoje aprašyta procedūra.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

8. Turi būti naudojamos tinkamos etaloninės cheminės medžiagos jūros vandens ėminio mikrobiniam aktyvumui tikrinti. Natrio benzenkarboksilatą, natrio acetatą ir anilinas gali būti šiam tikslui tinkamų cheminių medžiagų pavyzdžiai. Šių cheminių medžiagų skaidymo iki ne mažiau kaip 60 procentų (jų ThOD) trukmė turi būti palyginti trumpa, priešingu atveju rekomenduojama bandymą kartoti su kitu jūros vandens ėminiu.
9. Atliekant EK tarplaboratorinį tyrimą, kai jūros vandens ėminiai buvo imami iš skirtingų vietų ir skirtingais metų laikais (3), natrio benzenkarboksilatui gautas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir laikas, per kurį pasiekiamas 50 procentų skaidymas (t_{50}), atmetus eksponentinis tarpsnis, buvo atitinkamai nuo 0 iki 2 dienų ir nuo 1 iki 4 dienų. Anilino t_L – nuo 0 iki 7 dienų, o t_{50} – nuo 21 iki 12 dienų.

ATKURIAMUMAS

10. Metodo atkuriamumas buvo nustatytas atliekant EB tarplaboratorinį tyrimą (3).

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

11. Įprasta laboratorinė įranga ir:
 - (a) 250–300 ml BOD kolbos su šlifo kamščiais arba siaurakaklės 250 ml kolbos su šlifo kamščiais;
 - (b) Kelios 2, 3 ir 4 litrų kolbos su litro tūrio žymėmis bandymui paruošti ir BOD kolboms pripildyti;
 - (c) Vandens vonia arba pastovios temperatūros patalpa, kurioje nebūtų šviesos, kolboms laikyti pastovioje temperatūroje (± 1 °C).
 - (d) Ištirpusio deguonies analizės įranga;
 - (e) Membraniniai filtrai, 0,2–0,45 μm (neprivalomi);
 - (f) Specifinės analizės įranga (neprivaloma).

Jūros vanduo

12. Jūros vandens ėminys paimamas į gerai išvalytą talpyklą ir vežamas į laboratoriją, pageidautina, per vieną ar dvi dienas po paėmimo. Vežant ėminį, jo temperatūra neturi pakilti gerokai aukščiau bandymo temperatūros.
13. Ėminio ėmimo vieta tiksliai identifikuojama ir apibūdinama, atsižvelgiant į jos užterštumo ir mitybinių medžiagų būseną. Į šį apibūdinimą, ypač priekrantės vandenų, įtraukiamas heterotrofinių mikroorganizmų kolonijų skaičius ir ištirpusio nitrato, amonio ir fosfato koncentracijos nustatymas.
14. Apie patį jūros vandens ėminį pateikiama tokia informacija:
 - ėmimo data;
 - ėmimo gylis;
 - ėminio išvaizda, drumstumas ir kt.;
 - temperatūra ėmimo metu;
 - druskingumas;
 - ištirpusi organinė anglis (DOC);
 - vėlinimo tarp ėminio paėmimo ir jo bandymo trukmė.
15. Jei nustatoma, kad jūros vandens ėminio DOC kiekis yra labai didelis arba manoma, kad tuščiojo ėminio BOD po 28 dienų bus didesnis kaip 30 procentų etaloninių medžiagų BOD, prieš naudojant jūros vandenį rekomenduojama jį maždaug savaitę sendinti.
16. Sendinama laikant aerobinėmis sąlygomis bandymo temperatūroje ir tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Jei būtina, aerobinės sąlygos užtikrinamos nestipriai aeruojant. Sendinant mažėja lengvai skaidomų organinių medžiagų kiekis. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3), nebuvo nustatyta skirtumo tarp sendintų ir naujai paimtų jūros vandens ėminių skaidumo potencialo.
17. Prieš naudojant atliekamas jūros vandens pradinis apdorojimas, kad būtų pašalintos stambios dalelės, pvz., filtruojama per nailono filtrą arba akytąjį popierinį filtrą (ne per membraninį arba stiklo pluošto filtrus), arba sedimentacijos ir dekantavimo keliu. Taikyta procedūra turi būti nurodyta ataskaitoje. Pradinis apdorojimas, jei naudojamas, atliekamas po sendinimo.

Mineralinių mitybinių medžiagų pradiniai tirpalai

18. Ruošiami šie pradiniai tirpalai iš analiziškai grynų reagentų:

(a) Kalio divandenilio ortofosfato, KH_2PO_4	8,50 g
Dikalio vandenilio ortofosfato, K_2HPO_4	21,75 g
Dinatrio vanenilio ortofosfato dihidrato, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
Amonio chlorido, NH_4Cl	0,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	
(b) Kalcio chlorido, CaCl_2	27,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	

- (c) Magnio sulfato heptahidrato, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.
- (d) Geležies (III) chlorido heksahidrato, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.

Nuosėdų susidarymo (d) tirpale galima išvengti, įlašinant vieną lašą koncentruotos HCl arba įdedant 0,4 g etilendiamintetracto rūgšties (EDTA, dinatrio druskos) litrui. Jei pradiniam tirpale susidaro nuosėdos, jis keičiamas naujai paruoštu tirpalu.

Bandymo terpės ruošimas

19. Įpilama po 1 ml kiekvieno iš pirmiau nurodytų pradinių tirpalų vienam litrui apdoroto jūros vandens. Bandymo terpė prisotinama oru bandymo temperatūroje aeruojant švariu suslėgtuoju oru ne trumpiau kaip 20 min. Kontrolės tikslais nustatoma ištirpusio deguonies koncentracija. Ištirpusio deguonies soties koncentraciją, kaip druskingumo ir temperatūros funkciją, galima nustatyti pagal nomogramą, pridėdama prie šio bandymo metodo (4 priedėlis).

Sėjinys

20. Be mikroorganizmų, kurie jau yra jūros vandenyje, specialaus sėjinio nededama. Jūros vandens bandymo terpėje (taip pat pageidautina pradinuose jūros vandens ėminiuose) nustatomas (nebūtinai) kolonijas sudarančių heterotrofų skaičius, pvz., lėkštelės kolonijų skaičius, naudojant jūros dumblių agarą. Tai ypač pageidautina naudojant priekrantės arba užterštų vietų ėminius. Tikrinamas jūros vandens heterotrofų mikrobinis aktyvumas, atliekant bandymą su etalonine medžiaga.

Bandymo kolbų ruošimas

21. Atliekami visi būtini veiksmai, įskaitant jūros vandens sendinimą ir pradinį apdorojimą pasirinktoje bandymo temperatūroje nuo 15 iki 20 °C, taip pat užtikrinamas visų stiklinių indų švarumas, bet ne sterilumas.
22. Ruošiamos BOD kolbų grupės bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos BOD nustatyti, vienu metu atliekant bandymų serijas. Visos analizės atliekamos kaip kartotinės (tuščiųjų ėminių, etaloninių ir bandomųjų cheminių medžiagų), t. y. kiekvienam nustatymui ruošiamos dvi kolbos. Analizės atliekamos bent 0, 5, 15 ir 28 dieną (keturi nustatymai). Atliekant keturis deguonies nustatymus iš viso reikės $3 \times 2 \times 4 = 24$ kolbų (tuščiojo ėminio, etaloninės ir bandomosios cheminės medžiagos), taigi maždaug 8 litrų bandymo terpės (vienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai).
23. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos tirpalai ruošiami atskirai pakankamai didelio tūrio kolbose (11 pastraipa), iš pradžių įdedant bandomąją ir etaloninę cheminę medžiagą tiesiogiai arba įpilant koncentruoto pradinio tirpalo į iš dalies pripildytas dideles kolbas. Įpilama dar bandymo terpės, kad būtų gauta reikiama galutinė koncentracija. Jei naudojami bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos pradiniai tirpalai, būtina užtikrinti, kad reikšmingai nepakistų jūros vandens terpės druskingumas.
24. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos koncentracijos vertės pasirenkamos, atsižvelgiant į:
- (a) ištirpusio deguonies tirpumą jūros vandenyje dažniausiai pasitaikančiomis bandymo temperatūros ir druskingumo sąlygomis (žr. pridėdamą nomogramą, 4 priedėlis);
 - (b) jūros vandens tuščiojo ėminio BOD ir
 - (c) numanomą bandomosios cheminės medžiagos biologinį skaidumą.
25. 15 °C ir 20 °C temperatūroje ir esant 32 tūkstantųjų druskingumui (okeano vanduo), ištirpusio deguonies tirpumas yra maždaug 8,1 ir 7,4 mg/l. Paties jūros vanduo gali suvartoti deguonies (tuščiojo ėminio kvėpavimui) 2 mg O_2 /l arba daugiau, jei jūros vanduo nesendintas. Todėl siekiant užtikrinti, kad po bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos deguonies koncentracija liktų reikšminga, cheminių medžiagų, kurios, kaip manoma, visiškai suskaidomos bandymų sąlygomis (pvz., etaloninių cheminių medžiagų) naudojama pradinė koncentracija yra maždaug 2–3 mg/l (atsižvelgiant į ThOD). Mažesnio skaidumo cheminių medžiagų bandymo koncentracija gali būti didesnė, iki maždaug 10 mg/l, jei nėra toksinio poveikio. Gali būti naudinga atlikti lygiagrečius bandymus su mažos (apie 2 mg/l) ir didelės (apie 10 mg/l) koncentracijos bandomąja chemine medžiaga.

26. Kolbose, kuriose nėra bandomosios arba etaloninės cheminės medžiagos, lygiagrečiai turi būti nustatytas deguonis tuščiasis ėminys.
27. Jei turi būti nustatyti inhibavimo reiškiniai, didelėse kolbose atskirai ruošama tokia tirpalų serija (13 pastraipa):
- (a) 2 mg litrui lengvai skaidomos cheminės medžiagos, pvz., kurios nors išvardytos etaloninės cheminės medžiagos;
 - (b) x mg litrui bandomosios cheminės medžiagos (x paprastai 2);
 - (c) 2 mg litrui lengvai skaidomos cheminės medžiagos ir x mg litrui bandomosios cheminės medžiagos.

Fizikinių ir cheminių reiškinų kontrolinių ėminių bandymas

28. Jei pasirenkama atlikti specifinę analizę, galima atlikti fizikinių ir cheminių savybių bandymą, kad būtų galima patikrinti, ar bandomoji medžiaga šalinama pagal abiotinius mechanizmus, pvz., hidrolizės arba adsorbcijos. Fizikinių ir cheminių reiškinų kontrolės bandymą galima atlikti į dvi kolbas su bandomąja chemine medžiaga įdedant gyvsidabrio (II) chlorido (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50–100 mg/l), kad būtų apribotas mikrobinis aktyvumas. Reikšmingas specifinės cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimas atliekant bandymą rodo, kad yra abiotinio pašalinimo mechanizmai.

BOD kolbų skaičius atliekant tipinį bandymą

29. Atliekant tipinį bandymą, naudojamos šios kolbos:
- mažiausiai 8 su bandomąja chemine medžiaga;
 - mažiausiai 8 tik su jūros vandeniu, į kurį pridėta mitybinių medžiagų;
 - mažiausiai 8 su etalonine chemine medžiaga ir, jei būtina
 - 6 kolbos su bandomąja ir etalonine chemine medžiaga (toksiškumo kontrolinis ėminys).

PROCEDŪRA

30. Paruoštas tirpalas iš karto siurbiamas iš reikiamos didelės kolbos apatinio tūrio ketvirtadalio (ne nuo dugno) atitinkamai BOD kolbų grupei pripildyti. Iš karto nustatomas nulinių kontrolinių ėminių (nulinio laiko) ištirpęs deguonis (33 pastraipa) arba jie konservuojami, jei cheminė analizė būtų atliekama vėliau, nusodinant MnCl_2 (mangano (II) chloridu) ir NaOH (natrio hidroksidu).
31. Likusios lygiagrečiai nustatomo BOD kolbos inkubuojamos bandymo temperatūroje (15–20 °C), laikomos tamsoje ir išimamos iš inkubavimo zonos po tam tikro laiko (pvz., po 5, 15 ir 28 dienų, bet ne mažiau) ir analizuojamos ištirpusiam deguoniui nustatyti (33 pastraipa).
32. Specifinės (neprivalomos) analizės ėminiai filtruojami per membraninį filtrą (0,2–0,45 μm) arba 15 min centrifuguojami. Jei ėminiai neanalizuojami iš karto, juos galima laikyti 2–4 °C temperatūroje iki 48 h arba ilgesnį laiką – 18 °C temperatūroje, (jei žinoma, kad cheminė medžiaga nebus paveikta, prieš laikymą ji parūgštinama iki pH 2).

Ištirpusio deguonies nustatymas

33. Ištirpusio deguonies koncentracija nustatoma taikant nacionaliniu arba tarptautiniu mastu patvirtintą cheminių arba elektrocheminį metodą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

34. Analizės rezultatai įrašomi į pridedamas specifikacijas (5 priedėlis).

⁽¹⁾ Gyvsidabrio (II) chloridas (HgCl_2) yra labai toksiška cheminė medžiaga, kuri turi būti naudojama taikant tinkamas atsargumo priemones. Šios cheminės medžiagos turinčios vandeninės atliekos turėtų būti tinkamai šalinamos; jos neturėtų būti išleidžiamos į kanalizacijos sistemą.

35. BOD apskaičiuojamas kaip tuščiojo ėminio ir bandomosios cheminės medžiagos tirpalo bandymų sąlygomis suvartoto deguonies skirtumas. Gauta suvartoto deguonies neto vertė dalijama iš cheminės medžiagos koncentracijos (m/v), kad BOD būtų išreikštas kaip mg BOD/mg bandomosios cheminės medžiagos. Skaidymas apibūdinamas kaip biocheminio deguonies suvartojimo santykis su teoriniu deguonies suvartojimu (ThOD) (pageidautina) arba su cheminiu deguonies suvartojimu (COD) ir išreiškiamas procentine dalimi (žr. 36 pastraipą).
36. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo vertės apskaičiuojamos kiekvienam ėminių ėmimo laikui taikant vieną iš šių lygčių:

$$\% \text{ biologinis skaidymas} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg bandomosios medžiagos}}{\text{mg ThOD}/\text{mg bandomosios medžiagos}} \times 100$$

$$\% \text{ biologinis skaidymas} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg bandomosios medžiagos}}{\text{mg COD}/\text{mg bandomosios medžiagos}} \times 100$$

čia:

ThOD – teorinis deguonies suvartojimas (skaičiavimas 3 priedėlyje)

COD – cheminis deguonies suvartojimas, nustatytas atliekant bandymą.

Pastaba: skaičiuojant abiem būdais (ThOD arba COD procentinės dalies), kartais gaunami nevienodi rezultatai; pageidautina naudoti ThOD, nes, atliekant COD bandymą, kai kurios cheminės medžiagos nevisiškai oksiduojasi.

37. Skaidymo eiga pateikiama grafiškai kaip kreivė (žr. pavyzdį „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriuje). Jei duomenų pakanka, iš biologinio skaidymo kreivės apskaičiuojamas eksponentinis tarpsnis (t_1) ir 50 procentų pašalinimo nuo eksponentinio tarpsnio pabaigos trukmė (t_{50}).
38. Jei taikoma specifinė analizė (neprivaloma), nurodoma pradinio skaidymo procentinė dalis, kaip specifinės medžiagos pašalinimo bandymo laikotarpiu procentinė dalis (pataisyta atsižvelgiant į tuščiąjį analizės ėminį).

Bandymo ataskaita

39. Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- fizikinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės;
- identifikavimo duomenys.

Bandymų sąlygos:

- ėminių ėmimo vietos vieta ir aprašymas: užterštumo ir mitybinių medžiagų būsena (kolonijų skaičius, nitratas, amonis, fosfatas, jei tinka);
- ėminio charakteristikos (ėmimo data, gylis, išvaizda, temperatūra, druskingumas, DOC (neprivalomas), laiko tarpas tarp paėmimo ir bandymo);
- taikytas jūros vandens sendinimo metodas (jei buvo);
- taikytas jūros vandens pradinio apdorojimo metodas (filtravimas ar sedimentacija);
- taikytas COD nustatymo (jei atliekamas) metodas;
- taikytas deguonies matavimo metodas;
- bandymų sąlygomis mažai tirpių cheminių medžiagų dispergavimo procedūra;
- heterotrofų skaičiaus jūros vandenyje nustatymo metodas (lėkštelės kolonijų skaičiaus metodas arba alternatyvi procedūra);

- taikytas DOC nustatymo (jei atliekamas) metodas;
- taikytas specifinės analizės (neprivaloma) metodas;
- kiti neprivalomi metodai, taikyti jūros vandeniui apibūdinti (ATP matavimas ir kt.).

Rezultatai:

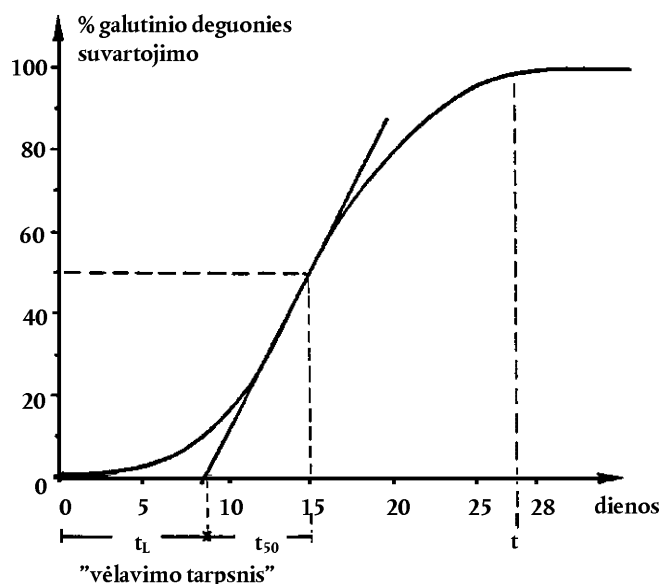
- specifikacijoje pateikti analizės duomenys (5 priedėlis);
- skaidymo bandymo eiga grafiškai pavaizduota kreivėje, rodančioje eksponentinis tarpsnį (t_L), krypties koeficientą ir trukmę (nuo eksponentinis tarpsnio pabaigos), per kurią deguonies suvartojimas dėl bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos pasiekia 50 procentų visiško deguonies suvartojimo (t_{50}). Eksponentinis tarpsnis gali būti įvertintas grafiškai, kaip pavaizduota pridedame paveiksle, arba paprastumo dėlei imamas kaip trukmė, per kurią skaidymas įvyksta 10 procentų;
- skaidymo, išmatuoto po 28 dienų, procentinė dalis.

Rezultatų aptarimas.

Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas

40. Tuščiojo ėminio kvėpavimui suvartoto deguonies kiekis neturėtų būti didesnis kaip 30 procentų kolboje esančio deguonies. Jei, naudojant naujai paimtą jūros vandenį, šio kriterijaus atitikties neįmanoma, prieš naudojant jis turi būti sendinamas (stabilizuojamas).
41. Reikėtų atsižvelgti į tai, kad azoto turinčios cheminės medžiagos gali turėti įtakos rezultatams.
42. Rezultatus, gautus etaloninėms cheminėms medžiagoms natrio benzenkarboksilatui ir anilinui, turėtų būti įmanoma palyginti su tarplaboratorinio tyrimo rezultatais (3) (9 pastraipa). Jei rezultatai, gauti etaloninėms cheminėms medžiagoms, yra netipiški, bandymą reikėtų pakartoti naudojant kitą jūros vandens ėminį.
43. Galima daryti prielaidą, kad bandomoji medžiaga yra bakterijų inhibitorius (naudojamos koncentracijos), jei etaloninės ir bandomosios cheminių medžiagų mišinio BOD yra mažesnis nei šių dviejų cheminių medžiagų atskirų tirpalų BOD suma.
44. Dėl santykinai didelių naudojamų bandymo koncentracijos verčių palyginti su dauguma natūralių sistemų, taigi nepalankaus santykio tarp bandomosios cheminės medžiagos ir kitų anglies šaltinių koncentracijos verčių, metodas turi būti laikomas parengiamuoju bandymu, kuris gali būti naudojamas parodyti, kad cheminė medžiaga lengvai biologiškai skaidoma arba neskaidoma. Todėl mažas rezultatas nebūtinai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra biologiškai skaidoma jūros aplinkoje, bet rodo, kad šiam dalykui nustatyti teks atlikti didesnę darbą.

Teorinio skaidymo bandymo pavyzdys, aiškinantis galimą t_L („eksponentinis tarpsnis“ trukmės) ir laiko tarpo (pradžią nuo t_L), per kurį deguonies suvartojimas dėl bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos pasiekia 50 procentų galutinio deguonies suvartojimo, t_{50} verčių įvertinimo būdą, pateiktas toliau:



NUORODOS

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
 - (2) Šio priedo C.4-B skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas. III dalis. Modifikuotas EBPO atrankos bandymas
 - (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
 - (4) Šio priedo C.11 skyrius. Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas (anglies ir amonio oksidavimas).
 - (5) Šio priedo C.4 skyriaus E skirsnis. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas. VI dalis. Uždarosios kolbos metodas.
-

1 priedėlis

Organinės anglies nustatymas jūros vandenyje**KRATOMOS KOLBOS METODAS**

Organinė anglis vandens ėminyje nustatoma, jame esančius organinius junginius oksidavus į anglies dioksidą, dažniausiai taikant vieną iš šių trijų būdų:

- šlapią oksidavimą persulfatu ir UV švitinimu;
- šlapią oksidavimą persulfatu aukštoje (116–130 °C) temperatūroje;
- deginimą.

Išsiskyręs CO₂ kiekybiškai nustatomas taikant infraraudonąją spektrometriją arba titrimetriniu metodu. Arba CO₂ redukuojamas iki metano, kuris kiekybiškai nustatomas liepsnos jonizaciniu detektoriumi (FID).

Persulfato ir UV metodas paprastai taikomas analizuojant „švarų“ vandenį, turintį mažą kietųjų dalelių kiekį. Abu kiti metodai gali būti taikomi daugeliui vandens ėminių tipų, kai oksidavimas persulfatu aukštoje temperatūroje yra tinkamiausias metodas mažai anglies turintiems ėminiams, o deginimo metodas taikomas ėminiams, kurių nelakiosios organinės anglies (NVOC) kiekis yra gerokai didesnis nei 1 mg C/l.

Trukdžiai

Visi trys metodai priklauso nuo ėminyje esančios neorganinės anglies (IC) pašalinimo arba kompensavimo. CO₂ pašalinimas prapūtumu iš parūgštinto ėminio yra dažniausiai taikomas IC šalinimo būdas, nors jį taikant netenkama lakiųjų organinių junginių nuostolių (1). Visiškas IC pašalinimas arba kompensavimas turi būti užtikrintas kiekvienai ėminio matricai ir be NVOC turi būti nustatyta lakioji organinė anglis (VOC), atsižvelgiant į ėminio tipą.

Dėl didelės chlorido koncentracijos sumažėja oksidavimo efektyvumas, taikant persulfato ir UV metodą (2). Tačiau šį trukdį galima pašalinti, jei oksidavimo reagentas modifikuojamas pridedant gyvsidabrio (II) nitrato. Rekomenduojama, kad būtų naudojamas maksimaliai priimtinas ėminio tūris kiekvienam chlorido turinčio ėminio tipui įvertinti. Jei didelę druskos koncentraciją turintis ėminys analizuojamas deginimo metodu, katalizatorius gali pasidengti druska ir gali būti per didelė deginimo vamzdžio korozija. Reikėtų imtis gamintojo vadove nurodytų atsargumo priemonių.

Labai drumsti ėminiai ir daug kietųjų dalelių turintys ėminiai gali būti ne visiškai oksiduoti taikant persulfato ir UV metodą.

Tinkamo metodo pavyzdys

Nelakioji organinė anglis nustatoma oksiduojant persulfatu ir UV švitinimu, o išsiskyręs CO₂ kiekybiškai nustatomas taikant nedispersinę infraraudonąją spektrometriją.

Oksidavimo reagentas modifikuojamas pagal (2) pateiktus patarimus, kaip aprašyta gamintojo vadove:

- a) 8,2 g HgCl₂ ir 9,6 g Hg(NO₃)₂ · H₂O ištirpinama keliuose šimtuose mililitrų mažos anglies koncentracijos laboratorinio vandens.
- b) 20 g K₂S₂O₈ ištirpinama gyvsidabrio druskos tirpale.
- c) į mišinį įpilama 5 ml HNO₃ (konc.).
- d) reagentas skiedžiamas iki 1 000 ml.

Trukdžiai dėl chloridų pašalinami, jei naudojamas ėminio tūris 40 µl esant 10 procentų chlorido ir ėminio tūris 200 µl esant 1,9 procento chlorido. Didesnės chlorido koncentracijos ir (arba) didesnio tūrio ėminiai gali būti analizuojami taikant šį metodą, jei išvengiama chlorido kaupimosi oksidavimo inde. Toliau, jei reikia, gali būti nustatyta tiriamo tipo ėminio lakioji organinė anglis.

NUORODOS

- (1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Taip pat įdomu (pateikiamas autoanalizės sistemos aprašymas):

- (3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

2 priedėlis

Biologinis skaidymas jūros vandenyje

KRATOMOS KOLBOS METODAS

SPECIFIKACIJA

1. **LABORATORIJA:**
2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA:**
3. **BANDOMOJI CHEMINĖ MEDŽIAGA:**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje t_0 : mg/l medžiagos

: mg DOC/l

4. **JŪROS VANDUO:**

Šaltinis:

Ėmimo data:

Ėmimo gylis:

Išvaizda ėmimo momentu (pvz., drumstas ir kt.):

Druskingumas ėmimo momentu: ‰

Temperatūra ėmimo momentu: °C

DOC, praėjus x valandų po paėmimo: mg/l

Apdorojimas prieš bandymą (pvz., filtravimas, sedimentacija,

Mikroorganizmų kolonijų skaičius — pradinis ėminys: kolonijų/ml

— bandymo pradžioje: kolonijų/ml

Kitos charakteristikos:

5. ANGLIES NUSTATYMAS:

Anglies analizatorius:

	Kolba Nr.		DOC po n dienų (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Bandymas: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis ir bandomąja chemine medžiaga	1	a ₁					
		a ₂					
		vidutinė vertė, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		vidutinė vertė, C _{b(t)}					
Tuščiasis ėminys: jūros vanduo be bandomosios cheminės medžiagos ir su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis	1	c ₁					
		c ₂					
		vidutinė vertė, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		vidutinė vertė, C _{d(t)}					
	vidutinė vertė, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. NEAPDOROTŲ DUOMENŲ ĮVERTINIMAS:

Kolbos Nr.	Rezultatų skaičiavimas	% skaidymo po n dienų				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D₁ ir D₂ vidutinė vertė neturėtų būti skaičiuojama, jei jos labai skiriasi.

Pastaba: Panašūs formatai gali būti taikomi, kai po skaidymo atliekama specifinė analizė etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams ėminiams.

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS (neprivalomas)**

	Laikas (dienos)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame ėminyje	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotinis skaidymas} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

3 priedėlis

Teorinio biocheminio deguonies suvartojimo skaičiavimas

UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

Cheminės medžiagos $C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$, kurios molekulinė masė MW, ThOD apskaičiuojamas pagal:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW}$$

Šiuo skaičiavimu atsižvelgiama į tai, kad C mineralizuojama iki CO_2 , H iki H_2O , P iki P_2O_5 ir Na iki Na_2O . Halogenas pašalinamas kaip vandenilio halogenidas, o azotas kaip amoniakas.

Pavyzdys:

Gliukozė $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg gliukozės}$$

Išskyrus šarminių metalų druskas, druskų molekulinė masė skaičiuojama darant prielaidą, kad druskos buvo hidrolizuotos.

Daroma prielaida, kad siera oksiduota iki +6 būsenos.

Pavyzdys:

natrio n-dodecilbenzensulfonatas $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}$$

Jei cheminė medžiaga turi azoto, jis gali būti pašalintas kaip amoniakas, nitritas ar nitratas, kurie atitinka skirtingas teorinio biocheminio deguonies suvartojimo vertes.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW}$$

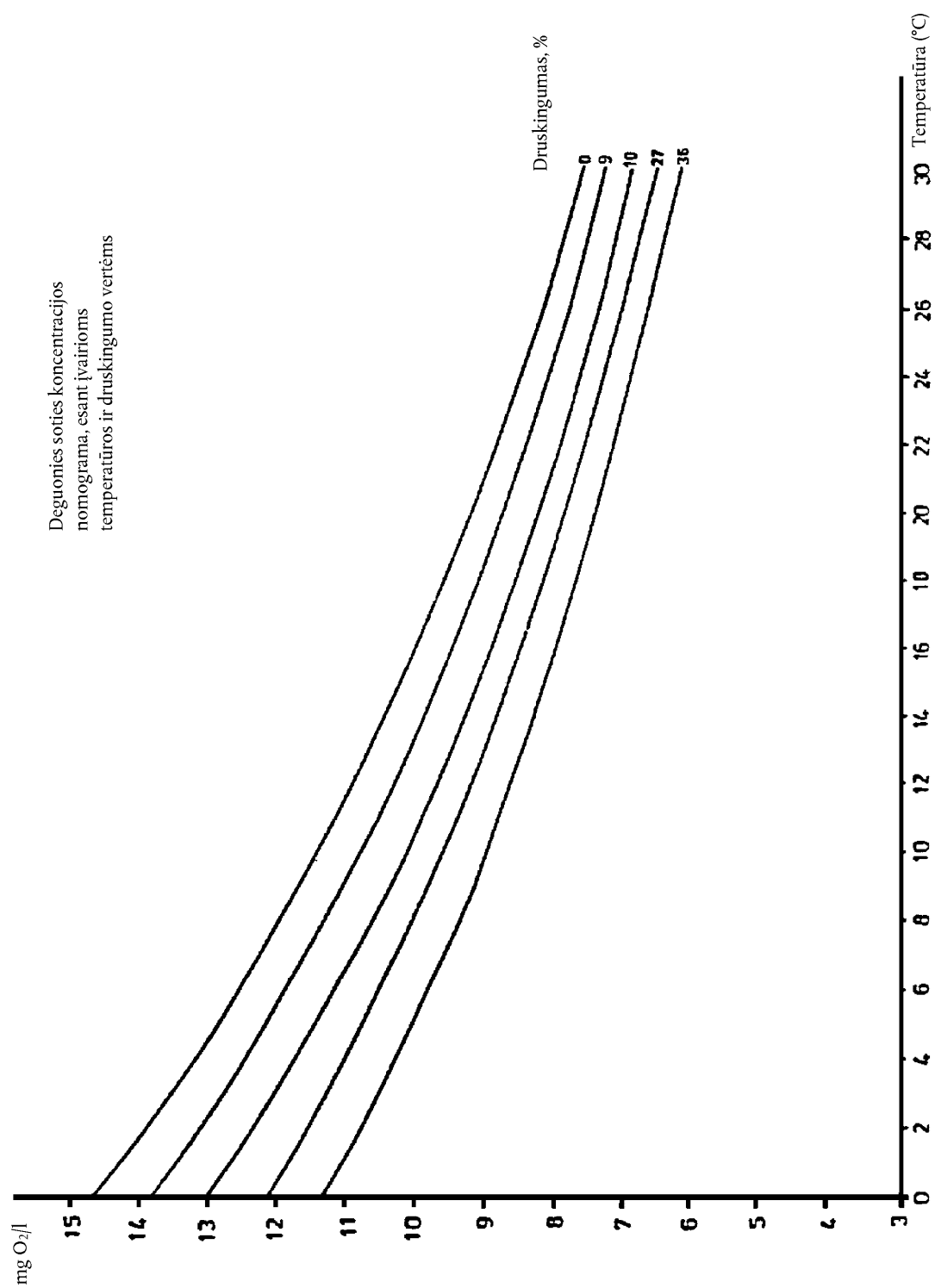
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW}$$

Daroma prielaida, kad analizuojant antrinę aminą buvo stebimas tik nitrato susidarymas:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}$$

4 priedėlis



5 priedėlis

Biologinis skaidymas jūros vandenyje.

UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

SPECIFIKACIJA

1. **LABORATORIJA:**
2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA:**
3. **BANDOMOJI CHEMINĖ MEDŽIAGA:**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l

Pradinė konc. jūros vandens terpėje: mg/l

ThOD arba COD: mg O₂/mg bandomosios medžiagos

4. **JŪROS VANDUO:**

Šaltinis:

Ėmimo data:

Ėmimo gylis:

Išvaizda ėmimo momentu (pvz., drumstas ir kt.):

Druskingumas ėmimo momentu: ‰

Temperatūra ėmimo momentu: °C

DOC, praėjus x valandų po paėmimo: mg/l

Apdorojimas prieš bandymą (pvz., filtravimas, sedimentacija, sendinimas ir kt.):

Mikroorganizmų kolonijų skaičius — pradinis ėminys: kolonijų/ml

— bandymo pradžioje: kolonijų/ml

Kitos charakteristikos:

5. **BANDYMO TERPĖ:**

Temperatūra po aeravimo: °C

O₂ koncentracija po aeravimo ir stovint prieš bandymo pradžią: mg O₂/l

6. **DO NUSTATYMAS:**

Metodas: Vinklerio ar elektrometrinis metodas

	Kolba Nr.		mg O ₂ /l po n dienų			
			0	5	15	28
Bandymas: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis ir bandomąja chemine medžiaga	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Bandinio su bandomąja medžiaga vidutinė vertė	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Kolba Nr.		mg O ₂ /l po <i>n</i> dienų			
			0	5	15	28
Tuščiasis ėminys: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis, bet be bandomosios cheminės medžiagos	1	c_1				
	2	c_2				
	Tuščiojo bandominio vidutinė vertė	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Pastaba: panašus formatas gali būti taikomas etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams ėminiams.

7. **DO SUVARTOJIMAS. SKAIDYMO % (% D):**

	DO suvartojimas po <i>n</i> dienų		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ ⁽¹⁾			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) \text{ } ^{(1)}}{\text{bandomoji cheminė medžiaga (mg /l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

- ⁽¹⁾ Daroma prielaida, kad $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, čia
 $m_{b(0)}$ – tuščiojo ėminio vertė 0 dieną,
 $m_{t(0)}$ – bandomosios cheminės medžiagos vertė 0 dieną.
Jei $m_{b(0)}$ nelygi $m_{t(0)}$, naudojama $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, čia
 $m_{b(x)}$ – tuščiojo ėminio vertė *x* dieną,
 $m_{t(x)}$ – bandomosios cheminės medžiagos vertė *x* dieną.

**C.43. ORGANINIŲ JUNGINIŲ ANAEROBINIS BIOLOGINIS SKAIDUMAS SUSKAIDYTAME DUMBLE.
DUJŲ SUSIDARYMO MATAVIMO METODAS****ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 311 (2006). Yra keli atrankos bandymai organinių cheminių medžiagų aerobiniam biologiniam skaidumui vertinti (C.4, C.9, C.10 ir C.11 (1) bandymo metodai bei EBPO TG 302C (2)), ir šių metodų taikymo rezultatai buvo sėkmingai taikomi cheminių medžiagų kitimui aerobinėje aplinkoje, ypač aerobinėse nuotekų apdorojimo stadijose, prognozuoti. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos, taip pat tos, kurios adsorbuojamos ant nuotekų kietųjų dalelių, įvairiu santykiu apdorojamos aerobinėmis sąlygomis, nes šių cheminių medžiagų yra nusodintame dumble. Tačiau didžiąją šių cheminių medžiagų dalį suriša pirminis nusodintas dumblas, kuris atskiriamas nuo neapdorotų nuotekų nusodintuve prieš tai, kaip nusodintos arba virš nuosėdų esančios nuotekos apdorojamos aerobiškai. Dumblas, turintis šiek tiek tirpių cheminių medžiagų porų skystyje, tiekiamas į kaitinamus pūdytuvus, kad būtų anaerobiškai apdorotas. Šioje serijoje dar nėra anaerobinio biologinio skaidumo anaerobiniuose pūdytuvuose vertinimo bandymų, todėl šio bandymo tikslas yra užpildyti šią spragą; jis nebūtinai tinka kitoms bedegumonėms aplinkos terpėms.
2. Respirometriniai metodai, kuriais matuojamas anaerobinėmis sąlygomis susidarantių dujų, daugiausia metano (CH_4) ir anglies dioksido (CO_2), kiekis, buvo sėkmingai taikomi anaerobiniam biologiniam skaidumui vertinti. Birch ir kt. (3) apžvelgė šias procedūras ir padarė išvadą, kad išsamiausias buvo ankstesniais tyrimais (5)(6)(7) pagrįstas Shelton ir Tiedje darbas(4). Metodas (4), kurį toliau tobulino kiti (8) ir kuris tapo Amerikos standartais (9)(10), neišsprendė problemų, susijusių su skirtingu CO_2 ir CH_4 tirpumu bandymo terpėje ir su teorinio dujų susidarymo iš bandomosios cheminės medžiagos skaičiavimu. ECETOC ataskaitoje (3) rekomenduojamas papildomas skystyje virš nuosėdų ištirpusios neorganinės anglies (DIC) kiekio matavimas, kuris išplečia metodo taikymą. Buvo atliktas tarptautinis ECETOC metodo kalibravimas (arba tarplaboratorinis bandymas) ir metodas tapo ISO standartu ISO 11734 (11).
3. Šiame bandymo metode, kuris pagrįstas ISO 11734 (11), aprašomas atrankos metodas, kuriuo būtų įvertintas organinių cheminių medžiagų potencialus anaerobinis biologinis skaidumas specifinėmis sąlygomis (t. y. anaerobiniame pūdytuve tam tikru laiku ir esant tam tikram mikroorganizmų koncentracijos intervalui). Kadangi naudojamas praskiestas dumblas su palyginti didele bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir bandymo trukmė paprastai yra ilgesnė nei išlaikymo anaerobiniuose pūdytuvuose trukmė, bandymų sąlygos nebūtinai atitinka anaerobinių pūdytuvų sąlygas ir bandymas netinka organinių cheminių medžiagų anaerobiniam biologiniam skaidumui skirtingomis aplinkos sąlygomis vertinti. Dumblas veikiamas bandomąja chemine medžiaga iki 60 dienų, ir tai yra ilgiau nei normali dumblo išlaikymo anaerobiniuose pūdytuvuose trukmė (nuo 25 iki 30 dienų), nors išlaikymo pramoniniuose įrenginiuose trukmė gali būti gerokai didesnė. Prognozė atsižvelgiant į šio bandymo rezultatus nėra tokia patikima kaip aerobinio biologinio skaidymo atveju, nes duomenų apie bandomųjų cheminių medžiagų elgseną atliekant „lengvo“ aerobinio skaidymo bandymus bei modeliavimo bandymus ir apie aerobinę aplinką pakanka, kad nekiltų abejonių dėl ryšio buvimo; anaerobinei aplinkai tokių panašių duomenų yra mažai. Galima daryti prielaidą, kad vyksta visiškas anaerobinis biologinis skaidymas, jei dujų gamyba pasiekia 75 %–80 % jų teorinio kiekio. Šiame bandyme taikomi dideli cheminės medžiagos ir biomasės santykiai reiškia, kad cheminė medžiaga, kuri virsta dujomis, turi didesnę suskaidymo anaerobiniame pūdytuve tikimybę. Be to, cheminės medžiagos, kurios bandymo sąlygomis nevirsta dujomis, nebūtinai išliktų esant aplinkos sąlygas labiau atitinkantiems cheminės medžiagos ir biomasės santykiams. Taip pat yra kitų anaerobinių reakcijų, kurioms vykstant cheminės medžiagos gali būti suskaidytos bent iš dalies, pvz., chloro eliminavimo reakcija, bet šiuo bandymu tokios reakcijos neaptinkamos. Tačiau taikant specifinius analizės metodus bandomajai cheminei medžiagai nustatyti, jos išnykimą galima stebėti (žr. 6, 30, 44 ir 53 pastraipas).

BANDYMO PRINCIPAS

4. Mažos (< 10 mg/l) neorganinės anglies (IC) koncentracijos išplautas pūdytas dumblas ⁽¹⁾ maždaug dešimt kartų skiedžiamas taip, kad suminė kietųjų dalelių koncentracija būtų nuo 1 g/l iki 3 g/l, ir iki 60 dienų

⁽¹⁾ Pūdytas dumblas yra nusodintų nuotekų fazių ir aktyviojo dumblo mišinys, inkubuotas anaerobiniame pūdytuve maždaug 35 °C, kad būtų sumažintas biomasės kiekis ir išspręstos kvapo problemos bei pagerinta vandens šalinimo geba. Jį sudaro anaerobinių rūgimo ir metanogeninių bakterijų derinys, gaminantis anglies dioksidą ir metaną (11).

inkubuojamas $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje uždaruose induose su nuo 20 iki 100 mg C/l bandomosios cheminės medžiagos. Į dumblo aktyvumą atsižvelgiama matuojant lygiagrečius tuščiuosius kontrolinius ėminius su dumblo sėjiniu terpėje, bet be bandomosios cheminės medžiagos.

5. Matuojamas indo tuščiosios erdvės slėgio didėjimas dėl anglies dioksido ir metano susidarymo. Bandymų sąlygomis didžioji susidariusio CO_2 dalis ištirps skystojoje fazėje arba virs karbonatu arba hidrokarbonatu. Ši neorganinė anglis matuojama baigus bandymą.
6. Dėl bandomosios cheminės medžiagos skaidymo gautas anglies (neorganinės ir metano) kiekis apskaičiuojamas, iš susidariusių dujų kiekio ir IC kiekio skystojoje fazėje atėmus tuščiojo kontrolinio bandinio vertes. Biologinio skaidymo laipsnis apskaičiuojamas pagal gautą suminį IC ir metano anglies kiekį kaip išmatuoto arba apskaičiuoto įdėtos cheminės medžiagos anglies kiekio procentinė dalis. Biologinio skaidymo eigą galima stebėti atliekant tik susidariusių dujų kiekio tarpinius matavimus. Be to, pradinį biologinį skaidymą galima nustatyti atliekant specifinę analizę bandymo pradžioje ir pabaigoje.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

7. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos grynumo, tirpumo vandenyje, lakumo ir adsorbcijos charakteristikas, kad būtų galima tinkamai aiškinti rezultatus. Reikia žinoti bandomosios cheminės medžiagos organinės anglies kiekį (% m/m) pagal cheminę sandarą arba matuojant. Ar bandymas tinka lakiosioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, padėtų spręsti išmatuota arba apskaičiuota Henrio dėsnio konstanta. Naudinga turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobinėms bakterijoms, kad būtų galima pasirinkti tinkamą bandymo koncentraciją ir aiškinti mažo biologinio skaidumo rezultatus. Rekomenduojama įtraukti inhibavimo kontrolinį bandinį, išskyrus atvejus, kai yra žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra anaerobinės mikroorganizmų veiklos inhibitorius (žr. 21 pastraipą ir ISO 13641-1 (12)).

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

8. Bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms, taip pat jis tinka mažai tirpioms ir netirpioms cheminėms medžiagoms, jei taikomas tikslus dozavimo metodas, pvz., žr. ISO 10634 (13). Sprendimas dėl lakiųjų medžiagų dažniausiai turi būti priimamas kiekvienu atveju atskirai. Gali tekti imtis specialių priemonių, pvz., neišleisti dujų bandymo eigoje.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Procedūrai išbandyti bandoma etaloninė cheminė medžiaga lygiagrečiai įrengiant atitinkamus indus kaip normalių bandymų dalį. Pavyzdžiui, tinka fenolis, natrio benzenkarboksilatas ir polietilenglikolis 400, kurių skaidymas per 60 dienų turėtų pasiekti daugiau kaip 60 % teorinio dujų kiekio (t. y. metano ir neorganinės anglies) (3)(14).

BANDYMO REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

10. Atliekant tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (14), buvo gautas geras trijų kartotinių bandymo indų dujų slėgio matavimo atkuriamumas. Santykinis standartinis nuokrypis (variacijos koeficientas, COV) paprastai buvo mažesnis kaip 20 %, nors ši vertė dažnai padidėdavo iki > 20 % esant toksinėms cheminėms medžiagoms arba arti 60 dienų inkubavimo laikotarpio pabaigos. Taip pat didesni nuokrypiai buvo nustatyti indams, kurių tūris < 150 ml. Galutinės bandymo terpės pH vertės buvo nuo 6,5 iki 7,0.

11. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą buvo gauti šie rezultatai.

Bandomoji cheminė medžiaga	Visi duomenys n_1	Vidutinis skaidymas (visų duomenų) (%)	Santykinis standartinis nuokrypis (visų duomenų) (%)	Tinkami duomenys n_2	Vidutinis skaidymas (tinkamų duomenų) (%)	Santykinis standartinis nuokrypis (tinkamų duomenų) (%)	Tinkamų bandymų skaidymo duomenys > 60 % n_3
Palmitino rūgštis	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19,70 % (*)
Polietilenglikolis 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24,83 % (*)

(*) n_2 dalis.

12. Vidutinės vertės variacijos koeficientai, gauti palmitino rūgščiai ir polietilenglikoliui 400, buvo atitinkamai 45 % ($n = 36$) ir 35 % ($n = 38$). Atmetus < 40 % ir > 100 % vertes (dėl pirmosios daroma prielaida, kad sąlygos blogesnės nei normalios, antrosios – dėl nežinomų priežasčių), COV atitinkamai sumažėjo iki 26 % ir 23 %. Palmitino rūgščiai gautų „tinkamų“ verčių, kai skaidymas ne mažesnis kaip 60 %, dalis buvo 70 %, o polietilenglikoliui 400 – 83 %. Pagal DIC matavimus gautos biologinio skaidymo procentinės dalys buvo palyginti mažos, bet kintamos. Palmitino rūgščiai gautas intervalas buvo 0–35 %, vidutinė vertė 12 %, kai COV 92 %, o polietilenglikoliui 400 0–40 %, vidutinė vertė 24 %, kai COV 54 %.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

13. Reikalinga įprasta laboratorinė įranga ir:

- inkubatorius, kuris nekibirkščiuoja ir kurio reguliuojama temperatūra yra $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- reikiamo nominalaus tūrio slėginiai stikliniai bandymo indai ⁽¹⁾, galintys išlaikyti maždaug 2 bar ir turintys orui sandarią membraną. Viršutinės erdvės tūris turėtų būti maždaug nuo 10 % iki 30 % viso tūrio. Jei biodujos išleidžiamos reguliariai, pakanka maždaug 10 % viršutinės erdvės tūrio, bet jei dujos išleidžiamos tik baigiant bandymą, reikiamas tūris turi būti 30 %. Kai slėgis mažinamas kiekvieną kartą imant ėminį, rekomenduojami stikliniai serumo buteliai, kurių nominalus tūris 125 ml, visas tūris maždaug 160 ml, užkimšti serumo membrana ⁽²⁾ ir užspausti aliuminio žiedais;
- slėgmatis ⁽³⁾, pritaikytas susidariusių dujų slėgiui matuoti ir jas išleisti, pvz., rankinis precizinis slėgmatis, prijungtas prie tinkamos švirkšto adatos; dujoms sandarus trišakis vožtuvas palengvina perteklinio slėgio mažinimą (1 priedėlis). Būtina, kad slėgio keitlio, vamzdžių ir vožtuvo vidinis tūris būtų kuo mažesnis, kad paklaidos dėl įrangos tūrio nepaisymo būtų nereikšmingos;

⁽¹⁾ Rekomenduojamas tūris nuo 0,1 litro iki 1 litro.

⁽²⁾ Rekomenduojama naudoti dujoms sandarias polisiloksano membranas. Be to, rekomenduojama tikrinti gaubtelių sandarumą dujoms, ypač butilkaučiuko membranų, nes kelios komercinės membranos nėra pakankamai sandarios metano dujoms, o kai kurios membranos nustoja būti sandarios, kai bandymų sąlygomis jos praduriamos adata.

⁽³⁾ Įtaisas turėtų būti naudojamas ir reguliariais laiko tarpais kalibruojamas pagal gamintojo instrukcijas. Jei naudojamas nustatytos kokybės slėgmatis, pvz., sandarintas plienine membrana, laboratorijoje jo kalibruoti nereikia. Kalibravimo tikslumą galima patikrinti laboratorijoje, vieną slėgio vertę 1×10^5 Pa matuojant slėgmačio su mechaniniu indikatoriumi atžvilgiu. Kai ši vertė matuojama tiksliai, tiesiškumas taip pat išliks nepakitęs. Jei naudojami kiti matavimo įtaisai (be sertifikuoto gamintojo kalibravimo), rekomenduojama kalibruoti visą diapazoną reguliariais intervalais.

Pastaba. Slėgio rodmenys tiesiogiai naudojami viršutinėje erdvėje susidariusios anglies kiekiui apskaičiuoti (nuo 42 iki 44 pastraipos). Arba, naudojant perskaičiavimo grafiką, slėgio rodmenis galima perskaičiuoti į susidariusių dujų tūrius (35 °C, atmosferos slėgis). Šis grafikas sudarytas pagal duomenis, gautus į grupę bandymo indų (pvz., serumo butelių) įpurškiant žinomus azoto dujų tūrius 35 ± 2 °C temperatūroje ir užrašant gautus stabilizuoto slėgio rodmenis (žr. 2 priedėlį). Skaiciavimas pateiktas 44 pastraipos pastaboje.

Ispėjimas. Būkite atsargūs – neįsidurkite mikrošvirkšto adata.

- d. Anglies analizatorius, tinkamas tiesiogiai nustatyti neorganinę anglį nuo 1 mg/l iki 200 mg/l;
- e. Didelio preciziškumo dujų ir skysčių ėminių švirkštai;
- f. Magnetinės maišyklės ir magnetai (neprivaloma);
- g. Apsauginė kamera su pirštinėmis (rekomenduojama).

Reagentai

- 14. Naudojami tik analiziškai grynai reagentai.

Vanduo

- 15. Distiliuotas arba dejonizuotas vanduo (degazuotas prapučiant azoto dujas, turinčias mažiau kaip 5 µl/l deguonies), turintis mažiau kaip 2 mg/l ištirpusios organinės anglies (DOC).

Bandymo terpė

- 16. Ruošiama skiedimo terpė, kurią sudarytų šios sudedamosios dalys nurodytais kiekiais

Bevandenio kalio divandenilio fosfatas (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatrio vandenilio fosfato dodekahidratas ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
Amonio chloridas (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcio chlorido dihidratas ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g
Magnio chlorido heksahidratas ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Geležies (II) chlorido tetrahidratas ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
Rezazurinas (deguonies indikatorius)	0,001 g
Natrio sulfido nonahidratas ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Pradinis mikroelementų tirpalas (neprivalomas, 18 pastraipa)	10 ml
Skiedžiama degazuotu vandeniu (15 pastraipa)	iki 1 litro

Pastaba. Reikėtų naudoti tik ką gautą natrio sulfidą arba prieš naudojant jį reikėtų išplauti ir išdžiovinti, kad būtų užtikrinta pakankama redukcinė geba. Bandymą galima atlikti nenaudojant apsauginės kameros su pirštinėmis (žr. 26 pastraipą). Šiuo atveju terpės galutinė natrio sulfido koncentracija turėtų būti padidinta iki 0,20 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ litrui. Natrio sulfidą taip pat galima įpilti per uždarytų bandymo indų membraną kaip atitinkamą pradinį anaerobinį natrio sulfido tirpalą, nes ši procedūra sumažins oksidacijos riziką. Natrio sulfidą galima pakeisti titano (III) citratu, kuris įpilamas per uždarytų bandymo indų membraną, kad būtų gauta nuo 0,8 iki 1,0 mmol/l galutinė koncentracija. Titano (III) citratas yra labai efektyvus ir mažai toksiškas redukavimo

agentas, kuris ruošiamas taip: 2,94 g trinario citrato dihidrato ištirpinama 50 ml degazuoto vandens (kad būtų gautas 200 mmol/l tirpalas) ir įpilama 5 ml 15 % (m/V) titano (III) chlorido tirpalo. Neutralizuojama iki pH $7 \pm 0,2$ neorganiniu šarmu ir azoto srovėje supilama į tinkamą indą. Šio pradinio titano (III) citrato tirpalo koncentracija yra 164 mmol/l.

17. Bandymo terpės komponentai sumaišomi, išskyrus redukavimo agentą (natrio sulfidą ar titano citratą) ir prieš pat naudojant tirpalą per jį maždaug 20 min pučiamos azoto dujos deguoniui pašalinti. Tada įpilamas naujai paruošto redukavimo agento tirpalo reikiamas tūris (paruoštas degazuotame vandenyje) iš karto prieš naudojant terpę. Prireikus reguliuojama terpės pH vertė praskiestu neorganinės rūgšties ar šarmo tirpalu iki $7 \pm 0,2$.

Pradinis mikroelementų tirpalas (neprivalomas)

18. Rekomenduojama bandymo terpėje turėti šių mikroelementų, kad pagerėtų anaerobinio skaidymo procesas, ypač, jei naudojama maža (pvz., 1 g/l) sėjinio koncentracija (11).

Mangano chlorido tetrahidratas ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Boro rūgštis (H_3BO_3)	5 mg
Zinko chloridas (ZnCl_2)	5 mg
Vario (II) chloridas (CuCl_2)	3 mg
Dinatrio molibdato dihidratas ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Kobalto chlorido heksahidratas ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Nikelio chlorido heksahidratas ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Dinatrio selenitas (Na_2SeO_3)	5 mg
Skiedžiama degazuotu vandeniu (15 pastraipa)	iki 1 litro

Bandomoji cheminė medžiaga

19. Bandomoji medžiaga įdedama kaip pradinis tirpalas, suspensija, emulsija arba tiesiogiai kaip kieta medžiaga arba skystis, arba adsorbuota ant stiklo pluošto filtro, kad būtų gauta ne didesnė kaip 100 mg/l organinės anglies koncentracija. Jei naudojami pradiniai tirpalai, vandenyje (15 pastraipa) (iš kurio prieš tai pašalinamas deguonis, prapučiant azoto dujas) ruošiamas tokios koncentracijos tinkamas tirpalas, kad įpilamo tirpalo tūris būtų mažesnis kaip 5 % viso reakcijos mišinio tūrio. Prireikus reguliuojama terpės pH vertė iki $7 \pm 0,2$. Dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurios mažai tirpsta vandenyje, žr. ISO 10634 (13). Jei naudojamas tirpiklis, ruošiamas papildomas kontrolinis ėminys, kurį sudarytų tik tirpiklis apsėtoje terpėje. Reikėtų vengti naudoti organinius tirpiklius, kurie yra žinomi kaip metano susidarymo inhibitoriai, pvz., chloroformą ir anglies tetrachloridą.

Ispėjimas. Reikia atsargiai elgtis su toksinėmis ir nežinomų savybių bandomosiomis cheminėmis medžiagomis.

Etaloninės cheminės medžiagos

20. Procedūrai kontroliuoti sėkmingai naudojamos etaloninės cheminės medžiagos, pvz., natrio benzenkarboksilat, fenolis ir polietilenglikolis 400, kurių skaidymas per 60 dienų yra didesnis kaip 60 %. Pasirinktos etaloninės cheminės medžiagos pradinis tirpalas (degazuotame vandenyje) ruošiamas taip pat, kaip bandomosios cheminės medžiagos tirpalas, ir prireikus nustatoma pH $7 \pm 0,2$ vertė.

Inhibavimo kontrolinis ėminys (jei reikia)

21. Norint gauti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobiniams mikroorganizmams, kad būtų galima nustatyti tinkamiausią bandymo koncentraciją, į indą su bandymo terpe dedama bandymo koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga ir etaloninė cheminė medžiaga (žr. 16 pastraipą) (žr. 19 ir 20 pastraipas, taip pat ISO 13641-1 (12)).

Pūdytas dumblas

22. Pūdytas dumblas paimamas iš nuotekų valymo įrenginio pūdytuvo, daugiausia apdorojančio buitines nuotekas. Dumblas turėtų būti išsamiai apibūdintas ir pagrindinė informacija turėtų būti pateikta ataskaitoje (žr. 54 pastraipą). Jei numatoma naudoti pritaikytą sėjinį, galima naudoti pūdytą dumblą iš pramoninių nuotekų valymo įrenginio. Pūdytas dumblas imamas į plačiakaklius butelius, pagamintus iš didelio tankio polietileno arba panašios plėstis galinčios medžiagos. Dumblo pridedama iki maždaug 1 cm nuo butelio viršaus ir butelis sandariai uždaromas, pageidautina, apsauginiu vožtuvu. Atvežtas į laboratoriją surinktas dumblas gali būti naudojamas tiesiogiai arba dedamas į laboratorinį pūdytuvą. Perteklinės biudujos išleidžiamos atsargiai atidarant butelius su dumbliu. Arba, kaip sėjinio šaltinį, galima naudoti laboratorijoje subrandintą anaerobinį dumblą, bet jo aktyvumo diapazonas gali būti mažesnis.

Ispėjimas. Iš pūdyto dumblo skiriasi degiosios dujos, kurios kelia gaisro ir sprogimo riziką; be to jame yra potencialiai patogeniškų organizmų, todėl, dirbant su dumbliu, reikia imtis tinkamų apsauginių priemonių. Dėl saugos negalima dumblo rinkti į stiklinius indus.

23. Siekiant sumažinti foninę dujų gamybą ir tuščiųjų kontrolinių ėminių įtaką, galbūt reikėtų atlikti dumblo pradinį pūdymą. Jei reikia atlikti pradinį pūdymą, nepridedant jokių mitybinių medžiagų arba substratų, dumblas turėtų būti paliekamas pūti $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki 7 dienų. Nustatyta, kad maždaug po 5 dienų pradinio pūdymo, paprastai optimaliai sumažėja tuščiojo ėminio dujų gamyba, bet nepriimtina nepailegėja bandomojo tarpsnio vėlavimo arba inkubavimo laikotarpiai ar nemažėja aktyvumas mažo bandytų cheminių medžiagų skaičiaus atžvilgiu.
24. Jei bandomųjų cheminių medžiagų biologinis skaidumas yra arba manoma, kad gali būti mažas, sprendžiama dėl pradinės dumblo ekspozicijos bandomąja chemine medžiaga, kad būtų gautas geriau pritaikytas sėjinys. Tokiu atveju bandomoji cheminė medžiaga, kurios organinės anglies koncentracija yra nuo 5 mg/l iki 20 mg/l, dedama į pūdytą dumblą ir inkubuojama iki 2 savaitių. Prieš naudojant dumblą po pradinės ekspozicijos, jis gerai išplaunamas (žr. 25 pastraipą), o bandymo ataskaitoje nurodomos pradinės ekspozicijos sąlygos.

Sėjinys

25. Prieš pat naudojant dumblas plaunamas (žr. nuo 22 iki 24 pastraipas), kad IC koncentracija galutinėje bandymo suspensijoje sumažėtų iki mažiau kaip 10 mg/l. Dumblas centrifuguojamas užkimštuose mėgintuvėliuose (pvz., 3 000 g, trukmė 5 min) ir tirpalas virš nuosėdų išpilamas. Gaunama centrifugavimo nuosėdų suspensija degazuotoje terpėje (16 ir 17 pastraipos), suspensija pakartotinai centrifuguojama ir tirpalas virš nuosėdų išpilamas. Jei IC sumažėjo nepakankamai, dumblo plovimo procedūra galėtų būti pakartota ne daugiau kaip du kartus. Neatrodė, kad tai galėtų neigiamai veikti mikroorganizmus. Pagaliau centrifugavimo nuosėdos suspenduojamos reikiamame bandymo terpės tūryje ir nustatoma suminė kietųjų medžiagų koncentracija [pvz., ISO 11923 (15)]. Galutinė suminė kietųjų medžiagų koncentracija bandymo induose turėtų būti nuo 1 g/l iki 3 g/l (arba maždaug 10 % nepraskiesto pūdyto dumblo kietųjų medžiagų koncentracijos). Pirmiau nurodyti veiksmams atliekami taip, kad dumblo sąlytis su deguonimi būtų kuo mažesnis (pvz., naudojama azoto atmosfera).

BANDYMO PROCEDŪRA

26. Atliekamos šios pradinės procedūros, taikant metodus, kurie užtikrintų kuo mažesnę pūdyto dumblo ir deguonies sąlytį, pvz., gali tekti dirbti apsauginės kameros su pirštinėmis viduje azoto dujų atmosferoje ir (arba) prapūsti butelius azotu (4).

Bandomųjų ir kontrolinių ėminių ruošimas

27. Ruošiami ne mažiau kaip trys bandomosios cheminės medžiagos, tuščiųjų kontrolinių ėminių, etaloninės cheminės medžiagos, inhibavimo kontrolinių ėminių (jei reikia) bandymo indai (žr. 13-b pastraipą) ir slėgio kontrolės kameros (neprivaloma procedūra) (žr. 7 ir nuo 19 iki 21 pastraipas). Taip pat galima paruošti papildomus indus, norint įvertinti pradinį biologinį skaidymą, taikant specifinius bandomosios cheminės medžiagos analizės metodus. Vieną tuščiųjų kontrolinių ėminių rinkinį galima panaudoti kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms atliekant tą patį bandymą, jei atitinka viršutinės erdvės tūriai.

28. Ruošiamas praskiestas sėjinys ir įpilamas į indus, pvz., naudojant pipetę plačia anga. Gerai sumaišyto sėjinio alikvotinės dalys (25 pastraipa) įpilamos taip, kad suminė kietųjų medžiagų koncentracija būtų vienoda visuose induose (nuo 1 g/l iki 3 g/l). Įpilami bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų pradiniai tirpalai, prieš tai nustatčius pH $7 \pm 0,2$, jei būtina. Bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga įdedamos tinkamiausiu naudojimo būdu (19 pastraipa).
29. Organinės anglies bandymo koncentracija paprastai turėtų būti nuo 20 mg/l iki 100 mg/l (4 pastraipa). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksinė, bandymo koncentraciją reikėtų sumažinti iki 20 mg C/l arba iki dar mažesnės koncentracijos, jei reikia išmatuoti tik pradinį biologinį skaidymą, taikant specifinę analizę. Reikėtų pastebėti, kad bandymo rezultatų kintamumas didėja mažėjant bandymo koncentracijai.
30. Į indus su tuščiaisiais ėminiais vietoje pradinio tirpalo, suspensijos arba emulsijos įpilamas ekvivalentinis nešiklio kiekis, naudojamas bandomajai medžiagai dozuoti. Jei bandomoji cheminė medžiaga buvo įdedama naudojant stiklo pluošto filtrus arba organinius tirpiklius, į tuščiąjį ėminį įdedamas filtras arba ekvivalentinis tūris tirpiklio, kuris buvo išgarintas. Paruošiamas papildomas kartotinis bandinys su bandomąja chemine medžiaga pH vertei matuoti. Prireikus reguliuojama pH vertė iki $7 \pm 0,2$, nedideliais praskiesto neorganinės rūgšties ar šarmo tirpalo kiekiais. Į visus bandymo indus turėtų būti įpiltas toks pats neutralizavimo agentų kiekis. Šių tirpalų neturėtų prireikti įpilti, nes bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos pradinį tirpalų pH vertė vieną kartą jau buvo nustatyta (žr. 19 ir 20 pastraipas). Jei reikia matuoti pradinį biologinį skaidymą, tinkamą ėminį reikėtų imti iš pH kontrolės indo arba iš papildomo bandymo indo ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti išmatuota taikant specifinę analizę. Į visus indus galima įdėti aptrauktus magnetus, jei reakcijos mišinius reikia maišyti (neprivaloma).
31. Būtina užtikrinti, kad suminis skysčio tūris V_1 ir viršutinės erdvės tūris V_h būtų vienodi visuose induose; V_1 ir V_h vertės įsimenamos ir užrašomos. Visus indus reikėtų uždaryti dujoms imti skirta membrana ir pernešti iš apsauginės kameros su pirštinėmis (žr. 26 pastraipą) į inkubatorių (žr. 13-a pastraipą).

Netirpios bandomosios cheminės medžiagos

32. Vandenyje mažai tirpių cheminių medžiagų pasverti kiekiai dedami tiesiogiai į paruoštus indus. Kai būtinas tirpiklis (žr. 19 pastraipą), bandomosios cheminės medžiagos tirpalas ar suspensija pilami į tuščius indus. Jei įmanoma, tirpiklis išgarinamas, į indus pučiant azoto dujas, ir tada pridedami kiti komponentai, t. y. praskiestas dumblas (25 pastraipa) ir degazuotas vanduo, jei reikia. Taip pat turi būti paruoštas papildomas tirpiklio kontrolinis ėminys (žr. 19 pastraipą). Kitų netirpių medžiagų pridėjimo būdų galima paieškoti ISO 10634 (13). Skystas bandomąsias chemines medžiagas galima įšvirkšti į visiškai paruoštus uždarytus indus, jei manoma, kad pradinė pH vertė nėra didesnė kaip 7 ± 1 , priešingu atveju dozuojama, kaip aprašyta pirmiau (žr. 19 pastraipą).

Inkubavimas ir dujų slėgio matavimas

33. Paruošti indai inkubuojami $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje maždaug 1 h, kad nusistovėtų pusiausvyra ir į atmosferą būtų išleistos perteklinės dujos, pvz., iš eilės kratomas kiekvienas indas, per membraną įstatoma slėgmačio adata (13-c pastraipa) ir vožtuvas laikomas atidarytu tol, kol slėgmatis rodo nulį. Jei šioje stadijoje ar atliekant tarpinius matavimus viršutinės erdvės slėgis yra mažesnis nei atmosferos, reikėtų pripūsti azoto dujų, kad būtų atstatytas atmosferos slėgis. Vožtuvas uždaromas (žr. 13-c pastraipą) ir inkubavimas tamsoje tęsiamas užtikrinant, kad visos indų dalys būtų pūdymo temperatūros. Indai apžiūrimi po inkubavimo nuo 24 iki 48h. Indai atmetami, jei skysčio virš nuosėdų spalva yra ryškiai rausva, t. y. jei rezazurinas (žr. 16 pastraipą) pakeitė spalvą, rodydamas deguonies buvimą (žr. 50 pastraipą). Nors nedideli deguonies kiekiai sistemai gali nepakenkti, didesnė jo koncentracija gali sukelti stiprų anaerobinio biologinio skaidymo inhibavimą. Atsitiktinio atskiros trijų ėminių rinkinio indo atmetimas gali būti priimtinas, bet esant didesniai nei šis trijų skaičiui bandymo procedūros turi būti ištirtos ir bandymas pakartotas.

34. Kiekvieno indo turinys atsargiai maišomas kelias minutes plakant arba purtant mažiausiai nuo 2 iki 3 kartų per savaitę ir prieš pat slėgio matavimą. Purtant sėjinys vėl suspenduojamas ir užtikrinama dujų pusiausvyra. Visi slėgio matavimai turėtų būti atliekami greitai, nes gali sumažėti bandymo indų temperatūra ir būtų gauti klaidingi rodmenys. Matuojant slėgį, viso bandymo indo, įskaitant viršutinę erdvę, temperatūra turėtų būti pūdymo temperatūros. Dujų slėgis matuojamas, pvz., įstatant per membraną švirkšto adatą (13-c pastraipą), prijungtą prie slėgio matuoklio. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad vanduo nepatektų į švirkšto adatą; jei taip atsitinka, šlapias dalis reikėtų išdžiovinti ir įstatyti naują adatą. Slėgį reikėtų matuoti milibaraais (žr. 42 pastraipą). Dujų slėgį induose galima matuoti periodiškai, pvz., kas savaitę, ir perteklines dujas galima išleisti į atmosferą. Arba slėgis matuojamas tik bandymo pabaigoje, kad būtų nustatytas gautų dujų kiekis.
35. Rekomenduojama gauti tarpinius dujų slėgio rodmenis, nes slėgio didėjimas suteikia informacijos apie tai, kada bandymą galima baigti, ir sudaro sąlygas stebėti kinetiką (žr. 6 pastraipą).
36. Paprastai bandymas baigiamas po 60 dienų inkubavimo laikotarpio, išskyrus atvejus, kai matuojant slėgį gauta biologinio skaidymo kreivė pasiekia pastoviosios būsenos tarpsnį anksčiau; tai yra tarpsnis, kuriame pasiekiamas maksimalus skaidymas ir biologinio skaidymo kreivė išsilygina. Jei pastoviosios būsenos vertė yra mažesnė kaip 60 %, aiškinimas yra problemiškas, nes tai rodo, kad mineralizuota tik dalis molekulių arba yra padaryta klaida. Jei įprastinio inkubavimo laikotarpio pabaigoje dujos vis dar susidaro, bet pastoviosios būsenos tarpsnis akivaizdžiai nepasiektas, reikėtų spręsti apie bandymo pratęsimą, kad būtų galima patikrinti, ar bus pasiekta plokščioji sritis (> 60 %).

Neorganinės anglies matavimas

37. Po paskutinio dujų slėgio matavimo bandymo pabaigoje dumblas paliekamas nusėsti. Iš eilės atidaromi visi indai ir nedelsiant imamas ėminys neorganinės anglies (IC) koncentracijai (mg/l) skystyje virš nuosėdų nustatyti. Skysčio virš nuosėdų nereikėtų nei centrifuguoti, nei filtruoti, nes būtų nepriimtini ištirpusio anglies dioksido nuostoliai. Jei skysčio negalima analizuoti paėmus ėminį, jį, atvėsintą iki maždaug 4 °C, galima laikyti iki 2 dienų uždarytame buteliuke, kuriame nėra viršutinės erdvės. Išmatavus IC, matuojama ir užrašoma pH vertė.
38. IC skystyje virš nuosėdų taip pat galima nustatyti netiesiogiai, ištirpusią IC išskiriant kaip anglies dioksidą, kurį galima išmatuoti viršutinėje erdvėje. Po paskutinio dujų slėgio matavimo kiekviename iš bandymo indų nustatomas atmosferos slėgis. Kiekvieno indo turinys parūgštinamas iki maždaug pH 1, per uždarytų indų membraną įpilant koncentruotos neorganinės rūgšties (pvz., H₂SO₄). Purdomi indai inkubuojami 35 °C ± 2 °C temperatūroje maždaug 24 h ir slėgmačiu matuojamas dujų slėgio dėl išsiskyrusio anglies dioksido rodmuo.
39. Gaunami atitinkamo tuščiojo ėminio, pamatinės cheminės medžiagos ir, jei įtraukti, inhibavimo kontrolinio ėminio indų rodmenys (žr. 21 pastraipą).
40. Kartais, ypač, jei tie patys kontrolinių ėminių indai naudojami kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, reikėtų spręsti klausimą dėl tarpinių IC koncentracijos verčių matavimo bandymo ir kontroliniuose induose, jei tinka. Šiuo atveju visiems tarpiniams matavimams reikėtų paruošti pakankamą skaičių indų. Ši procedūra labiau priimtina palyginti su visų ėminių ėmimu tik iš vieno indo. Imti iš vieno indo galima tik tuo atveju, jei nelaikoma, kad reikiamas tūris DIC analizei atlikti yra per didelis. DIC reikėtų matuoti po dujų slėgio matavimo neišleidžiant perteklinių dujų, kaip aprašyta toliau:

— neatidarant indų, kiek įmanoma mažesni skysčio virš nuosėdų ėminiai imami švirkštu per membraną ir ėminyje nustatoma IC;

— paėmus ėminį, perteklinės dujos išleidžiamos arba neišleidžiamos;

- reikėtų atsižvelgti į tai, kad net dėl mažo skysčio virš nuosėdų tūrio sumažėjimo (pvz., apie 1 %) gali gerokai padidėti viršutinės erdvės dujų tūris (V_h);
- daroma lygčių (žr. 44 pastraipą) pataisa, jei reikia padidinant 3 lygties V_h .

Specifinė analizė

41. Jei turi būti nustatytas pradinis anaerobinis skaidymas (žr. 30 pastraipą), iš indų su bandomąja chemine medžiaga bandymo pradžioje ir pabaigoje imamas reikiamas ėminio tūris specifinei analizei atlikti. Jei tai daroma, reikia pastebėti, kad pakis viršutinės erdvės (V_h) ir skysčio (V_l) tūriai, ir į tai turi būti atsižvelgta skaičiuojant dujų susidarymo rezultatus. Specifinės analizės ėminius taip pat galima imti iš papildomų mišinių, iš anksto paruoštų šiam tikslui (30 pastraipą).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Dėl praktinių priežasčių dujų slėgis matuojamas milibara (1 mbar = 1 hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m²), tūris – litrais, o temperatūra – Celsijaus laipsniais.

Anglies kiekis viršutinėje erdvėje

43. Kadangi 1 mol metano ir 1 mol anglies dioksido turi po 12 g anglies, anglies masė tam tikrame išsiskyrusių dujų tūryje gali būti išreikšta taip:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad [1] \text{ lygtis}$$

čia:

m – anglies masė (mg) tam tikrame išsiskyrusių dujų tūryje;

12 – santykinė atominė anglies masė;

n – dujų molekulių skaičius tam tikrame tūryje.

Jei be metano ar anglies dioksido susidaro dideli kiekiai kitų dujų (pvz., N₂O), [1] formulę reikėtų pataisyti, kad būtų aprašytas galimas susidariusių dujų poveikis.

44. Pagal dujų dėsnius n galima išreikšti taip:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad [2] \text{ lygtis}$$

čia:

p – dujų slėgis (Paskaliais);

V – dujų tūris (m³);

R – molinė dujų konstanta [8,314]/(mol K);

T – inkubavimo temperatūra (Kelvinais).

Sujungiant [1] ir [2] lygtis ir atsižvelgiant į dujų susidarymą tuščiajame kontroliniame ėminyje, gaunama:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad [3] \text{ lygtis}$$

čia:

m_h – anglies, susidariusios kaip dujos viršutinėje erdvėje, neto masė (mg);

Δp – skirtumo tarp pradinio ir galutinio slėgio bandymo induose vidutinės vertės ir atitinkamos tuščiųjų ėminių vidutinės vertės skirtumas (milibara);

V_h – bandymo indo viršutinės erdvės tūris (l);

0,1 – niutonų/m² į milibarus ir m³ į litrus perskaičiavimo faktorius.

[4] lygtį reikėtų naudoti esant įprastinei inkubavimo 35 °C (308 K) temperatūrai:

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad [4] \text{ lygtis}$$

Pastaba: alternatyvus tūrio skaičiavimas. Slėgmačio rodmenys perskaičiuojami į susidariusių dujų ml pagal standartinę kreivę, gautą slėgmačio rodmenis pateikiant kaip įpurkštų dujų tūrio (ml) funkciją (2 priedėlis). Dujų molių skaičius (n) kiekvieno indo viršutinėje erdvėje apskaičiuojamas suminių pagamintų dujų tūrį (ml) dalijant iš 25 286 ml/mol, vieno dujų molio užimamo tūrio 35 °C temperatūroje ir esant standartiniam atmosferos slėgiui. Kadangi 1 mol metano ir 1 mol anglies dioksido turi po 12 g anglies, anglies masė (mg) viršutinėje erdvėje (m_h) gaunama pagal [5] lygtį:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad [5] \text{ lygtis}$$

Atsižvelgiant į dujų susidarymą tuščiajame kontroliniame ėminyje, gaunama:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad [6] \text{ lygtis}$$

čia:

m_h – anglies, susidariusios kaip dujos viršutinėje erdvėje, neto masė (mg);

DV – skirtumo tarp dujų, susidariusių bandymo indų ir tuščiojo kontrolinio bandinio indų viršutinėje erdvėje, tūrio vidutinė vertė;

25 286 – tūris, kurį užima 1 molis dujų, esant 35 °C ir 1 atmosferos slėgiui.

45. Biologinio skaidymo eigą galima stebėti suminių slėgio padidėjimą D_p (milibara) pateikiant kaip laiko funkciją, jei tinka. Iš šios kreivės identifikuojamas ir užrašomas eksponentinis tarpsnis (dienos). Eksponentinis tarpsnis yra laikas nuo bandymo pradžios iki reikšmingo skaidymo pradžios (pvz., žr. 3 priedėlį). Jei buvo imami ir analizuojami tarpiniai skysčio virš nuosėdų ėminiai (žr. 40, 46 ir 47 pastraipas), vietoje vien tik suminio slėgio grafike gali būti pateiktas suminis susidariusios C kiekis (dujose ir skystyje).

Skystyje esanti anglis

46. Į metano kiekį skystyje neatsižvelgiama, nes žinoma, kad jo tirpumas vandenyje yra labai mažas. Bandymo indų skysčio neorganinės anglies masė apskaičiuojama pagal [7] lygtį:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad [7] \text{ lygtis}$$

čia:

m_l – skysčio neorganinės anglies masė (mg);

C_{net} – neorganinės anglies koncentracija bandymo induose, atėmus jos koncentraciją kontroliniuose induose bandymo pabaigoje (mg/l);

V_l – skysčio inde tūris (l).

Suminis anglies dujų pavidalu kiekis

47. Suminė anglies dujų pavidalu masė inde apskaičiuojama pagal [8] lygtį:

$$m_t = m_h + m_l \quad [8] \text{ lygtis}$$

čia:

m_t – anglies dujų pavidalu suminė masė (mg);

m_h ir m_l yra apibrėžtos pirmiau.

Bandomosios cheminės medžiagos anglis

48. Bandomosios cheminės medžiagos masė bandymo induose apskaičiuojama pagal [9] lygtį:

$$m_v = C_c \times V_l \quad [9] \text{ lygtis}$$

čia:

m_v – bandomosios cheminės medžiagos anglies masė (mg);

C_c – bandomosios cheminės medžiagos anglies koncentracija bandymo inde (mg/l)

V_l – skysčio bandymo inde tūris (l).

Biologinio skaidymo laipsnis

49. Biologinio skaidymo procentinė dalis pagal viršutinės erdvės dujas apskaičiuojama taikant [10] lygtį, o biologinio skaidymo suminė procentinė dalis – taikant [11] lygtį:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad [10] \text{ lygtis}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad [11] \text{ lygtis}$$

čia:

D_h – biologinis skaidymas pagal viršutinės erdvės dujas (%);

D_t – suminis biologinis skaidymas (%);

m_h , m_v ir m_t yra apibrėžtos pirmiau.

Pradinio biologinio skaidymo laipsnis apskaičiuojamas pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos matavimus (neprivaloma) inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, taikant [12] lygtį:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad [12] \text{ lygtis}$$

čia:

D_p – bandomosios cheminės medžiagos pradinis skaidymas (%);

S_i – pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (mg/l);

S_e – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija pabaigoje (mg/l).

Jei analizės metodas rodo didelę bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją neapdorotame anaerobinio dumblo sėjinyje, taikoma [13] lygtis:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad [13] \text{ lygtis}$$

čia:

D_p^1 – bandomosios cheminės medžiagos pataisytoji pradinio skaidymo vertė (%);

S_{ib} – pradinė „tariamoji“ bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tuščiuose kontroliniuose ėminiuose (mg/l);

S_{eb} – „tariamoji“ bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tuščiuose kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje (mg/l).

Rezultatų tinkamumas

50. Turėtų būti naudojami tik indų, kurie nenusidažo rausva spalva, slėgio rodmenys (žr. 33 pastraipą). Užteršimas deguonimi kiek įmanoma sumažinamas taikant tinkamus anaerobinio apdorojimo būdus.
51. Reikėtų laikyti, kad bandymas tinkamas, jei etaloninė cheminė medžiaga pasiekia pastoviąją būseną, kuri atitinka didesnę kaip 60 % biologinį skaidymą ⁽¹⁾.
52. Jei bandymo pabaigoje pH vertė nepatenka į 7 ± 1 intervalą ir biologinis skaidymas vyko nepakankamai, bandymas kartojamas, naudojant didesnės buferinės talpos terpę.

⁽¹⁾ Tai reikėtų įvertinti pakartotinai, jei yra įtrauktos adsorbuojančios ir netirpios etaloninės cheminės medžiagos.

Skaidymo inhibavimas

53. Susidariusių dujų kiekis induose su bandomąja chemine medžiaga ir etalonine chemine medžiaga turėtų būti bent lygus jų kiekiui induose tik su etalonine chemine medžiaga, nes kitaip reikėtų, kad vyksta dujų gamybos inhibavimas. Kai kuriais atvejais dujų gamyba induose su bandomąja chemine medžiaga be etaloninės cheminės medžiagos bus mažesnė, palyginti su tuščiaisiais kontroliniais ėminiais, ir tai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga yra inhibitorius.

Bandymo ataskaita

54. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;
- bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos).

Bandymų sąlygos:

- praskiesto pūdytuvo skysčio tūriai (V_l) ir bandymo indo viršutinės erdvės tūris (V_h);
- bandymo indų aprašymas, pagrindinės biodujų matavimo (pvz., slėgmačio tipas) ir IC analizatoriaus charakteristikos;
- bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos įterpimas į bandymo sistemą: naudota bandymo koncentracija ir tirpiklių naudojimas;
- naudojamo sėjinio duomenys: nuotekų valymo įrenginio pavadinimas, apdorotų nuotekų šaltinio aprašymas (pvz., darbinė temperatūra, dumblo išbuvimo trukmė, daugiausia buitinės atliekos ir kt.), koncentracija, visa informacija, skirta šiems duomenims pagrįsti, ir informacija apie sėjinio pradinį apdorojimą (pvz., pradinis pūdymas, pradinė ekspozicija);
- inkubavimo temperatūra;
- kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai:

- pH ir IC vertės bandymo pabaigoje;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandymo pradžioje ir pabaigoje, jei buvo atliekamas specifinis matavimas;
- visi matavimo duomenys, gauti tuščiojo ėminio, etaloninės cheminės medžiagos ir inhibavimo kontrolinio ėminio indams, jei tinka (pvz., slėgis milibara, neorganinės anglies koncentracija (mg/l)) lentelės pavidalu (viršutinės erdvės ir skysčio matavimo duomenis reikėtų pateikti atskirai);
- statistinis duomenų apdorojimas, bandymo trukmė ir bandomosios cheminės medžiagos, etaloninės cheminės medžiagos ir slopinimo kontrolinio bandinio biologinio skaidymo grafikas;
- bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo procentinė dalis;
- bandymo rezultatų atmetimo priežastys;
- rezultatų aptarimas.

NUORODOS

- (1) Šio priedo skyriai:

C.4 Lengvo biologinio skaidumo nustatymas;

C.9 Biologinis skaidymas. Zahn-Wellen bandymas;

C.10 Modeliavimo bandymas. Aerobinis nuotekų apdorojimas.

A. Aktyviojo dumblo aeratoriai, B. Biologinės plėvelės

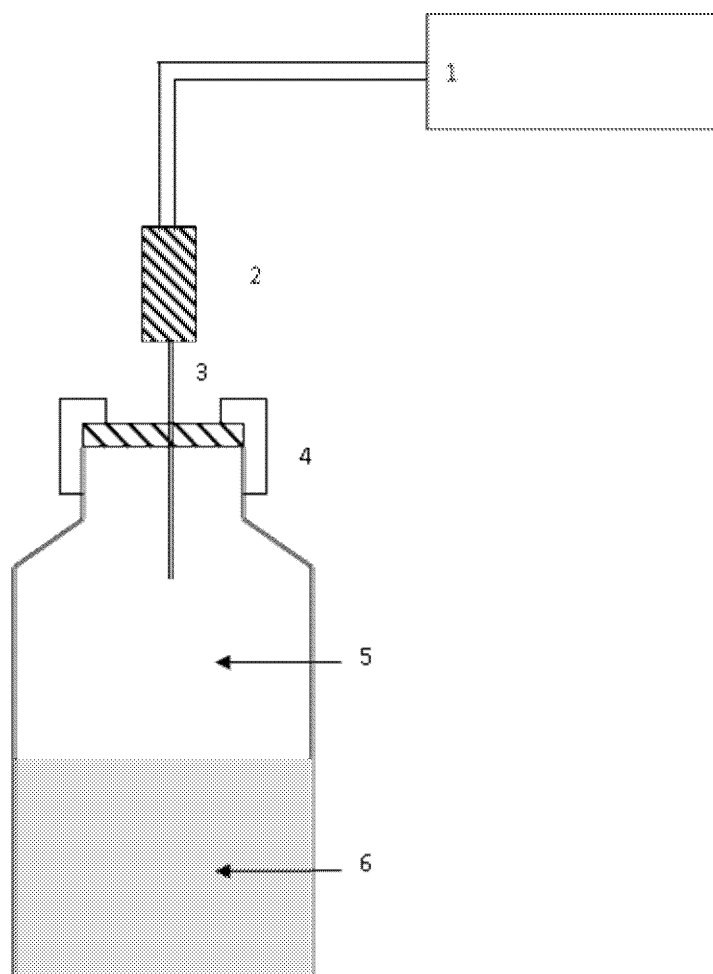
C.11, Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimas

- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
 - (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
 - (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
 - (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

1 priedėlis

Biodujų gamybos matavimo pagal dujų slėgį aparato pavyzdys



Paaiškinimas:

- 1 – slėgmatis;
- 2 – dujoms sandarus trišakis vožtuvas;
- 3 – švirkšto adata;
- 4 – dujoms sandarus kamštis (užspaustas gaubtelis ir membrana);
- 5 – viršutinė erdvė (V_h);
- 6 – pūdyto dumblo sėjinys (V_f).

Bandymo indų aplinkos temperatūra $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

2 priedėlis

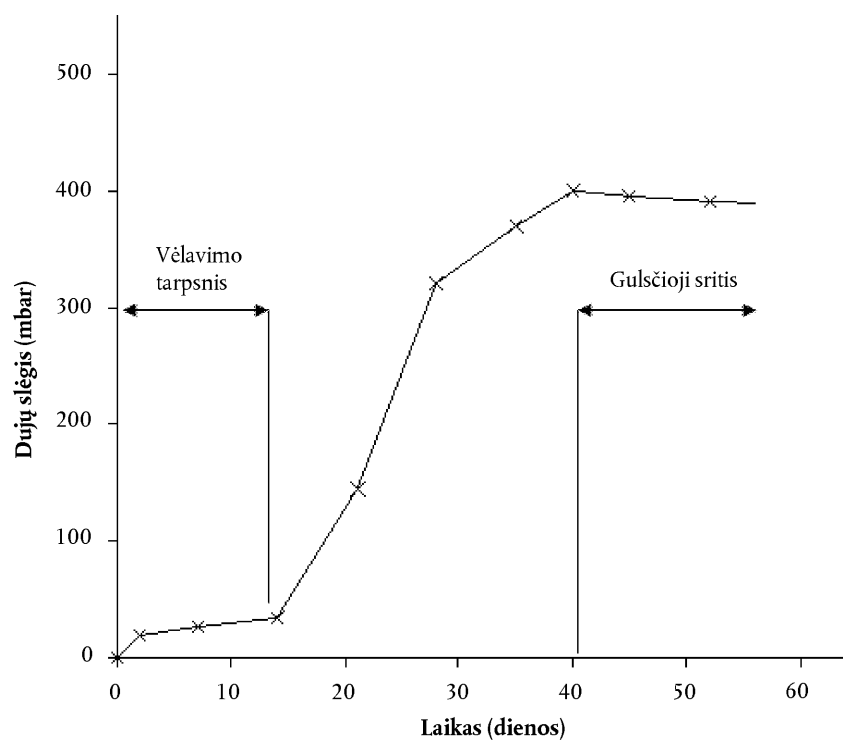
Slėgmačio rodmenų perskaičiavimas

Slėgmačio rodmenis galima susieti su dujų tūriais taikant standartinę kreivę, gautą įpurškiant žinomus oro tūrius $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje į serumo butelius su vandeniu, kurio tūris yra lygus reakcijos mišinio tūriui V_R :

- Vandens, laikomo $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, V_R ml alikvotinės dalys įpilamos į penkis serumo butelius. Buteliai užkemšami ir statomi 1 h į vandens vonią $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje pusiausvyrai nusistovėti;
- Įjungiamas slėgmatis, paliekamas stabilizuotis ir nustatomas ties nuliu;
- Per vieno iš butelių kamštį įstatoma švirkšto adata, vožtuvas atidaromas tol, kol slėgmatis rodo nulį, ir vėl uždaromas;
- Procedūra kartojama su likusiais buteliais;
- Į kiekvieną butelį įpurškiama po 1 ml oro esant $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Adata (slėgmačio) įstatoma per vieno iš butelių kamštį ir palaukiama slėgio rodmens nusistovėjimo. Slėgio rodmuo užrašomas, vožtuvas atidaromas tol, kol slėgmatis rodo nulį, ir vėl uždaromas;
- Procedūra kartojama su likusiais buteliais;
- Visa pirmiau nurodyta procedūra kartojama įpurškiant 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ir 50 ml oro;
- Brėžiama slėgio (Pa), kaip įpurškto oro tūrio V_b (ml) funkcijos perskaičiavimo kreivė. Prietaiso atsakas yra tiesinis nuo 0 Pa iki 70 000 Pa ir nuo 0 ml iki 50 ml gautų dujų tūrio intervale.

3 priedėlis

Skaidymo kreivės pavyzdys (suminis neto slėgio padidėjimas)



Anaerobinio biologinio skaidymo specifikacijų pavyzdys. Bandomosios cheminės medžiagos specifikacija

Laboratorija: Bandomoji cheminė medžiaga: Bandymas nr.:
 Bandymo temperatūra:(°C): Viršutinės erdvės tūris (V_h): (l) Skysčio tūris (V_l): (l)
 Bandomosios cheminės medžiagos anglis $C_{c,v}$: (mg/l) m_v ⁽¹⁾:(mg)

Diena	p_1 (bando- moji) (mbar)	p_2 (bando- moji) (mbar)	p_3 (bando- moji) (mbar)	p (bando- moji) vidurkis (mbar)	p_4 (tuščia- sis) (mbar)	p_5 (tuščia- sis) (mbar)	p_6 (tuščia- sis) (mbar)	p (tuščiasis) vidurkis (mbar)	p (neto) bandomoji – tuščiasis vidurkis (mbar)	Dp (neto) Suminis (mbar)	m_h viršutinė erdvė C ⁽²⁾ (mg)	D_h Biologinis skaidymas ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC, 1}$ bandomoji (mg)	$C_{IC, 2}$ bandomoji (mg)	$C_{IC, 3}$ bandomoji (mg)	C_{IC} bandomo- sios vidur- kis (mg)	$C_{IC, 4}$ tuščiasis (mg)	$C_{IC, 5}$ tuščiasis (mg)	$C_{IC, 6}$ tuščiasis (mg)	C_{IC} tuščiojo vi- durkis (mg)	$C_{IC, net}$ bandomoji – tuščiasis vidurkis (mg)	m_l skystyje esanti C ⁽⁴⁾ (mg)	m_t suminė C ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Biologinis skaidymas ⁽⁶⁾ (%)
IC (pabaiga)												
pH (pabaiga)												

⁽¹⁾ Anglis bandymo inde, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

⁽²⁾ Viršutinės erdvės anglis m_h (mg) įprastinėje inkubavimo temperatūroje (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Biologinis skaidymas, apskaičiuotas pagal viršutinės erdvės dujas D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

⁽⁴⁾ Skystyje esanti anglis m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

⁽⁵⁾ Suminė anglis dujų pavidalu, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Suminis biologinis skaidymas, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

Laboratorija : Etaloninė cheminė medžiaga: Bandymo nr.:
 Bandymo temperatūra:(°C): Viršutinės erdvės tūris (V_h): (l) Skysčio tūris (V_l) (litrais):
 Etaloninės cheminės medžiagos anglis $C_{c,v}$ (mg/l): m_v ⁽¹⁾ (mg):

Diena	p_1 (etal.) (mbar)	p_2 (etal.) (mbar)	p_3 (etal.) (mbar)	p (etal.) vidurkis (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) vidurkis (mbar)	p (etal.) etal. – tuš- čiasis (mbar)	Dp (etal.) suminis (mbar)	m_h viršutinė erdvė C ⁽²⁾ (mg)	D_h Biologinis skaidymas ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC, 1}$ etal. (mg)	$C_{IC, 2}$ etal. (mg)	$C_{IC, 3}$ etal. (mg)	C_{IC} etal. vidur- kis (mg)	$C_{IC, 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. vi- durkis (mg)	$C_{IC, net}$ etal. – in- hib. (mg)	m_l skystyje esanti ang- lis ⁽⁴⁾ (mg)	m_t suminė C ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Biologinis skaidymas ⁽⁶⁾ (%)
IC (pabaiga)												
pH (pabaiga)												

⁽¹⁾ Anglis bandymo inde, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

⁽²⁾ Viršutinės erdvės anglis m_h (mg) įprastinėje inkubavimo temperatūroje (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Biologinis skaidymas, apskaičiuotas pagal viršutinės erdvės dujas D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

⁽⁴⁾ Skystyje esanti anglis m_l (mg): $m_l = C_{IC, net} \times V_l$

⁽⁵⁾ Suminė anglis dujų pavidalu, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Suminis biologinis skaidymas, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

C.44. IŠPLOVIMAS IŠ DIRVOŽEMIO KOLONĖLIŲ**ĮVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 312 (2004). Sintetinės cheminės medžiagos gali patekti į dirvą tiesiogiai jas specialiai įterpant (pvz., žemės ūkyje naudojamos cheminės medžiagos) arba netiesioginiu būdu (pvz., nuotekos → nuotekų dumblas → dirvožemis arba oras → šlapios arba sausos nuosėdos). Vertinant šių cheminių medžiagų riziką, svarbu įvertinti jų virsmo dirvožemyje ir judėjimo (išsiplovimo) į gilesnius dirvožemio sluoksnius ir galiausiai į gruntinį vandenį potencialą.
2. Yra keli cheminių medžiagų išplovimo į dirvožemį potencialo matavimo kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis metodai, t. y. dirvožemio plonasluoksnė chromatografija, dirvožemio storasluoksnė chromatografija, dirvožemio kolonėlinė chromatografija ir adsorbcijos-desorbcijos matavimai (1)(2). Nejoninių cheminių medžiagų adsorbcijos ir išplovimo potencialo pradinis įvertis yra n-oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas (P_{ow}) (3)(4)(5).
3. Šiame dokumente aprašytas bandymo metodas yra pagrįstas pažeistos struktūros dirvožemio (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) kolonėline chromatografija. Atliekami dviejų tipų bandymai, kad būtų nustatytas (i) bandomosios cheminės medžiagos išplovimo potencialas ir (ii) virsmo produktų išplovimo potencialas (tyrimas su sendintais likučiais) dirvožemiuose kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis ⁽¹⁾. Metodas pagrįstas esamais metodais (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. Belgirate, Italijoje 1995 m. vykusiam EBPO seminare dėl dirvožemio ar nuosėdų atrankos (12) sutarta dėl šio bandymo metodo naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Jame taip pat pateiktos rekomendacijos dėl išplovimo bandymams skirto dirvožemio ėminių surinkimo, apdorojimo ir laikymo.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

5. Kolonėlės, pagamintos iš tinkamos inertinės medžiagos (pvz., stiklo, nerūdijančiojo plieno, aliuminio, teflono, PVC ir kt.) pripildomos dirvožemio, sotinamos „dirbinio lietaus“ tirpalu (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje), pusiausvirinamos ir paliekamos skysčiui ištekti. Paskui kiekvienos dirvožemio kolonėlės paviršius apdorojamas bandomąja chemine medžiaga ir (arba) sendintais bandomosios cheminės medžiagos likučiais. Dirvožemio kolonėlės plaunamos dirbtiniu lietuviu ir išplovos surenkamos. Pasibaigus išplovimo procesui, dirvožemis išimamas iš kolonėlių ir padalijamas į reikiamą segmentų skaičių, atsižvelgiant į informaciją, kurią reikia gauti atliekant tyrimą. Atliekama kiekviename dirvožemio segmente ir išplovose esančios bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka, jos virsmo produktų arba kitų tiriamų cheminių medžiagų analizė.

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

6. Bandymo metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms (nežymėtoms arba radioaktyviu izotopu žymėtoms, pvz., ^{14}C), kurioms yra nustatytas reikiamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Bandymo metodas netiktų cheminėms medžiagoms, kurios yra lakios dirvožemyje ar vandenyje, todėl šio bandymo metodo sąlygomis jų nelieka dirvožemyje ir (arba) išplovose.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Galima naudoti nežymėtąsias ar žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas jų išplovimo iš dirvožemio kolonėlių charakteristikoms nustatyti. Žymėtąsias chemines medžiagas reikia naudoti tiriant virsmo produktų (bandomosios cheminės medžiagos sendintų likučių) išplovimą ir nustatant masių balansą. Rekomenduojama naudoti ^{14}C žymėtąsias medžiagas, bet gali tikti kiti izotopai, pvz., ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Jei tik įmanoma, žymėtasis atomas turėtų būti molekulės stabiliausioje (-iose) dalyje (-yse). Bandomosios cheminės medžiagos grynumas turėtų būti ne mažesnis kaip 95 %.
8. Daugumą cheminių medžiagų reikėtų naudoti kaip atskirą medžiagą. Tačiau tiriant augalų apsaugos priemonių veikliąsias medžiagas, galima naudoti jų preparatus pradinės bandomosios cheminės medžiagos išplovimui tirti, bet preparatų bandymas yra ypač būtinas, kai mišinys gali turėti įtakos išsiskyrimo spartai (pvz., granulės arba reguliuojamo išsiskyrimo preparatai). Nagrinėjant specifinius mišinių bandymo schemas reikalavimus, gali būti naudinga prieš atliekant bandymą pasitarti su reguliavimo institucija. Tiriant sendintų likučių išplovimą, reikėtų naudoti gryną pradinę bandomąją cheminę medžiagą.

⁽¹⁾ Augalų apsaugos priemonių išplovimo iš kolonėlės tyrimai gali pateikti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų judrumą ir gali papildyti adsorbcijos-desorbcijos tyrimus.

9. Prieš atliekant išplovimo iš dirvožemio kolonėlių bandymus, pageidautina, kad būtų surinkta ši informacija apie bandomąją cheminę medžiagą:
- (1) tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas] (13);
 - (2) tirpumas organiniuose tirpikliuose;
 - (3) garų slėgis [A.4 bandymo metodas] (13) ir Henrio dėsnio konstanta;
 - (4) pasiskirstymo tarp n-oktanolio ir vandens koeficientas [A.8 ir A.24 bandymo metodai] (13);
 - (5) adsorbcijos koeficientas (K_d , K_f arba K_{oc}) [C.18 ir (arba) C.19 bandymo metodas] (13);
 - (6) hidrolizė [C.7 bandymo metodas] (13);
 - (7) disociacijos konstanta (pK_a) [EBPO TG 112] (25);
 - (8) aerobinis ir anaerobinis virsmas dirvožemyje [C.23 bandymo metodas] (13).

Pastaba. Atitinkamose bandymo ataskaitose turėtų būti nurodyta temperatūra, kurioje atliekami šie matavimai.

10. Į dirvožemio kolonėlės dedamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti tam, kad bet kuriame atskirame segmente būtų galima aptikti ne mažiau kaip 0,5 % įdėtos dozės. Tiriant augalų apsaugos priemonių veikliąsias medžiagas, įdėtos bandomosios cheminės medžiagos kiekis gali atitikti maksimalią (vienkartinio įterpimo) rekomenduojamą naudojimo normą.
11. Būtina turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrio analizės metodą bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka, virsmo produktų kiekiui dirvožemyje ir išplovose nustatyti. Taip pat reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos ir jos reikšmingų virsmo produktų (paprastai bent visų virsmo produktų, kurie sudaro ≥ 10 % įdėtos dozės ir kurie stebimi atliekant virsmo kelių tyrimus, bet, pageidautina, visų tyrimui svarbių virsmo produktų) analizės aptikimo ribą (žr. 17 pastraipą).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

12. Įvertinant santykinį bandomosios cheminės medžiagos judrumą dirvožemyje, reikėtų naudoti žinomų išplovimo charakteristikų etalonines chemines medžiagas, pvz., atraziną ar monuroną, kurias galima laikyti vidutinių išplovimo charakteristikų medžiagomis (1)(8)(11). Siekiant patvirtinti dirvožemio kolonėlės hidrodinamines savybes, gali būti naudingos nesorbuojamos ir neskaidžios polinės etaloninės cheminės medžiagos (pvz., etidžio bromidas, fluoresceinas, eozinas) vandens judėjimui kolonėle sekti.
13. Analizės standartinės cheminės medžiagos taip pat gali būti naudingos dirvožemio segmentuose ir išplovose rastiems virsmo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti taikant chromatografinius, spektroskopinius arba kitus tinkamus metodus.

APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

14. Žr. 1 priedėlį.

KOKYBĖS KRITERIJAI

Atgavimo laipsnis

15. Dirvožemio segmentuose ir išplovose po išplovimo rastos bandomosios cheminės medžiagos procentinių dalių suma yra išplovimo bandymo atgavimo laipsnis. Žymėtųjų cheminių medžiagų atgavimo laipsnis turėtų būti nuo 90 % iki 110 % (11), o nežymėtųjų cheminių medžiagų – nuo 70 % iki 110 % (8).

Analizės metodo pakartojamumas ir jautris

16. Bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų analizės metodo pakartojamumas gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties dirvožemio segmento ekstrakto arba išplovų analizę (žr. 11 pastraipą).

17. Kiekviename dirvožemio segmente arba išplovose esančios bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turėtų būti ne mažesnė kaip $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (kaip bandomosios cheminės medžiagos) arba 0,5 % į bet kurį segmentą įterptos dozės, jei šis kiekis yra mažesnis. Taip pat reikėtų nurodyti kiekybinio nustatymo ribą (LOQ).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo sistema

18. Bandymui atlikti naudojamos išplovimo kolonėlės (ardomos ar neardomos į sekcijas), pagamintos iš tinkamos inertinės medžiagos (pvz., stiklo, nerūdijančiojo plieno, aliuminio, teflono, PVC ir kt.), kurių vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 4 cm ir aukštis – ne mažesnis kaip 35 cm. Kolonelių medžiagą reikėtų tikrinti dėl galimos sąveikos su bandomąja chemine medžiaga ir (arba) jos virsmo produktais. Tinkamų į sekcijas ardomų ir neardomų kolonelių pavyzdžiai pateikti 2 priedėlyje.
19. Dirvožemio kolonėlėms pripildyti ir tankinti naudojamas šaukštas, stūmoklis ir vibratorius.
20. Dirbtiniam lietuvi tiki į dirvožemio kolonėlės galima naudoti stūmoklinius arba žarninius siurblius, dušo galvutes, Marioto indus arba paprastus lašinamuosius piltuvus.

Laboratorinė įranga ir cheminės medžiagos

21. Naudojama standartinė laboratorinė įranga, konkrečiai ši įranga:
- (1) analizės aparatūra, pvz., dujų-skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) ir plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įranga, įskaitant reikiamas aptikimo sistemas žymėtųjų arba nežymėtųjų cheminių medžiagų analizei atlikti, arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodo aparatūra;
 - (2) identifikavimo aparatūra (pvz., masių spektrometrijos (MS), GC-MS, HPLC-MS, branduolių magnetinio rezonanso (NMR) ir kt.);
 - (3) žymėtųjų cheminių medžiagų scintiliacijos skystyje skaitiklis;
 - (4) oksidavimo įtaisas žymėtosioms cheminėms medžiagoms sudeginti;
 - (5) ekstrahavimo aparatūra (pvz., žematemperatūrio ekstrahavimo centrifugavimo mėgintuvėliai ir Soksleto aparatas nepertraukiamam ekstrahavimui su grįžtamuju šaldytuvu);
 - (6) įranga tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamasis garintuvas).
22. Naudojamos šios cheminės medžiagos: organiniai tirpikliai, analiziškai grynai, pvz., acetonas, metanolis ir kt.; scintiliacinis skystis; $0,01 \text{ mol/l}$ CaCl_2 tirpalas distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje (dirbtinis lietus).

Bandomoji cheminė medžiaga

23. Bandomąją cheminę medžiagą reikėtų ištirpinti vandenyje (distiliuotame ar dejonizuotame), kad ją būtų galima įterpti į kolonėlę. Jei bandomoji cheminė medžiaga mažai tirpsta vandenyje, ją galima įterpti kaip preparatą (paruošus vandeningą dispersiją ar emulsiją, jei reikia) arba ištirpintą organiniame tirpiklyje. Jei naudojamas organinis tirpiklis, jo turėtų būti imama kuo mažiau ir prieš pradedant išplovimo procedūrą jis turėtų būti išgarintas nuo dirvožemio kolonėlės paviršiaus. Kietuosius preparatus, pvz., granules, reikėtų įterpti kieto pavidalo nenaudojant vandens; siekiant užtikrinti geresnį pasiskirstymą dirvožemio kolonėlės paviršiuje, prieš įterpiant preparatą jį galima sumaišyti su nedideliu kvarcinio smėlio kiekiu (pvz., 1 g).
24. Į dirvožemio kolonėlės įterpiamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti tam, kad bet kuriame atskirame segmente būtų galima aptikti ne mažiau kaip 0,5 % įterptos dozės. Jei tiriamos augalų apsaugos priemonių veikliosios cheminės medžiagos, jų kiekis gali būti pagrįstas rekomenduojama maksimalia įterpimo norma (vienkartinio įterpimo norma), o pradinės bandomosios cheminės medžiagos ir sendintų cheminių medžiagų išplovimą reikėtų susieti su naudojamos dirvožemio kolonėlės paviršiaus plotu ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Kiekį, kuris turi būti įterpiamas į cilindro formos kolonėles, galima apskaičiuoti pagal šią formulę:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g/kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

čia:

M – į kolonėlę įterptas kiekis [μg];

A – įterpimo norma [kg · ha⁻¹];

d – dirvožemio kolonėlės skersmuo [cm];

π = 3,14.

Etaloninė cheminė medžiaga

25. Atliekant išplovimo bandymus, reikėtų naudoti etaloninę cheminę medžiagą (žr. 12 pastraipą). Ja reikėtų padengti dirvožemio kolonėlės paviršių panašiai kaip bandomąją cheminę medžiagą ir naudojant reikiamą normą, kad būtų įmanoma tinkamai aptikti kaip vidinį etaloną kartu su bandomąją cheminę medžiagą toje pačioje dirvožemio kolonėlėje arba vieną atskiroje dirvožemio kolonėlėje. Būtų geriau abi chemines medžiagas naudoti toje pačioje kolonėlėje, išskyrus atvejus, kai abi cheminės medžiagos turi žymėtuosius atomus panašioje vietoje.

Dirvožemiai*Dirvožemių parinkimas*

26. Atliekant išplovimo tyrimus su pradine bandomąją cheminę medžiagą, reikėtų naudoti nuo 3 iki 4 dirvožemių, kurių pH vertė, organinės anglies kiekis ir tekstūra (12) būtų skirtingi. Nurodymai dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo pateikti 1 lentelėje. Jonizuojamoms bandomosioms cheminėms medžiagoms parinkti dirvožemiai turėtų aprėpti platų pH intervalą, kad būtų galima įvertinti jonizuotos ir nejonizuotos formos cheminės medžiagos judrumą; ne mažiau kaip trijų dirvožemių pH vertė turėtų užtikrinti bandomosios cheminės medžiagos judriąją formą.

1 lentelė.

Nurodymai dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo

Dirvo- žemio nr.	pH vertė	Organinės anglies kiekis %	Molio kiekis %	Tekstūra (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	sunkus priemolis
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	dulkiškas priemolis
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	priemolis
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	rišlus smėlis
5	< 4,5	> 10 #	< 10	rišlus smėlis arba smėlis

(*) Pagal Maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO – Food and Agricultural Organization) ir JAV žemės ūkio departamento (USDA) sistemas (14).

§ Būtų geriau, jei atitinkamų kintamųjų vertės būtų nurodytame intervale. Tačiau, jei sunku rasti tinkamą dirvožemį, priimtinos mažesnės nei nurodytos mažiausios vertės.

‡ Jei dirvožemiai turi mažiau kaip 0,3 % organinės anglies, gali sutrikti koreliacija tarp organinės medžiagos kiekio ir adsorbcijos. Todėl rekomenduojama naudoti dirvožemį, kuriame organinės anglies būtų ne mažiau kaip 0,3 %.

Dirvožemiai, turintys labai daug anglies (pvz., > 10 %) gali būti nepriimtini dėl reguliavimo institucijų reikalavimų, pvz., pesticidų registravimo tikslais.

27. Kartais gali prireikti kitų tipų dirvožemių, kurie reprezentuotų žemesnės temperatūros, vidutinio klimato ir tropikų regionus. Todėl, jei teikiama pirmenybė kitų tipų dirvožemiams, juos reikėtų apibūdinti tais pačiais parametrais, o jų savybių kitimas turėtų atitikti aprašytą nurodymuose dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo (žr. 1 lentelę), netgi jei jie nevisiškai tiksliai atitinka kriterijus.
28. Atliekant „sendintų likučių“ išplovimo tyrimus, reikėtų naudoti vieną dirvožemį (12). Jų smėlio kiekis turėtų būti > 70 %, o organinės anglies – 0,5–1,5 % (pvz., 1 lentelės dirvožemis nr. 4). Gali tekti naudoti daugiau dirvožemio tipų, jei svarbu gauti duomenis apie virsmo produktus.

29. Visi dirvožemiai turėtų būti apibūdinti, nurodant bent tekstūrą (% smėlio, % dumblo, % molio, pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), pH, katijonų mainų talpą, organinės anglies kiekį, piltinį tankį (pažeistos struktūros dirvožemio) ir vandens sulaikymo gebą. Reikėtų matuoti mikrobinę biomasę tik tų dirvožemių, kurie naudojami sendinimo ar inkubavimo laikotarpiu prieš sendintų likučių išplovimo bandymą. Informacija apie papildomas dirvožemių savybes (pvz., dirvožemių klasifikavimą, molių mineralogiją, savitąjį paviršiaus plotą) gali būti naudinga aiškinant tyrimo rezultatus. Dirvožemio charakteristikoms nustatyti gali būti taikomi metodai, rekomenduojami (15)(16)(17)(18)(19) nuorodose.

Dirvožemių surinkimas ir laikymas

30. Dirvožemius reikėtų imti iš viršutinio sluoksnio (A horizonto) ir iš ne didesnio kaip 20 cm gylio. Augmenijos likučiai, makrofauna ir akmenys turėtų būti pašalinti. Dirvožemiai (išskyrus naudojamus bandomajai cheminei medžiagai sendinti) džiovinami kambario temperatūros (pageidautina 20–25 °C) ore. Smulkinti reikėtų kuo mažesne jėga, kad pradinės dirvožemio tekstūros pokyčiai būtų kuo mažesni. Dirvožemiai sijojami per ≤ 2 mm akučių sietą. Rekomenduojama dirvožemius kruopščiai homogenizuoti, kad būtų geresnis rezultatų atkuriamumas. Prieš naudojant, išdžiovintus ore dirvožemius galima laikyti kambario temperatūroje (12). Rekomendacijų dėl laikymo trukmės ribų nepateikiama, tačiau, prieš naudojant daugiau kaip trejus metus laikytą dirvožemį, reikėtų pakartotinai atlikti jo analizę organinės anglies kiekiui ir pH nustatyti.
31. Reikėtų turėti išsamią informaciją apie lauko vietų, iš kurių imami bandymo dirvožemiai, istoriją. Duomenis sudaro tiksli vieta (tiksliai apibrėžta pagal Universaliąją skersinę Merkatoriaus projekciją ir (arba) Europos horizontalųjį atskaitos lygį (UTM – *Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) ar geografinės koordinatės), augalinė danga, apdorojimo augalų apsaugos priemonėmis, organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologiniais priedais dozės arba atsitiktiniai teršalai (12). Jei per pastaruosius ketverius metus dirvožemiai buvo apdorojami bandomąja chemine medžiaga arba jos struktūriniais analogais, tokie dirvožemiai neturėtų būti naudojami išplovimui tirti.

Bandymo sąlygos

32. Visą bandymo laikotarpį išplovimo kolonėlės turėtų būti laikomos tamsoje ir kambario temperatūroje, jei ši temperatūra užtikrinama ± 2 °C tikslumu. Rekomenduojama temperatūra yra nuo 18 iki 25 °C.
33. Dirbtinis lietus (0,01 mol/l CaCl_2) turėtų lyti nepertraukiamai ant kolonėlių paviršiaus esant srautui 200 mm per 48 h (⁽¹⁾); šis srautas atitinka 251 ml vandens įpylimą į kolonėlę, kurios vidinis skersmuo 4 cm. Jei būtina, atsižvelgiant į bandymo tikslą, gali būti papildomai naudojami kiti dirbtinio lietaus srautai ir ilgesnė jo trukmė.

Bandymo eiga

Pradinės bandomosios cheminės medžiagos išplovimas

34. Ne mažiau kaip dvi kartotinių ėminių išplovimo kolonėlės pripildomos ore išdžiovintu ir sijotu (< 2 mm) neapdorotu dirvožemiu iki maždaug 30 cm aukščio. Siekiant užtikrinti vienodą tankumą, dirvožemis šaukštu dedamas į kolonėles nedideliais kiekiais ir spaudžiamas stūmokliu, vienu metu nestipriai purtant kolonėlę tol, kol dirvožemio stulpelio viršus nustoja slinkti žemyn. Būtina pripildyti tolygiai, kad būtų gauti atkuriami išplovimo kolonėlių rezultatai. Informacija apie kolonėlių pripildymo metodus pateikta (20)(21) ir (22) nuorodose. Siekiant kontroliuoti pripildymo procedūros atkuriamumą, nustatoma kolonėlei pripildyti naudojamo dirvožemio suminė masė (⁽²⁾); kartotinių ėminių kolonėlių masė turėtų būti panaši.

(¹) Toks srautas modeliuoja ypač didelį kritulių kiekį. Vidutinis metinis kritulių kiekis, pvz., Vidurio Europoje, yra 800–1 000 mm.

(²) Pažeistos struktūros dirvožemio piltinio tankio pavyzdžiai yra tokie:

smėlingo dirvožemio $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$,
rišlaus smėlio dirvožemio $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$,
priemolio dirvožemio $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$,
dulkiško priemolio dirvožemio $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

35. Pripildytos kolonėlės iš anksto sudrėkinamos dirbtiniu lietuviu ($0,01 \text{ mol/l CaCl}_2$) iš apačios į viršų, kad vanduo išstumtų dirvožemio porose esantį orą. Palaukiama, kol nusistovi kolonėlių pusiausvyra ir išteka sunkio jėgos veikiamas perteklinis vanduo. Kolonėlių prisotinimo metodų apžvalga pateikta (23) nuorodoje.
36. Į dirvožemio kolonėlės įterpiama bandomoji cheminė medžiaga ir (arba) etaloninė cheminė medžiaga (taip pat žr. 23–25 pastraipas). Siekiant užtikrinti vienalytį pasiskirstymą, bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos tirpalai, suspensijos arba emulsijos turėtų vienodai pasklisti dirvožemio kolonėlių paviršiuje. Jei bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama įterpti kartu su dirvožemiu, ją reikėtų sumaišyti su nedideliu kiekiu (pvz., 20 g) dirvožemio ir užberti ant dirvožemio kolonėlės paviršiaus.
37. Dirvožemio kolonėlių paviršius uždengiamas sukepintojo stiklo disku, stiklo karoliukais, stiklo pluošto filtru arba apskritu filtravimo popieriaus lapu, kad dirbtinis lietus tolygiai pasklistų visu paviršiumi ir lietaus lašai netrikdytų dirvožemio paviršiaus. Kuo didesnis kolonėlės skersmuo, tuo atidžiau ant dirvožemio kolonėlių reikia paskirstyti dirbtinį lietų, kad būtų užtikrintas dirbtinio lietaus tolygus pasklidimas dirvožemio paviršiumi. Dirbtinis lietus į dirvožemio kolonėles pilamas naudojant stūmoklinį ar žarninį siurbį arba lašinamąjį piltuvą. Pageidautina išplovus rinkti į frakcijas, užrašant jų atitinkamą tūrį ⁽¹⁾.
38. Po išplovimo kolonėlės paliekamos išvarvėti ir dirvožemio kolonėlės dalijamos į reikiamą segmentų skaičių, atsižvelgiant į informaciją, kurią numatyta gauti iš tyrimo; segmentai ekstrahuojami atitinkamais tirpikliais arba jų mišiniais ir analizuojami bandomajai cheminei medžiagai ir, jei tinka, jos virsmo produktams, suminiam radioaktyvumui ir etaloninei cheminei medžiagai nustatyti. Išplovos ar išplovų frakcijos analizuojamos tiesiogiai arba tie patys produktai analizuojami po jų ekstrahavimo. Kai naudojama žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga, reikėtų identifikuoti visas frakcijas, kurių radioaktyvumas sudaro $\geq 10 \%$ naudoto radioaktyvumo.

Sendintų likučių išplovimas

39. Šviežias dirvožemis (iš anksto nedžiovinamas ore) apdorojamas žymėtąja bandomąja chemine medžiaga, taikant dirvožemio kolonėlių paviršiaus plotą atitinkančią normą (žr. 24 pastraipą), ir inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis pagal C.23 bandymo metodą (13). Inkubavimo (sendinimo) laikotarpis turėtų būti gana ilgas, kad galėtų susidaryti reikšmingas virsmo produktų kiekis; rekomenduojama sendinimo laikotarpio trukmė, lygi bandomosios cheminės medžiagos pusėjimo trukmei ⁽²⁾, bet ne didesnė kaip 120 dienų. Prieš išplaunant, sendintas dirvožemis analizuojamas bandomajai cheminei medžiagai ir jos virsmo produktams nustatyti.
40. Išplovimo kolonėlės pripildomos iki 28 cm aukščio tuo pačiu dirvožemiu (tik išdžiovinu ore), kuris buvo naudotas atliekant sendinimo bandymą, kaip aprašyta 34 pastraipoje, ir nustatoma pripildytų dirvožemio kolonėlių suminė masė. Dirvožemio kolonėlės iš anksto sudrėkinamos, kaip aprašyta 35 pastraipoje.
41. Bandomoji cheminė medžiaga ir jos virsmo produktai sendintų dirvožemio likučių pavidalu (žr. 39 pastraipą) užpilami ant dirvožemio kolonėlių paviršiaus kaip 2 cm storio dirvožemio segmentas. Pageidautina, kad suminis dirvožemio kolonėlių aukštis (neapdoroto dirvožemio ir sendinto dirvožemio) nebūtų didesnis kaip 30 cm (žr. 34 pastraipą).
42. Išplaunama, kaip aprašyta 37 pastraipoje.
43. Išplauti dirvožemio segmentai ir išplovos analizuojami kaip nurodyta 38 pastraipoje, nustatant bandomąją cheminę medžiagą, jos virsmo produktus ir neišplautos žymėtosios medžiagos kiekį. Siekiant nustatyti sendinto likučio kiekį, likusį po išplovimo 2 cm sluoksnyje, šį segmentą reikėtų analizuoti atskirai.

⁽¹⁾ Tipinis 230–260 ml išplovų tūris atitinka maždaug 92–104 % viso įpilto dirbtinio lietaus (251 ml), kai naudojamos 4 cm skersmens ir 30 cm ilgio kolonėlės.

⁽²⁾ Dirvožemyje gali susidaryti daugiau kaip vienas pagrindinis virsmo produktas, kuris taip pat gali atsirasti skirtingais virsmo tyrimo laikotarpio momentais. Tokiais atvejais gali tekti atlikti skirtingo amžiaus sendintų likučių išplovimo tyrimus.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

44. Bandomosios cheminės medžiagos, virsmo produktų, neekstrahuojamų produktų ir etaloninės cheminės medžiagos, jei įtraukta, kiekis kiekviename dirvožemio segmente ir išplovų frakcijoje turėtų būti nurodytas % įterptos pradinės dozės. Turėtų būti pateiktas kiekvienai kolonėlei gautas grafikas, kuris rodytų nustatytą procentinę dalį, kaip dirvožemio gylio funkciją.
45. Kai į šiuos išplovimo iš kolonėlės tyrimus įtraukiama etaloninė cheminė medžiaga, cheminės medžiagos išplovimą galima įvertinti pagal santykinę skalę, taikant santykinio judrumo faktorius (RMF; apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) (1)(11), kuriuos turint galima palyginti įvairių cheminių medžiagų išplovimo duomenis, gautus skirtingų tipų dirvožemiams. Įvairių augalų apsaugos priemonių RMF verčių pavyzdžiai pateikti 3 priedėlyje.
46. K_{oc} (pagal organinės anglies kiekį normalizuoto adsorbcijos koeficiento) ir K_{om} (pagal organinės medžiagos kiekį normalizuoto pasiskirstymo koeficiento) įverčius taip pat galima gauti pagal išplovimo iš kolonėlių rezultatus, taikant vidutinį išplovimo atstumą, arba nustatytus santykius tarp RMF ir K_{om} ar K_{oc} (4) arba taikant paprastą chromatografijos teoriją (24). Tačiau pastarąjį metodą reikėtų taikyti atsargiai, ypač, jei daroma prielaida, kad išplovimo procesas nevyksta vien tik sočiojo srauto sąlygomis, bet daugiau yra susijęs su nesočiomis sistemomis.

Rezultatų aiškinimas

47. Tiriant išplovimą iš kolonėlių, pagal šį metodą galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos (tiriant pradinės medžiagos išplovimą) ir (arba) jos virsmo produktų (tiriant sendinto likučio išplovimą) išplovimo arba judrumo dirvožemyje potencialą. Šiais bandymais negalima kiekybiškai prognozuoti išplovimo elgsenos lauko sąlygomis, bet jie tinka cheminės medžiagos „išplaunamumui“ palyginti su kitomis cheminėmis medžiagomis, kurių išplovimo elgsena gali būti žinoma (24). Be to, kiekybiškai nenustatoma įterptos medžiagos procentinė dalis, kuri gali pasiekti gruntinius vandenius (11). Tačiau išplovimo iš kolonėlių tyrimo rezultatai gali padėti nuspręsti, ar būtina papildomai tirti pusiau lauko ar lauko sąlygomis chemines medžiagas, kurių didelis judrumo potencialas buvo įrodytas laboratoriniais bandymais.

Bandymo ataskaita

48. Ataskaitą turi sudaryti:

Bandomoji cheminė medžiaga ir etaloninė cheminė medžiaga (kai naudojama):

- bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas (IUPAC ir CAS nomenklatūra), CAS numeris, struktūrinė formulė (nurodant žymėtojo atomo padėtį, kai naudojama žymėtoji medžiaga) ir reikiamos fizikinės ir cheminės savybės;
- bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos);
- žymėtosios cheminės medžiagos radiocheminis grynumas ir savitasis aktyvumas (jei tinka).

Bandymo dirvožemiai:

- ėmimo vietos duomenys;
- dirvožemių savybės, pvz., pH vertė, organinės anglies ir molio kiekis, tekstūra ir piltinis tankis (pažeistos struktūros dirvožemio);
- dirvožemio mikrobinis aktyvumas (tik bandomajai cheminei medžiagai sendinti naudoto dirvožemio);
- laikymo trukmė ir sąlygos.

Bandymo sąlygos:

- tyrimo atlikimo datos;
- išplovimo kolonėlių ilgis ir skersmuo;
- dirvožemio kolonėlės dirvožemio suminė masė;
- įterptos bandomosios medžiagos ir, jei tinka, etaloninės cheminės medžiagos kiekis;

- dirbtinio lietaus kiekis, naudojimo dažnis ir trukmė;
- bandymo įrenginio temperatūra;
- kartotinių ėminių skaičius (ne mažiau kaip du);
- bandomosios cheminės medžiagos, jos virsmo produktų ir, jei tinka, etaloninės cheminės medžiagos analizės įvairiuose dirvožemio segmentuose ir išplovose metodai;
- virsmo produktų dirvožemio segmentuose ir išplovose apibūdinimo ir identifikavimo metodai.

Bandymo rezultatai:

- rezultatų, išreikštų koncentracijos vertėmis ir įterptos dozės % dirvožemio segmentuose ir išplovose, lentelės;
- masių balansas, jei tinka;
- išplovų tūriai;
- išplovimo atstumai ir, jei tinka, santykinio judrumo faktoriai;
- % išreikšto segmentuose rasto kiekio kaip segmento gylio funkcijos grafikas;
- rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

NUORODOS

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) 1995 m. liepos 14 d. Komisijos direktyvos 95/36/EB, iš dalies keičiančios Tarybos direktyvą 91/414/EEB dėl augalų apsaugos produktų pateikimo į rinką, I priedas, OL L 172, 1995 7 22, p.8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

- (13) Šie šio priedo skyriai:
- A.4 skyrius. Garų slėgis
 - A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje
 - A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. Kratomos kolbos metodas
 - A.24 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. HPLC metodas
 - C.7 skyrius. Skaidymas. Abiotinis skaidymas. Hidrolizė kaip pH funkcija
 - C.18 skyrius. Adsorbcija/desorbcija taikant statinės pusiausvyros metodą
 - C.23 skyrius. Aerobinis ir anaerobinis transformavimas dirvožemyje
- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).
- (15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D. R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris
-

1 priedėlis

Apibrėžtys ir vienetai

Sendintas dirvožemio likutis – bandomoji cheminė medžiaga ir jos virsmo produktai, esantys dirvožemyje po įterpimo praėjus pakankamai ilgam laikotarpiui, kad galėtų įvykti pernešimo, adsorbcijos, metabolizmo ir sklaidos procesai, kurie pakeistų dalies įterptos cheminės medžiagos pasiskirstymą ir cheminę prigimtį (1).

Dirbtinis lietus – 0,01 mol/l CaCl_2 tirpalas distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje.

Vidutinis išplovimo atstumas – dirvožemio segmento apačios atstumas, kuriame suminis atgaautos cheminės medžiagos kiekis sudaro 50 % viso atgaautos cheminės medžiagos kiekio (įprastinis išplovimo bandymas), arba (dirvožemio segmento apačios atstumas, kuriame atgautas suminis cheminės medžiagos kiekis sudaro 50 % viso atgaautos cheminės medžiagos kiekio) – ((likučio sluoksnio storis)/2) (sendinto likučio išplovimo tyrimas)

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Išplova – per dirvožemio kolonėlės dirvožemio sluoksnį prasisunkusi skystoji fazė (1).

Išplovimas – cheminės medžiagos judėjimo žemyn dirvožemio kolonėlės dirvožemio sluoksniu procesas (1).

Išplovimo atstumas – giliausias dirvožemio segmentas, kuriame po išplovimo buvo rasta $\geq 0,5$ % įterptos cheminės medžiagos arba sendinto likučio (atitinka skverbties gylį).

Aptikimo riba (LOD) ir kiekybinio nustatymo riba (LOQ): Aptikimo riba (LOD) – mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant cheminę medžiagą dar galima atskirti nuo analizės artefaktų. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) – mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kurią dar galima kiekybiškai nustatyti priimtinu tikslumu.

Santykinio judrumo faktorius (RMF – *Relative Mobility Factor*) – bandomosios cheminės medžiagos išplovimo atstumo (cm) ir etaloninės cheminės medžiagos išplovimo atstumo (cm) dalmuo.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Virsmo produktas – visos cheminės medžiagos, susidarancios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO_2 ir su likučiais surištus produktus.

Dirvožemis – mineralinių ir organinių cheminių sudedamųjų dalių mišinys, kurio organinius komponentus sudaro daug anglies ir azoto turintys didelės molekulinės masės junginiai ir kurio pagrindinė populiacijos dalis yra mikroorganizmai. Gali būti bandomi dviejų būsenų dirvožemiai:

— nepažeistos struktūros, koks jis susidaro per tam tikrą laiką tipiškuose įvairių dirvožemio tipų sluoksniuose;

— pažeistos struktūros, koks jis paprastai yra ariamuose laukuose arba kas su juo atsitinka, kai jo ėminiai imami kasant ir naudojami taikant šį bandymo metodą (2).

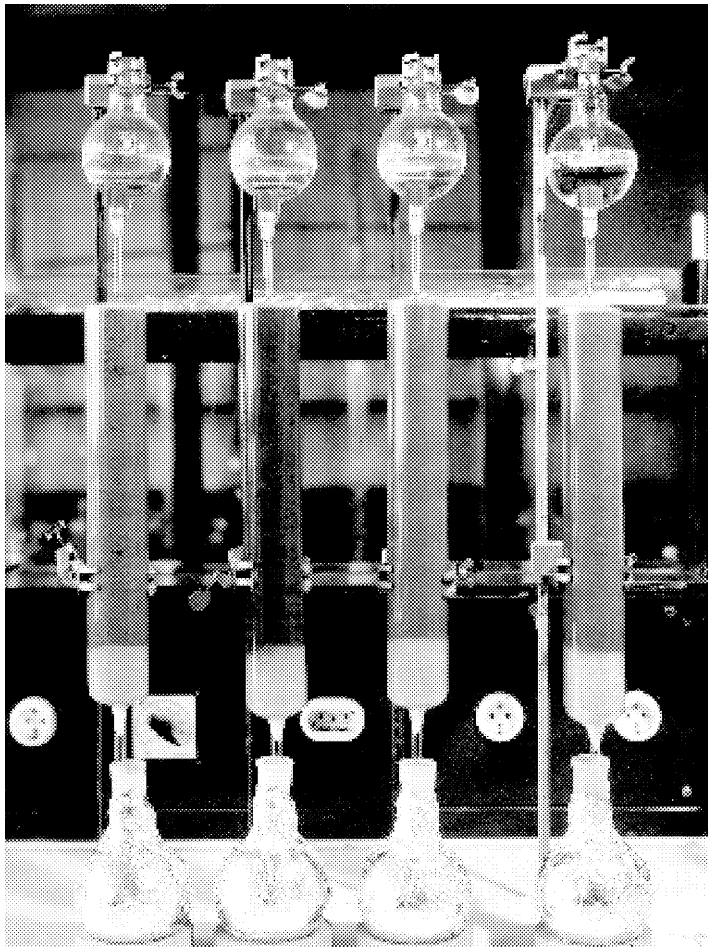
(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

2 priedėlis

1 paveikslas.

**Neardomų stiklinių išplovimo kolonėlių, kurių ilgis 35 cm, o
vidinis skersmuo 5 cm, pavyzdžiai (1)**



← Lašinamieji piltuvai
dirbtiniam lietuvi tiktai

← Sukepintojo stiklo diskai,
kurie apsaugo dirvožemio
paviršių nuo sudrumstimo ir
tolygiai paskirsto dirbtinį lietų

← Stiklinė kolonėlė, pripildyta
bandymo dirvožemio (kai
bandomi šviesai jautrūs
produktai, kolonėlės būtina
apvynioti aliuminio folija)

← Kvarcinio smėlio sluoksnis

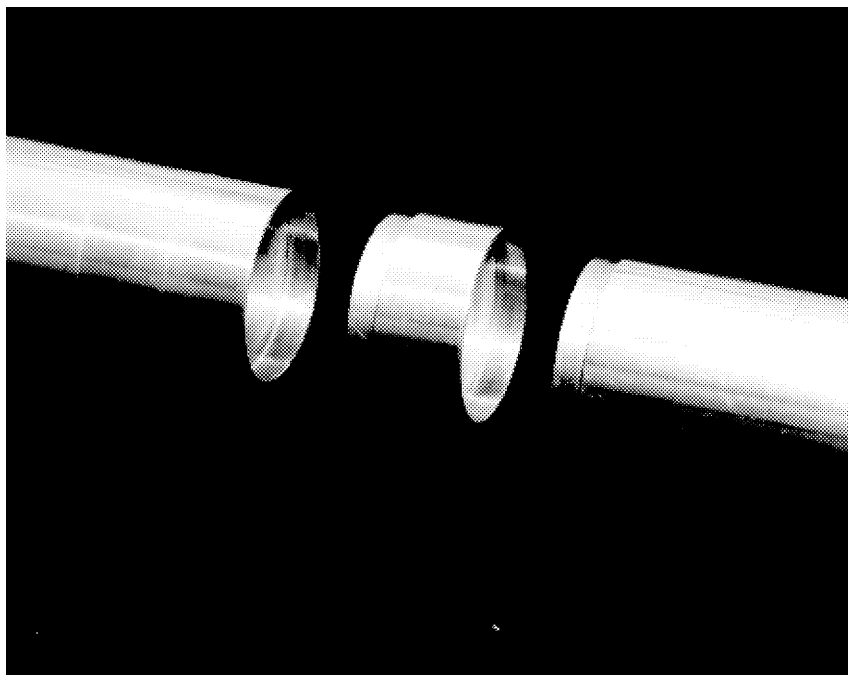
← Stiklo vatos kamštis, kad
dirvožemis liktų kolonėlėje

← Apvaliadugnė išplovų
surinkimo kolba, apsaugai nuo
fotolizės apvyniota aliuminio
folija

- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

2 paveikslas.

4 cm skersmens ardomos metalinės išplovimo kolonėlės pavyzdys (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

—

3 priedėlis

Išvairių augalų apsaugos produktų santykinio judrumo faktorių (*) (RMF) (1)(2) ir atitinkamų judrumo klasių + pavyzdžiai

RMF intervalas	Cheminė medžiaga (RMF)	Judrumo klasė
≤ 0,15	parationas (< 0,15), flurodifenas (0,15)	I nejudri
0,15–0,8	profenofosas (0,18), propikonazolas (0,23), diazinonas (0,28), diuronas (0,38), terbutilazinas (0,52), metidationas (0,56), prometrinas (0,59), propazinas (0,64), alachloras (0,66), metolachloras (0,68)	II mažai judri
0,8–1,3	monuronas (**) (1,00), atrazinas (1,03), simazinas (1,04), fluometuronas (1,18)	III vidutiniškai judri
1,3–2,5	prometonas (1,67), cianazinas (1,85), bromacilas (1,91), karbutilatas (1,98)	IV gana judri
2,5–5,0	karbofuranas (3,00), dioksakarbas (4,33)	V judri
> 5,0	monokrotofosas (> 5,0), dikrotofosas (> 5,0)	VI Labai judri

(*) Santykinio judrumo faktorius gaunamas taip (3):

$$RMF = \frac{\text{bandomosios cheminės medžiagos išplovimo atstumas (cm)}}{\text{etaloninės cheminės medžiagos išplovimo atstumas (cm)}}$$

(**) Etaloninė cheminė medžiaga.

+ Kitos cheminės medžiagos judrumo dirvožemyje klasifikavimo sistemos pagrįstos plonasluoksnės chromatografijos metodu gautomis R_f vertėmis (4) ir K_{oc} vertėmis (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

**C.45. IŠMETALŲ PATEKIMO Į APLINKĄ IŠ KONSERVANTAIS APDOROTOS MEDIENOS ĮVERTINIMAS.
LABORATORINIS METODAS, TAIKOMAS NEAPDENGTIEMS MEDIENOS GAMINIAMS, KURIE
LIEČIASI SU GĖLU IR JŪROS VANDENIU**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 313 (2007). Būtina nustatyti iš konservantais apdorotos medienos į aplinką patenkančių išmetalų kiekį, kad būtų įvertinta apdorotos medienos poveikio aplinkai rizika. Aprašytas išmetalų iš konservantais apdorotos medienos įvertinimo laboratorinis metodas, kai yra dvi išmetalų patekimo į aplinką situacijos:
 - išmetalai iš apdorotos medienos, kai ji liečiasi su gėlu vandeniu. Išmetalai nuo apdorotos medienos paviršiaus galėtų patekti į vandenį;
 - išmetalai iš apdorotos medienos, kai ji liečiasi su jūros vandeniu. Išmetalai nuo apdorotos medienos paviršiaus galėtų patekti į jūros vandenį.
2. Šis bandymo metodas skirtas bandyti išmetalams iš apdorotos medienos ir medienos gaminių, kurie yra neapdengti ir liečiasi su gėlu arba jūros vandeniu. Apdoroto gaminio keliamas biologinis pavojus klasifikuojamas naudojimo klasėmis, kurios taikomos tarptautiniu mastu. Naudojimo klasės taip pat nustato apdoroto gaminio naudojimo sąlygas ir aplinkos terpes (oras, vanduo, dirvožemis), kurioms konservantais apdorota mediena gali kelti riziką.
3. Bandymo metodas yra vandens, į kurį buvo pamerkta apdorota mediena (sugėrimo terpės), ėminių ėmimo, didinant pamerkimo trukmę laboratorinė procedūra. Išmetalų kiekis sugėrimo terpėje susiejamas su medienos paviršiaus plotu ir pamerkimo trukme, kad srautas būtų įvertintas $\text{mg/m}^2/\text{dienai}$. Todėl galima įvertinti srautą (išplovimo spartą) esant didėjančiai pamerkimo trukmei.
4. Išmetalų kiekis gali būti naudojamas įvertinant apdorotos medienos poveikio aplinkai riziką.

ĮŽANGINĖS PASTABOS

5. Manoma, kad išplovimo gėlu vandeniu nuo medienos paviršiaus pobūdis ir smarkumas skiriasi nuo išplovimo jūros vandeniu. Todėl būtina ištirti medienos konservavimo produktų arba mišinių, kuriais apdorojama jūros aplinkoje naudojama mediena, išplovimą iš medienos jūros vandeniu.
6. Medienos konservantais apdorojama mediena turėtų atitikti prekyboje esančią medieną. Ji turėtų būti apdorojama pagal konservantų gamintojo instrukcijas ir atsižvelgiant į atitinkamus standartus bei specifikacijas. Turėtų būti nurodyti apdorotos medienos kondicionavimo prieš bandymo pradžią parametrai.
7. Naudojami medienos bandiniai turėtų atitikti gaminius (pvz., medienos rūšis, tankis ir kitos charakteristikos).
8. Bandyti galima medieną, kuriai apdoroti taikomas įmirkomasis arba paviršiaus dengimo procesas, arba apdorotą medieną, kurios paviršius papildomai apdorojamas privalomu būdu (pvz., dažais, kuriais dengiama atsižvelgiant į komercinio naudojimo reikalavimą).
9. Nustatant išmetalų iš medienos kiekį, sudėtį ir prigimtį, svarbi vandens sudėtis, kiekis, pH ir fizinė būseną.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

10. Konservantais apdoroti medienos bandiniai įmerkiami į vandenį. Ekspozicijos (pamerkimo) laikotarpiu, kurio pakaktų statistiniams skaičiavimams atlikti, daug kartų imami ir chemiškai analizuojami vandens (sugėrimo terpės) ėminiai. Pagal analizės rezultatus apskaičiuojama išmetalų išsiskyrimo sparta $\text{mg/m}^2/\text{dienai}$. Reikėtų užrašyti ėminių ėmimo laikotarpius. Neapdorotų bandinių bandymus galima nutraukti, jei fonas neaptinkamas pirmiems trimis duomenų taškams.

11. Įtraukus neapdorotos medienos bandinius, galima nustatyti kitų nei naudojamas konservantas išmetalų sugėrimo terpių foninę koncentraciją.

KOKYBĖS KRITERIJAI

Tikslumas

12. Išmetalų kiekiui įvertinti taikomo bandymo metodo tikslumas priklauso nuo bandinių atitikties pramoniniu būdu apdorotai medienai, nuo vandens atitikties tikrajam vandeniui ir nuo ekspozicijos režimo atitikties natūralioms sąlygoms.
13. Analizės metodo tikslumas, preciziškumas ir pakartojamumas turėtų būti nustatyti prieš bandymo pradžią.

Atkuriamumas

14. Imami ir analizuojami trys vandens ėminiai ir jų vidutinė vertė imama kaip išmetalų išsiskyrimo vertė. Vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose gautų rezultatų atkuriamumas priklauso nuo mirkymo režimo ir bandinių medienos.

Priimtinas rezultatų intervalas

15. Priimtinas šio bandymo rezultatų intervalas, kurio apatinė ir viršutinė vertės skiriasi mažiau nei viena dydžio eilė.

BANDYMO SĄLYGOS

Vanduo

16. Išplovimo gėlu vandeniu scenarijai: išplovimo bandymui atlikti rekomenduojamas dejonizuotas vanduo (pvz., ASTM D 1193 II tipo), kai turi būti įvertinta gėlu vandeniu veikiama mediena. Vandens temperatūra turi būti 20 °C +/- 2 °C, o išmatuota vandens pH vertė ir temperatūra turi būti įtraukta į bandymo ataskaitą. Analizuojant vandens ėminius, paimtus prieš apdorotų bandinių įmerkimą, galima įvertinti vandenyje esančias analizuojamas chemines medžiagas. Tai yra kontroliniai ėminiai, pagal kuriuos būtų galima nustatyti vėliau analizuojamų cheminių medžiagų foninę koncentraciją.
17. Išplovimo jūros vandeniu scenarijai: išplovimo bandymui atlikti rekomenduojamas sintetinis jūros vanduo (pvz., ASTM D 1141 *Jūros vandens pakaitalas, neturintis sunkiųjų metalų*), kai turi būti įvertinta jūros vandeniu veikiama mediena. Vandens temperatūra turi būti 20 °C +/- 2 °C, o išmatuota vandens pH vertė ir temperatūra turi būti įtraukta į bandymo ataskaitą. Analizuojant vandens ėminius, paimtus prieš apdorotų bandinių įmerkimą, galima įvertinti vandenyje esančias analizuojamas chemines medžiagas. Tai yra kontroliniai ėminiai, pagal kuriuos būtų galima nustatyti svarbių cheminių medžiagų foninę koncentraciją.

Medienos bandiniai

18. Medienos rūšys turėtų būti tipinės medienos konservantų efektyvumui bandyti naudojamos medienos rūšys. Rekomenduojamos rūšys yra *Pinus sylvestris* L. (paprastoji pušis), *Pinus resinosa* Ait. (sakingoji pušis) arba *Pinus spp* (pietinė pušis). Galima atlikti papildomus bandymus naudojant kitas rūšis.
19. Reikėtų naudoti tiesaus pluošto medieną be šakų. Reikėtų vengti naudoti sakingos išvaizdos medžiagą. Mediena turėtų būti tipinė parduotuvėse esanti mediena. Reikėtų užrašyti šaltinį, tankį ir metinių rėvių skaičių kas 10 mm.
20. Rekomenduojamus medienos bandinius turėtų sudaryti rinkinys iš penkių blokų, kurių dydis atitinka EN 113 (matmenys 25 mm x 50 mm x 15 mm) ir kurių išilginiai paviršiai eina lygiagrečiai su medienos pluoštu, nors galima naudoti kitus matmenis, pvz., 50 mm x 150 mm x 10 mm. Bandinys turėtų būti visiškai panardintas į vandenį. Bandinius turi sudaryti 100 % balana. Kiekvienas bandinys unikaliai ženklintas, kad jį būtų galima identifikuoti visą bandymą.
21. Visi bandiniai turėtų būti obliuoti arba išilgai išpjauti, o jų paviršius turėtų būti nešlifluotas.

22. Analizei naudojami ne mažiau kaip penki medienos bandinių rinkiniai: trys bandinių rinkiniai apdorojami konservantu, vienas neapdorojamas ir vienas rinkinys naudojamas apdorojamų bandinių drėgmės kiekiui nustatyti, juos išdžiovinus džiovinimo kameroje. Paruošiama pakankamai bandinių, kad būtų galima pasirinkti tris rinkinius, kurių bandinių konservanto įgėris būtų lygus visų bandinių atsargų vidutiniam įgėriui 5 % tikslumu.
23. Visų bandinių galai sandarinami chemine medžiaga, kuri apsaugo nuo konservanto skverbimosi į bandinių galus arba nuo konservanto išplovimo per galus. Dengiant galų sandarinimo priemone, būtina atskirti bandinius, kurių dengiamas paviršius, ir bandinius, kuriems taikomas įmirkomasis apdorojimas. Galų sandarinimo priemone reikia dengti prieš apdorojimą tik tais atvejais, kai dengiamas paviršius.
24. Taikant įmirkomojo apdorojimo procesus, galinis paviršius turi būti atviras. Todėl bandinių galai turi būti sandarinami kondicionavimo laikotarpio pabaigoje. Turi būti įvertinamas tik išmetalų išsiskyrimas iš išilginės paviršiaus zonos. Sandarinimo priemonės reikėtų patikrinti ir prireikus padengti jomis iš naujo prieš išplovimo pradžią, bet jomis nereikėtų dengti pradėjus išplovimą.

Mirkymo indas

25. Indas pagamintas iš inertiškos medžiagos ir yra pakankamai didelis, kad 5 medienos bandiniai pagal EN 113 tilptų 500 ml vandens ir būtų gautas paviršiaus ploto bei vandens tūrio santykis 0,4 cm²/ml.

Bandinio bandymo sąranka

26. Bandiniai tvirtinami sąrankoje, kuri užtikrina visų bandinio veikiamų paviršių sąlytį su vandeniu.

APDOROJIMO KONSERVANTAIS PROCEDŪRA

Apdorotų bandinių paruošimas

27. Bandinys apdorojamas bandomuoju konservantu nurodytu būdu, kuris gali būti įmirkomojo apdorojimo procesas arba paviršiaus dengimo procesas, atliekamas panardinant, purškiant ar užtepant šepčiu.

Konservantai, kurie būtų naudojami įmirkomojo apdorojimo būdu

28. Reikėtų paruošti konservanto tirpalą, kuris pasiektų nurodytą sugertį arba įgėrį, tirpalą naudojant įmirkomojo apdorojimo būdu. Medienos bandinys pasveriamas ir išmatuojami jo matmenys. Įmirkomojo apdorojimo procesas turėtų atitikti 4 ar 5 naudojimo klasei nurodytą medienos konservanto naudojimo būdą. Bandinys dar kartą pasveriamas po apdorojimo ir įgėris (kg/m³) apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$\frac{\text{masė po apdorojimo (kg)} - \text{masė prieš apdorojimą (kg)}}{\text{bandinio tūris (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{tirpalo koncentracija (\% masės / masė)}}{100}.$$

29. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad šiam bandymui atlikti galima naudoti pramoniniu būdu (pvz., impregnuojant vakuume) apdorotą medieną. Turėtų būti užrašytos taikytos procedūros ir turi būti analizuojamas bei užrašomas taip apdorotos medžiagos įgėris.

Konservantai, kurie būtų naudojami jais dengiant paviršių

30. Apdorojimo būdas dengiant paviršių yra medienos bandinių dengimas panardinant, purškiant ar užtepant šepčiu. Procesas ir dengimo norma (pvz., litrais/m²) turėtų atitikti nurodytą konservantui jį taikant paviršiaus dengimo būdu.

31. Be to, atkreipiamas dėmesys į tai, kad šiam bandymui atlikti galima naudoti pramoniniu būdu apdorotą medieną. Turėtų būti užrašytos taikytos procedūros ir turi būti analizuojamas bei užrašomas taip apdorotos medžiagos įgėris.

Apdorotų bandinių kondicionavimas

32. Apdorotus bandinius reikėtų kondicionuoti pagal bandomojo konservanto tiekėjo rekomendacijas, atsižvelgiant į konservanto etiketėje nurodytus reikalavimus arba į pramoninio apdorojimo metodus ar į EN 252 standartą.

Bandinių paruošimas ir atranka

33. Atlikus kondicionavimą po apdorojimo, apskaičiuojamas bandinių grupės vidutinis įgėris ir trys reprezentatyvūs rinkiniai, kurių bandinių įgėris atitinka vidutinį grupės įgėrį 5 % tikslumu, kurie atsitiktinai parenkami išplovimo matavimams.

KONSERVANTŲ IŠMETALŲ IŠSISKYRIMO MATAVIMO PROCEDŪRA

Mirkymo metodas

34. Bandiniai pasveriami ir visiškai panardinami į vandenį, užrašant įmerkimo datą bei laiką. Garavimui sumažinti indas uždengiamas.
35. Vanduo keičiamas tokiais laiko tarpais: 6 h, 1 diena, 2 dienos, 4 dienos, 8 dienos, 15 dienų, 22 dienos, 29 dienos (Pastaba: tai yra visas laikas, o ne intervalo trukmė). Reikėtų užrašyti vandens keitimo datą bei laiką ir iš indo išpildo vandens masę.
36. Po kiekvieno vandens, kuriame buvo mirkomas bandinių rinkinys, keitimo imamas jo ėminys, kad vėliau būtų galima atlikti cheminę analizę.
37. Taikant tokią ėminių ėmimo procedūrą, galima apskaičiuoti išmetalų kiekio kaip laiko funkcijos kreivę. Ėminius reikėtų laikyti sąlygomis, kuriomis analizė būtų išsaugota, pvz., šaldytuve ir tamsoje, kad juose prieš analizę augtų mažiau mikrobu.

IŠMETALŲ IŠSISKYRIMO MATAVIMAI

Apdoroti bandiniai

38. Atliekama paimtų vandens ėminių cheminė analizė veikliajai cheminei medžiagai ir (arba), jei tinka, jos skaidymo ar virsmo produktams nustatyti.

Neapdoroti bandiniai

39. Imant šios sistemos vandens (sugerties terpės) ėminius ir vėliau atliekant iš neapdorotos medienos išplautų cheminių medžiagų cheminę analizę, galima įvertinti galimą konservanto išmetalų išsiskyrimo iš neapdoroto ėminio spartą. Vis didesniais ekspozicijos tarpais imant sugerties terpės ėminius ir juos analizuojant, galima įvertinti išmetalų išsiskyrimo spartos kitimą kaip laiko funkciją. Ši analizė yra kontrolės procedūra, kurią taikant būtų galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos foninę koncentraciją neapdorotoje medienoje, siekiant patvirtinti, kad bandiniams naudojama mediena prieš tai nebuvo apdorota konservantu.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Cheminė analizė

40. Paimti vandens ėminiai chemiškai analizuojami ir vandens analizės rezultatai išreiškiami atitinkamais vienetais, pvz., µg/l.

Duomenų pateikimas

41. Visi rezultatai užrašomi. Priedėlyje pateiktas siūlomos vieno apdorotų bandinių rinkinio duomenų užrašymo formos pavyzdys ir suvestinė lentelė vidutinėms kiekvieno ėminių ėmimo intervalo išmetalų išsiskyrimo vertėms skaičiuoti.
42. Dienos išmetalų išsiskyrimo srautas $\text{mg/m}^2/\text{dienai}$ skaičiuojamas trijų kartotinių ėminių matavimų vidutinę vertę dalijant iš mirkymo dienų skaičiaus.

Bandymo ataskaita

43. Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:
 - bandomojo konservanto tiekėjo pavadinimas;
 - bandomojo konservanto specialus ir unikalus pavadinimas arba kodas;
 - veikliojo (-ų) komponento (-ų) prekinis ar bendrinis pavadinimas, preparato sudedamųjų dalių (pvz., bendrojo tirpiklio, dervos) apibendrintas aprašymas ir komponentų sudėtis % masės;
 - sąlyčiui su vandeniu naudojamos medienos nurodytas atitinkamas igėris ar dengimo norma (kg/m^3 ar l/m^2);
 - naudotos medienos rūšys, medienos tankis ir augimo sparta, išreikšta rievių skaičiumi kas 10 mm;
 - bandyto konservanto dengimo norma ar igėris, išreikšti l/m^2 ar kg/m^3 , ir jiems apskaičiuoti taikoma formulė;
 - konservanto naudojimo būdas, nurodant įmerkomojo apdorojimo grafiką, ir dengimo būdas, jei atliekamas paviršiaus apdorojimas;
 - konservanto naudojimo data ir bandinių drėgmės kiekio, išreikšto procentine dalimi, įvertis;
 - taikytos kondicionavimo procedūros, nurodant tipą, sąlygas ir trukmę;
 - naudojamos galų sandarinimo priemonės specifikacija ir dengimo kartų skaičius;
 - bet kokio vėlesnio medienos apdorojimo būdo specifikacija, pvz., dažų tiekėjo, tipo, charakteristikų ir dengimo normos specifikacija;
 - kiekvieno mirkymo atvejo laikas ir data, bandiniams pamerkti naudoto vandens kiekis kiekvienu atveju ir mirkant medieną sugerto vandens kiekis;
 - visi nukrypimai nuo aprašyto metodo ir visi veiksniai, kurie galėjo daryti įtaką rezultatams.

NUORODOS

- (1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.

-
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
 - (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.
-

1 priedėlis

Bandymo metodo užrašymo forma

Išmetų į aplinką iš konservantais apdorotos medienos įvertinimas. Laboratorinis metodas, taikomas neapdengtiems medienos gaminiams, kurie liečiasi su gėlu ir jūros vandeniu

Bandymo įstaiga	
Medienos konservantas	
Konservanto tiekėjas	
Konservanto specialus ir unikalus pavadinimas ar kodas	
Konservanto prekinis ar bendrinis pavadinimas	
Kitos preparato sudedamosios dalys	
Ilgėris, atitinkantis sąlyčiui su vandeniu naudojamą medieną	
Naudojimas	
Naudojimo būdas	
Naudojimo data	
Ilgėrio apskaičiavimo formulė:	
Kondicionavimo procedūra	
Kondicionavimo trukmė	
Galų sandarinimo priemonė / jos naudojimo kartų skaičius	
Paskesnis apdorojimas	jei tinka
Bandiniai	
Medienos rūšis	
Medienos tankis	(minimalus ... vidutinė vertė ... maksimalus)
Augimo sparta (rievių skaičius kas 10 mm)	(minimalus ... vidutinė vertė ... maksimalus)
Drėgmės kiekis	

Bandymo sąrankos (*)	Igėris (pvz., kg/m³)
Apdorotas „x“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Apdorotas „y“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Apdorotas „z“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Neapdorotas	
Bandymo metodo parametrų kitimas	pvz., vandens kokybės, bandinių matmenų ir kt.

(*) x, y, z atitinka tris kartotinius bandinius.

Laikas	Vandens keitimas	Bandinio masė		Vandens sugertis		Vandens ėminys				
		Apdorotas (vidurkis)	Neapdorotas	Apdorotas (vidurkis)	Neapdorotas		Bandymo vanduo	x	y	z
	Data	g	g	g	g	no.	pH	pH	pH	pH
pradžia										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

Būtina paruošti kiekvieno veikliojo komponento atskiras lenteles

Laikas	Vandens keitimas	Analizės rezultatai														
		Neapdoroti bandiniai			Apdoroti bandiniai											
		Analitės koncentracija vandenyje mg/l	Išsiskyres kiekis mg/m²	Išmetalų išsiskyrimo sparta mg/m²/d	Analitės koncentracija vandenyje				Išsiskyres kiekis				Išmetalų išsiskyrimo sparta			
	x				y	z	Vidurkis	x	y	z	Vidurkis	x	y	z	Vidurkis	
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Pastaba: Kadangi neapdorotų bandinių rezultatai gali būti naudojami apdorotų bandinių išmetų išsiskyrimo spartos pataisoms daryti, neapdorotų bandinių rezultatai turi būti užrašomi pradžioje ir visos apdorotų bandinių vertės būtų „pataisytos vertės“. Taip pat gali būti padaryta pataisa dėl pradinės vandens analizės.

*2 priedėlis***Apibrėžtys**

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

C.46. BIOLOGINIS KAUPIMASIS NUOSĖDOSE GYVENANČIOSE DUGNO MAŽAŠERĖSE ŽIEDUOTOSIOSIOSE KIRMĖLĖSE**IVADAS**

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 315 (2008). Nuosėdas ryjančius dugno gyvūnus gali veikti nuosėdų surištos cheminės medžiagos (1). Tarp šių nuosėdas ryjančių gyvūnų vandens mažąsias žieduotosios kirmėlės vaidina svarbų vaidmenį vandens sistemų dugne. Jos gyvena nuosėdose ir dažnai reprezentuoja gausiausią rūšį, ypač buveinėse, kurių aplinkos sąlygos yra nepalankios kitiems gyvūnams. Dėl nuosėdų bioturbacijos ir būdami grobiu šie gyvūnai gali daryti didelę įtaką kitų organizmų, pvz., dugno plėšriųjų žuvų, tokių cheminių medžiagų biologiniam įsisavinamumui. Kitaip nei priedugnio organizmai, dugno vandens mažąsias žieduotosios kirmėlės įsirausia į nuosėdas ir ryja jų daleles nuosėdų viduje. Todėl yra daug kelių, kuriais cheminės medžiagos gali veikti šiuos organizmus, įskaitant tiesioginį sąlytį, užterštų nuosėdų dalelių, porų vandens ir virš nuosėdų esančio vandens rijimą. Kai kurios dugno mažųjų žieduotųjų kirmėlių rūšys, šiuo metu naudojamos atliekant ekotoksikologinius bandymus, yra aprašytos 6 priedėlyje.
2. Cheminės medžiagos biologinio kaupimosi apibūdinimo parametrus sudaro, visų pirma, biologinio kaupimosi faktorius (BAF), nuosėdų sugerties greičio konstanta (k_d) ir šalinimo greičio konstanta (k_e). Išsamios šių parametrų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.
3. Norint apskritai įvertinti cheminių medžiagų biologinio kaupimosi potencialą ir ištirti cheminių medžiagų, kurios linkusios pasiskirstyti į nuosėdas ir ant jų, biologinį kaupimąsi, reikia turėti su aplinkos komponentais susijusį bandymo metodą (1)(2)(3)(4).
4. Šis bandymo metodas yra su nuosėdomis susijusių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi dugno mažąsias žieduotosiose kirmėlėse vertinimo metodas. Nuosėdos sodrinamos bandomąja chemine medžiaga. Sodrintų nuosėdų naudojimo tikslas yra modeliuoti užterštas nuosėdas.
5. Šis metodas pagrįstas esamais nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymo metodais (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Kiti naudingi dokumentai yra: tarptautinio seminario diskusijos ir rezultatų svarstymas (11) ir tarptautinio tarplaboratorinio tyrimo rezultatai (12).
6. Šis bandymas taikomas stabilioms, neutralioms organinėms cheminėms medžiagoms, kurios yra linkusios jungtis su nuosėdomis. Šiuo metodu taip pat galima matuoti su nuosėdomis sujungtus stabilus metaloorganinius junginius (12). Jis netinka metalams ir kitiems mikroelementams (11), nepakeitus bandymo schemos atsižvelgiant į substratą bei vandens tūrį ir, galbūt, audinio bandinio matmenis.

BŪTINOS SĄLYGOS IR INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Šiuo metu yra tik kelios tinkamai nustatytos sandaros ir aktyvumo kiekybinės priklausomybės (QSAR), susijusios su biologinio kaupimosi procesais (14). Plačiausiai taikomas santykis yra koreliacija tarp stabilų organinių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi bei biologinio koncentravimo ir jų lipofiliškumo (išreikšto kaip oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficiento logaritmas ($\log K_{ow}$); dėl apibrėžties žr. 1 priedėlį), kuri buvo sukurta siekiant aprašyti cheminės medžiagos pasiskirstymą tarp vandens ir žuvų. Taikant šią priklausomybę taip pat buvo nustatytos nuosėdų terpės koreliacijos (15)(16)(17)(18). $\log K_{ow}$ ir $\log BCF$ koreliacija, kaip pagrindinė QSAR, gali būti naudinga atliekant su nuosėdomis sujungtų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi potencialo parengiamąjį įvertinimą. Tačiau BAF gali turėti įtaką bandymo organizmo lipidų kiekis ir nuosėdų organinės anglies kiekis. Todėl organinės anglies ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) taip pat gali būti naudojamas kaip pagrindinis su nuosėdomis sujungtų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi lemiamas veiksnys.
8. Šis bandymas tai pat tinka:
 - stabilioms organinėms cheminėms medžiagoms, kurių $\log K_{ow}$ vertės yra nuo 3,0 iki 6,0 (5)(19) ir ypač lipofilinėms cheminėms medžiagoms, kurių $\log K_{ow}$ yra didesnis kaip 6,0 (5);
 - cheminėms medžiagoms, kurios priklauso organinių medžiagų, žinomų dėl jų biologinio kaupimosi gyvuose organizmuose potencialo, klasei, pvz., paviršinio aktyvumo medžiagų arba stipriai adsorbuojamų cheminių medžiagų (pvz., didelis K_{oc}).

9. Prieš tyrimo pradžią reikėtų gauti informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, pvz., apie saugos priemones, tinkamas laikymo sąlygas bei stabilumą ir analizės metodus. Cheminių medžiagų, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų tyrimą, bandymo rekomendacijos pateiktos (20) ir (21). Prieš atliekant biologinio kaupimosi bandymą su vandens mažašerėmis žieduotosiomis kirmėlėmis, reikėtų žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:
- bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas (pageidautina, IUPAC pavadinimas), CAS registracijos numeris, grynumas;
 - tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas (22)];
 - oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas, K_{ow} [A.8, A.24 bandymo metodai (22)];
 - pasiskirstymo tarp nuosėdų ir vandens koeficientas, išreikštas kaip K_d ar K_{oc} [C.19 bandymo metodas (22)];
 - hidrolizė [C.7 bandymo metodas (22)];
 - fotocheminis virsmas vandenyje (23);
 - garų slėgis [A.4 bandymo metodas (22)];
 - lengvas biologinis skaidumas [C.4 ir C.29 bandymo metodai (22)];
 - paviršiaus įtempis [A.5 bandymo metodas (22)];
 - kritinė micelių susidarymo koncentracija (24).
- Be to, būtų svarbi ši informacija, jei yra:
- biologinis skaidumas vandeninėje aplinkoje [C.24 ir C.25 bandymo metodai (22)];
 - Henrio dėsnio konstanta.
10. Radioaktyviaisiais izotopais žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos gali palengvinti vandens, nuosėdų ir biologinių ėminių analizę, ir gali būti naudojamos tam, kad būtų nustatyta, ar reikėtų atlikti skaidymo produktų identifikavimą ir kiekybinį nustatymą. Šiame dokumente aprašyto metodo tinkamumas buvo patvirtintas atliekant tarptautinį tarplaboratorinį ^{14}C žymėtųjų cheminių medžiagų tyrimą (12). Jei matuojamas suminis radioaktyviųjų likučių kiekis, biologinio kaupimosi faktorius (BAF) yra pagrįstas pradine chemine medžiaga, įskaitant visus išlikusius skaidymo produktus. Taip pat galima sujungti metabolizmo tyrimą su biologinio kaupimosi tyrimu atliekant pradinės cheminės medžiagos ir jos skaidymo produktų analizę ir kiekybinį procentinės dalies nustatymą ėminiuose, paimtuose sugėrimo tarpsnio pabaigoje arba esant didžiausiam biologinio kaupimosi lygiui. Visais atvejais rekomenduojama, kad BAF skaičiavimas būtų pagrįstas pradinės cheminės medžiagos koncentracija organizmuose, bet ne tik suminiu radioaktyviųjų likučių kiekiu.
11. Be bandomosios cheminės medžiagos savybių, kita reikiama informacija yra toksiškumas bandymams naudojamų mažašerių žieduotųjų kirmelių rūšims, pvz., medianinė mirtina koncentracija (LC_{50}) esant būtinai sugėrimo tarpsnio trukmei, siekiant užtikrinti, kad parinktos ekspozicijos koncentracijos vertės yra gerokai mažesnės nei toksiniai lygiai. Pirmenybė turėtų būti teikiama toksiškumo vertėms, gautoms atliekant subletalų vertinamųjų baigčių (EC_{50}) ilgalaikius tyrimus, jei yra. Jei tokių duomenų nėra, naudingos informacijos gali suteikti ūmaus toksiškumo bandymas, atliekamas biologinio kaupimosi bandymą atitinkančiomis sąlygomis, arba kitoms pakaitinėms rūšims gauti toksiškumo duomenys.
12. Būtina turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrio analizės metodą bandomosios medžiagos koncentracijai bandymo tirpaluose, nuosėdose ir biologinėje medžiagoje nustatyti, ėminių ruošimo ir laikymo duomenis ir medžiagų saugos duomenų lapus. Taip pat reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos analizinio aptikimo vandenyje, nuosėdose ir kirmelių audinyje ribas. Jei naudojama žymėtoji cheminė medžiaga, turi būti žinomas jos savitasis aktyvumas (t. y. $Bq \cdot mol^{-1}$), žymėtojo atomo padėtis ir su priemonėmis susijusio radioaktyvumo procentinė dalis. Bandomosios cheminės medžiagos savitasis aktyvumas turėtų būti kuo didesnis, kad būtų galima nustatyti kuo mažesnę koncentraciją (11).
13. Reikėtų turėti informacijos apie naudojamų nuosėdų charakteristikas (pvz., nuosėdų arba jų sudedamųjų dalių kilmę, porų vandens pH ir amoniako koncentraciją (natūralių nuosėdų), organinės anglies kiekį (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymą (smėlio, dumblo ir molio procentinę dalį) ir sausos medžiagos masės procentinę dalį (6)).

BANDYMO PRINCIPAS

14. Bandymą sudaro du tarpsniai; sugerties (ekspozicijos) tarpsnio ir pašalinimo (poekspozicinio) tarpsnio. Sugerties tarpsniu kirmėlės veikiamos bandomąja chemine medžiaga sodrintomis nuosėdomis, ant kurių užpilta atkurtojo vandens ir pasiekta reikiama pusiausvyra (11). Kontrolinių kirmėlių grupės laikomos vienodomis sąlygomis, bet be bandomosios cheminės medžiagos.
15. Šalinimo tarpsniu kirmėlės pernešamos į nuosėdų ir vandens sistemą be bandomosios cheminės medžiagos. Šalinimo tarpsnis yra būtinas tam, kad būtų gauta informacija apie greitį, kuriuo bandomoji cheminė medžiaga pasišalina iš bandymo organizmų (19)(25). Šalinimo tarpsnis yra būtinas visuomet, išskyrus atvejus, kai bandomosios cheminės medžiagos sugertis ekspozicijos tarpsniu buvo nereikšminga (pvz., nėra statistinio skirtumo tarp bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos bandymo ir jos koncentracijos kontrolinėse kirmėlėse). Jei sugerties tarpsniu pastovioji būseną nepasiekama, kinetinius duomenis, BAF_k , sugerties ir šalinimo greičio konstantą (-as), galima nustatyti pagal šalinimo tarpsnio rezultatus. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kitimas kirmėlėse ir ant jų stebimas abiem bandymo tarpsniais.
16. Sugerties tarpsniu matuojama tol, kol BAF pasiekia pastoviąją būseną. Numatytoji sugerties tarpsnio trukmė turėtų būti 28 dienos. Praktinė patirtis parodė, kad kelioms stabilioms neutralioms organinėms cheminėms medžiagoms pakanka nuo 12 iki 14 dienų sugerties tarpsnio pastoviai būsenai pasiekti (6)(8)(9).
17. Tačiau, jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 dienas, pradedamas šalinimo tarpsnis, veiktas mažesnes žieduotąsias kirmėles pernešant į indus su ta pačia terpe be bandomosios cheminės medžiagos. Šalinimo tarpsnis baigiamas, kai koncentracija pasiekia 10 % koncentracijos, išmatuotos kirmėlėse sugerties tarpsnio 28 dieną, arba ne vėliau kaip po 10 dienų. Liekamoji koncentracija kirmėlėse šalinimo tarpsnio pabaigoje ataskaitoje nurodoma kaip papildoma vertinamoji baigtis, pvz., kaip nepašalintieji likučiai (NER). Pageidautina biologinio kaupimosi faktorių (BAF_{50}) apskaičiuoti kaip tariamosios pastoviosios būsenos koncentracijos kirmėlėse (C_a) ir nuosėdose (C_s) santykį ir kaip kinetinį biologinio kaupimosi faktorių BAF_k kaip sugerties iš nuosėdų greičio konstantos (k_s) ir šalinimo greičio konstantos (k_d) santykį, darant prielaidą dėl pirmojo laipsnio kinetikos. Jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 dienas, BAF_k skaičiuojamas pagal sugerties greičio ir šalinimo greičio konstantą (-as). Dėl skaičiavimo žr. 2 priedėlį. Jei pirmojo laipsnio kinetika netinka, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (2 priedėlis ir (25) nuoroda).
18. Jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 dienas, sugerties tarpsnį pasirinktinai galima pratęsti, toliau matuojant veikiamų kirmėlių grupes, jei yra, tol, kol pasiekama pastovioji būseną; tačiau 28 dieną nuo sugerties tarpsnio pradžios lygiagrečiai reikėtų pradėti šalinimo tarpsnį.
19. Sugerties greičio konstanta, šalinimo greičio konstanta (arba konstantos, jei įtraukti sudėtingesni modeliai), kinetinis biologinio kaupimosi faktorius (BAF_k) ir, jei įmanoma, kiekvieno iš šių parametru pasikliovimo ribos skaičiuojamos pagal kompiuterizuoto modelio lygtis (dėl modelių žr. 2 priedėlį). Visų modelių sutapties laipsnis gali būti nustatytas pagal koreliacijos koeficientą arba determinacijos koeficientą (sutaptis gera, jei koeficientai yra arti 1).
20. Siekiant sumažinti ypač lipofilinių organinių cheminių medžiagų rezultatų kintamumą, biologinio kaupimosi faktorius papildomai reikėtų išreikšti bandymo organizmų lipidų kiekio ir nuosėdų organinės anglies kiekio (TOC) atžvilgiu (biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius arba $BSAF$ kg nuosėdų TOC kg^{-1} kirmėlių lipidų kiekio). Šis būdas pagrįstas patirtimi ir teorinėmis koreliacijomis, nustatytomis vandeninei terpei, kurioje kai kurios cheminių junginių klasės rodo aiškų ryšį tarp cheminės medžiagos biologinio kaupimosi potencialo ir jos lipofilumo, kuris tinkamai nustatytas žuvims kaip modeliniams organizmams (14)(25)(27). Taip pat yra ryšys tarp bandymo žuvies lipidų kiekio ir stebimo tokių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi. Dugno organizmams buvo nustatytos panašios koreliacijos (15)(16)(17)(18). Jei pakanka turimo kirmėlių audinio, bandymo gyvūnų lipidų kiekį galima nustatyti naudojant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti naudotą biologinę medžiagą. Tačiau lipidų kiekiui nustatyti patogiau naudoti aklimatizuotus kontrolinius gyvūnus, bent jau sugerties tarpsnio pradžioje arba, pageidautina, sugerties tarpsnio pabaigoje, tada šį kiekį galima naudoti BAF vertėms normalizuoti.

BANDYMO TINKAMUMAS

21. Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

- suminis kirmėlių gaištamumas (kontrolinių ir bandomųjų ėminių) iki bandymo pabaigos neturėtų būti didesnis kaip 20 % pradinio skaičiaus.
- Be to, reikėtų įrodyti, kad kirmėlės įsirausia į nuosėdas, kad būtų įmanoma maksimali ekspozicija. Išsamesnė informacija pateikta 28 pastraipoje.

METODO APRAŠYMAS

Bandomųjų gyvūnų rūšys

22. Bandymui galima naudoti kelias vandens mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšis. Dažniausiai naudojamos rūšys išvardytos 6 priedėlyje.
23. Reguliariai (pvz., kas mėnesį) reikėtų atlikti toksiškumo bandymus (96 h, tik vandenyje), naudojant etaloninę toksinę cheminę medžiagą, pvz., kalio chloridą (KCl) ar vario sulfatą (CuSO_4) (1), kad būtų įrodyta bandymo gyvūnų sveikatos būklė (1)(6). Jei etaloniniai toksiškumo bandymai neatliekami reguliariai, etalonine chemine medžiaga reikėtų patikrinti organizmų partiją, skirtą nuosėdų biologinio kaupimosi bandymui. Lipidų kiekio matavimas taip pat galėtų suteikti naudingos informacijos apie gyvūnų būklę.

Bandymo organizmų kultūra

24. Siekiant turėti kirmėlių skaičių, kurio pakaktų biologinio kaupimosi bandymams, jas gali tekti laikyti nuolatinėje vienos rūšies laboratorijos kultūroje. Parinktų bandomųjų gyvūnų rūšių laboratoriniai auginimo metodai apibendrinti 6 priedėlyje. Išsamesnė informacija pateikta (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32) nuorodose.

Aparatūra

25. Reikėtų imtis priemonių, kad visoms įrangos dalims nebūtų naudojamos medžiagos, kurios gali ištirpti, absorbuoti bandomąsias chemines medžiagas arba išplauti kitas chemines medžiagas ir neigiamai paveikti bandymo gyvūnus. Galima naudoti standartines stačiakampio arba ritinio formos kameras, pagamintas iš chemiškai inertinės medžiagos ir reikiamos talpos, kuri atitiktų įkrovos dydį, t. y. galimą bandymo kirmėlių skaičių. Nereikėtų naudoti minkštų plastikinių vamzdžių vandeniui arba orui tiekti. Įranga, kuri liečiasi su bandymo terpe, turėtų būti pagaminta iš nerūdijančiojo plieno ir (arba) stiklo. Medžiagoms, kurios turi didelį adsorbcijos koeficientą, pvz., sintetiniams piretroidams, gali būti reikalingas silanizuotas stiklas. Šiomis sąlygomis įranga po naudojimo turėtų būti išmesta (5). Reikėtų imtis priemonių, kad žymėtosios ir lakiosios bandomosios cheminės medžiagos negalėtų pasišalinti arba būtų sugaudytos. Reikėtų naudoti gaudykles (pvz., stiklines dujų plovimo kolbas) su tinkamais absorbentais, kurie sulaikytų visus iš bandymo kamerų garuojančius likučius (11).

Vanduo

26. Vanduo virš nuosėdų turi būti tokios kokybės, kad bandomieji gyvūnai galėtų išgyventi visą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpį trukmę ir nebūtų matyti jokios jų nenormalios išvaizdos ar elgesio. Kaip vandenį virš nuosėdų, kuris būtų naudojamas bandymams atlikti ir laboratorinėms kirmėlių kultūroms auginti, rekomenduojama naudoti atkurtąjį vandenį pagal bandymo metodą C.1 (25). Įrodyta, kad šiame vandenyje gali išgyventi, augti ir daugintis kelios rūšys (8) ir užtikrinamas maksimalus bandymo ir auginimo sąlygų standartizavimas. Vandenį reikėtų apibūdinti, nurodant bent pH, laidį ir kietumą. Naudingos informacijos būtų galima gauti atliekant vandens mikroteršalų analizę, prieš jį naudojant (4 priedėlis).
27. Vanduo turėtų būti pastovios kokybės visą bandymo laikotarpį. Vandens virš nuosėdų pH turėtų būti nuo 6 iki 9. Suminis kietumas bandymo pradžioje turėtų būti nuo 90 iki 400 mg CaCO_3 litrui (7). Pirmiau nurodyto atkurtojo vandens pH ir kietumo intervalas pateiktas bandymo metode C.1 (25). Jei manoma, kad gali būti sąveika tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį. 4 priedėlyje apibendrinami papildomi priimtino skiedimo vandens kriterijai pagal EBPO TG 210 (34).

Nuosėdos

28. Nuosėdos turi būti tokios kokybės, kad bandymo organizmai galėtų išgyventi ir, pageidautina, dauginis visą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpį trukmę ir nebūtų matyti jokios jų nenormalios išvaizdos arba elgesio. Kirmėlės turėtų įsirausti į nuosėdas. Įsirausimo elgesys gali turėti įtakos ekspozicijai, taigi ir BAF. Todėl reikėtų užrašyti bandymo organizmų vengimą raustis į nuosėdas arba jų įsirausimo elgesį, jei vandens virš nuosėdų drumstumas sudaro sąlygas tokiems stebėjimams atlikti. Kirmėlės (kontrolinių ir apdorotų ėminių) turėtų įsirausti į nuosėdas per 24 h jas suleidus į indus. Stebimas nuolatinis nenoras įsirausti arba nuosėdų vengimas (pvz., daugiau kaip 20 % ilgiau kaip pusę sugerties tarpsnio trukmės) rodo, kad yra netinkamos bandymo sąlygos arba bandymo organizmai nesveiki, arba šią reakciją sukelia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Tokiu atveju bandymas turėtų būti stabdomas ir kartojamas geresnėmis sąlygomis. Papildomos informacijos apie nuosėdų rijimą galima gauti taikant metodus, aprašytus (35)(36), kurie apibūdina nuosėdų rijimą arba dalelių atranką atliekant bandymus su bandymo organizmais. Jei nuosėdų paviršiuje stebimos išmatų granulės, kurios rodo, kad kirmėlės ryja nuosėdas, arba jei išmatų nėra, tai reikėtų užrašyti ir atsižvelgti, aiškinant bandymo rezultatus, susijusius su ekspozicijos keliais.
29. Bandymams ir kirmėlių laboratorijų kultūroms rekomenduojama naudoti dirbtines nuosėdas, kurių pagrindinė dalis yra dirbtinis dirvožemis, aprašytas bandymo metode C.8 (40) (5 priedėlis), nes reikiamos kokybės natūralių nuosėdų gali būti neįmanoma gauti ištisus metus. Be to, įtaką bandymui galėtų daryti natūralių nuosėdų vietiniai organizmai, taip pat galimi mikroteršalai. Dirbtinėse nuosėdose gali išgyventi, augti ir dauginis kelių rūšių bandomieji gyvūnai (8).
30. Dirbtines nuosėdas turėtų apibūdinti bent sudedamųjų dalių kilmė, dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis), organinės anglies kiekis (TOC), vandens kiekis ir pH. Galima išmatuoti oksidacijos-redukcijos potencialą. Tačiau, kaip bandymo ir (arba) kultūros nuosėdas galima naudoti natūralias nuosėdas iš neužterštų vietų (1). Natūralias nuosėdas turėtų apibūdinti kilmė (surinkimo vieta), porų vandens pH ir amoniako kiekis, organinės anglies kiekis (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis) ir vandens kiekio procentinė dalis (6). Jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, natūralias nuosėdas rekomenduojama prieš sodrinant bandomąją chemine medžiaga kondicionuoti septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrautų vėliau atliekant bandymą. Pasibaigus šiam kondicionavimo laikotarpiui, vanduo virš nuosėdų turėtų būti pašalintas ir išpiltas. Naudingos informacijos būtų galima gauti atliekant nuosėdų arba jų sudedamųjų dalių mikroteršalų analizę prieš jas naudojant.

Ruošimas

31. Natūralių nuosėdų apdorojimas prieš jas naudojant laboratorijoje aprašytas (1)(6)(44). Dirbtinių nuosėdų ruošimas aprašytas 5 priedėlyje.

Laikymas

32. Natūralias nuosėdas reikėtų laikyti laboratorijoje kuo trumpiau. JAV EPA (6) rekomenduoja laikyti ne ilgiau kaip 8 savaites tamsoje ir $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Laikymo talpyklose virš nuosėdų neturėtų būti viršutinės erdvės. Rekomendacijos dėl dirbtinių nuosėdų laikymo pateiktos 5 priedėlyje.

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

33. Nuosėdos sodrinamos bandomąją chemine medžiaga. Sodrinimo procedūrą sudaro vieno arba kelių nuosėdų sudedamųjų dalių padengimas bandomąją chemine medžiaga. Pavyzdžiui, kvarcinis smėlis arba jo dalis (pvz., 10 g kvarcinio smėlio vienam bandymo indui) gali būti mirkomas bandomosios cheminės medžiagos tirpalu tinkamame tirpiklyje, kuris paskui lėtai išgarinamas iki sauso likučio. Paskui padengtą frakciją galima sumaišyti su šlapiomis nuosėdomis. Į smėlio kiekį, gautą su bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišiniu, turi būti atsižvelgta ruošiant nuosėdas, t. y. jas reikėtų ruošti imant mažiau smėlio (6).

34. Bandomąją cheminę medžiagą galima įterpti į natūralias nuosėdas, sodrinant sausą nuosėdų dalį, kaip aprašyta pirmiau kalbant apie dirbtines nuosėdas, arba įmaišant bandomąją cheminę medžiagą į šlapias nuosėdas ir vėliau išgarinant naudotą soliubilizavimo priemonę. Tinkami tirpikliai šlapioms nuosėdoms sodrinti – etanolis, metanolis, 2-metoksietanolis, etilenglikolio dimetileris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis (5)(34). Tirpiklio toksiškumas ir lakumas bei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas pasirinktame tirpiklyje turėtų būti pagrindiniai soliubilizavimo priemonės pasirinkimo kriterijai. Papildomos rekomendacijos dėl sodrinimo procedūrų pateiktos *Environment Canada* (1995)(41). Reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad į nuosėdas įterpta bandomoji cheminė medžiaga būtų visiškai ir tolygiai paskirstyta nuosėdose. Reikėtų analizuoti kartotinius sodrintų nuosėdų poėminių, kad būtų patikrinta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nuosėdose ir nustatytas bandomosios cheminės medžiagos paskirstymo vienalytiškumo laipsnis.
35. Pageidautina, kad paruoštas sodrintas nuosėdas užpylus vandeniu, būtų palikta laiko bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp nuosėdų ir vandeninės fazės. Būtų gerai, jei tai būtų daroma bandymo temperatūros ir aeravimo sąlygomis. Reikiama pusiausvirinimo trukmė priklauso nuo nuosėdų ir cheminės medžiagos savybių ir gali būti nuo kelių valandų iki kelių dienų, o retais atvejais – iki kelių savaitių (4–5 savaitių) (28)(42). Atliekant šį bandymą, pusiausvyros nelaukiama, bet rekomenduojamas pusiausvirinimo laikotarpis nuo 48 h iki 7 dienų. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, pvz., kai reikia modeliuoti aplinkos sąlygas, sodrintos nuosėdos gali būti pusiausvirinamos arba sendinamos ilgesnį laiko tarpą (11).

BANDYMO EIGA

Parengiamasis bandymas

36. Gali būti naudinga atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., pasirinkti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę (-es) ir sugerties bei šalinimo tarpsnių trukmę. Atliekant parengiamąjį bandymą, reikėtų stebėti ir užrašyti kirmėlių elgesį, pvz., kad jos vengia nuosėdų, t. y. kirmėlės išsikapsto iš nuosėdų gal būt dėl bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) dėl pačių nuosėdų. Nuosėdų vengimą taip pat galima naudoti kaip parengiamojo bandymo subletalų parametą, kad būtų galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę (-es), naudojamą (-as) atliekant biologinio kaupimosi bandymą.

Ekspozicijos sąlygos

Sugerties tarpsnio trukmė

37. Bandymo organizmai veikiami bandomąja medžiaga sugerties tarpsniu. Pirmąjį ėminį reikėtų paimti nuo 4 h iki 24 h nuo sugerties tarpsnio pradžios. Sugerties tarpsnis turėtų trukti iki 28 dienų (1)(6)(11), išskyrus atvejus, kai galima įrodyti, kad pusiausvyra pasiekama anksčiau. Pastovioji būseną yra tada, kai: (i) biologinio kaupimosi faktorių kaip laiko funkcijos grafikas kiekvienu ėminių ėmimo laikotarpiu yra lygiagretus laiko ašiai; (ii) trijų nuoseklių, ne mažiau kaip kas dvi dienas paimtų ėminių BAF analizės duomenys skiriasi ne daugiau kaip $\pm 20\%$; ir (iii) nėra reikšmingų skirtumų tarp trijų ėminių ėmimo laikotarpių (pagrįstų statistiniu palyginimu, pvz., dispersine analize ir regresine analize). Jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 dienas, sugerties tarpsnį galima baigti pradedant šalinimo tarpsnį, o BAF_k galima apskaičiuoti pagal sugerties ir šalinimo greičių konstantas (taip pat žr. 16–18 pastraipas).

Šalinimo tarpsnio trukmė

38. Pirmąjį ėminį reikėtų paimti nuo 4 h iki 24 h nuo šalinimo tarpsnio pradžios, nes pradiniu laikotarpiu gali įvykti staigūs pokyčiai audinių likučiuose. Šalinimo tarpsnį rekomenduojama baigti, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra mažesnė kaip 10 % pastoviosios būsenos koncentracijos arba ne vėliau kaip po 10 dienų. Likusių koncentracija kirmėlėse šalinimo tarpsnio pabaigoje pateikiama ataskaitoje kaip antrinė vertinamoji baigtis. Tačiau laikotarpio trukmę gali reguliuoti laikotarpis, kurį bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse yra didesnė nei analizės aptikimo riba.

Bandymo organizmai

Bandymo kirmėlių skaičius

39. Vienam ėminiui tenkantis kirmėlių skaičius turi užtikrinti tokią kirmėlių audinio masę, kad ėminiui tenkanti bandomosios cheminės medžiagos masė sugerties tarpsnio pradžioje ir šalinimo tarpsnio pabaigoje būtų gerokai didesnė nei bandomosios cheminės medžiagos aptikimo biologinėje medžiagoje riba. Išvardytų sugerties ir šalinimo tarpsnių stadijų metu koncentracija bandymo gyvūnuose paprastai yra palyginti maža (6) (8)(18). Kadangi daugelio rūšių vienos vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės masė yra labai maža (*Lumbriculus variegatus* ir *Tubifex tubifex* vienos kirmėlės šlapio kūno masė yra 5–10 mg), tam tikros kartotinių bandinių bandymo kameros visos kirmėlės gali būti sujungtos jas sveriant ir atliekant bandomosios cheminės medžiagos analizę. Jei rūšies atskiro gyvūno masė yra didesnė (pvz., *Branchiura sowerbyi*), galima naudoti kartotinius bandinius su vienu gyvūnu, bet tokiu atveju kartotinių bandinių skaičių reikėtų padidinti iki penkių vienam ėminių ėmimo taškui (11). Tačiau reikėtų pastebėti, kad *B. sowerbyi* nebuvo įtraukta į tarplaboratorinį tyrimą (12), todėl nerekomenduojama kaip šio metodo pakeidautina rūšis.
40. Reikėtų naudoti panašaus dydžio kirmėles (apie *L. variegatus* žr. 6 priedėlį). Jos turėtų būti iš vieno šaltinio suaugę arba dideli gyvūnai tos pačios amžiaus klasės (žr. 6 priedėlį). Gyvūno masė ir amžius gali daryti didelę įtaką BAF vertėms (pvz., dėl skirtingo lipidų kiekio ir (arba) kiaušinėlių buvimo); šiuos parametrus reikėtų tiksliai užrašyti. Norint išmatuoti vidutinę šlapio ir sauso kūno masę, prieš bandymą reikėtų pasverti kirmėlių imties dalį.
41. Manoma, kad *Tubifex tubifex* ir *Lumbriculus variegatus* bandymo laikotarpiu gali daugintis. Jei atliekant biologinio kaupimosi bandymą reprodukcija nevyksta, tai reikėtų užrašyti ir atsižvelgti aiškinant bandymo rezultatus.

Įkrova

42. Reikėtų naudoti didelius nuosėdų ir kirmėlių bei vandens ir kirmėlių santykius, kad sugerties tarpsniu kuo mažiau sumažėtų bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir būtų išvengta ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimo. Pasirinktas įkrovos dydis taip pat turėtų atitikti pasirinktų rūšių natūralių populiacijų tankius (43). Pavyzdžiui *Tubifex tubifex* rekomenduojamas įkrovos dydis yra 1–4 mg (šlapio) kirmėlės audinio masės vienam gramui šlapio nuosėdų (8)(11). Nuorodose (1) ir (6) rekomenduojamas *L. variegatus* įkrovos dydis – ≤ 1 g sauso kirmėlių audinio masės 50 g nuosėdų organinės anglies.
43. Bandymui atlikti naudojamos kirmėlės išimamos iš auginimo kultūros sijoiant kultūros nuosėdas. Gyvūnai (suaugusios arba didelės kirmėlės, neturinčios neseniai įvykusio dalijimosi požymių) pernešami į stiklines lėkšteles (pvz., Petri lėkšteles) su švariu vandeniu. Jei bandymo sąlygos skiriasi nuo auginimo kultūros sąlygų, turėtų pakakti 24 h aklimatizavimo tarpsnio. Prieš sveriant, nuo kirmėlių reikėtų pašalinti vandens perteklių. Tai galima atlikti atsargiai padedant kirmėles ant prieš tai suvilgytos popierinės servetėlės. Nerekomenduojama naudoti sugeriamąjį popierių kirmėlėms nusausinti, nes taip galima sukelti stresą arba kirmėlės sužaloti. Brunson ir kt. (1998) rekomenduoja naudoti nesusausintas kirmėles, kurių masė būtų maždaug 1,33 karto didesnė nei tikslinė biomasė. Šie papildomi 33 % atitinka skirtumą tarp nesusausintų ir sausintų kirmėlių (28).
44. Sugerties tarpsnio pradžioje (bandymo 0 diena) bandymo organizmai išimami iš aklimatizavimo kameros ir atsitiktinai paskirstomi į indus (pvz., Petri lėkšteles) su atkurtuoju vandeniu, į kiekvieną indą dedant po dvi kirmėles tol, kol kiekviename inde bus dešimt kirmėlių. Tada kiekviena tokia grupė atsitiktinai pernešama į atskirus bandymo indus, pvz., minkštu plieniniu pincetu. Bandymo indai inkubuojami bandymo sąlygomis.

Maitinimas

45. Atsižvelgiant į mažą dirbtinių nuosėdų mitybinių medžiagų kiekį, nuosėdas reikėtų papildyti maisto šaltiniu. Bandymo organizmams daugintis ir augti būtina maistą reikėtų įdėti į nuosėdas per vieną kartą prieš bandomosios cheminės medžiagos įterpimą arba ją įterpiant, kad bandymo organizmų ekspozicija nebūtų per mažai įvertinta, pvz., atrankiai maitinant neužterštu maistu (žr. 5 priedėlį).

Nuosėdų ir vandens santykis

46. Rekomenduojamas nuosėdų ir vandens santykis yra 1:4 (45). Laikoma, kad šis santykis tinka užtikrinti reikiamų lygių deguonies koncentraciją vandenyje virš nuosėdų ir išvengti amoniako kaupimosi. Reikėtų užtikrinti, kad deguonies kiekis vandenyje virš nuosėdų būtų $\geq 40\%$ soties. Vandenį virš nuosėdų bandymo induose reikėtų nestipriai aeruoti (pvz., 2–4 burbuliukai per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm virš nuosėdų paviršiaus, kad jos būtų trikdomos kiek įmanoma mažiau.

Šviesa ir temperatūra

47. Auginimo kultūros ir bandymo dienos šviesos trukmė – 16 h (1)(6). Bandymo zonos apšvieta turėtų būti maždaug 500–1 000 lx. Temperatūra turėtų būti $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ visą bandymą.

Bandymo koncentracijos vertės

48. Viena bandymo koncentracijos vertė (kuo mažesnė) naudojama sugerties kinetikai nustatyti, bet gali būti naudojama antroji (didesnė) koncentracija (pvz., (46)). Šiuo atveju ėminiai imami ir analizuojami esant pastoviajai būsenai arba po 28 dienų, kad būtų patvirtintas BAF, išmatuotas mažesnei koncentracijai (11). Didesnę koncentraciją reikėtų pasirinkti taip, kad būtų galima išvengti neigiamų poveikių (pvz., pasirenkant maždaug 1 % mažiausios žinomos lėtinio poveikio koncentracijos EC_{01} , gautos atliekant atitinkamus lėtinio toksiškumo tyrimus). Mažesnioji bandymo koncentracija turėtų būti gerokai didesnė nei taikomo nuosėdų ir biologinių ėminių analizės metodo aptikimo riba. Jei bandomosios cheminės medžiagos poveikio koncentracija yra arti analizės metodo aptikimo ribos, rekomenduojama naudoti didelio savitojo aktyvumo žymėtąją bandomąją cheminę medžiagą.

Apdoroti ir kontroliniai kartotiniai bandiniai

49. Reikia ne mažiau kaip trijų apdorotų kartotinių bandinių vienam ėminių ėmimo taškui (11) visam sugerties ir šalinimo tarpsniui, kad būtų galima atlikti kinetinius matavimus. Reikėtų turėti papildomus kartotinius bandinius, pvz., neprivalomoms papildomoms ėminių ėmimo datoms. Šalinimo tarpsniui ruošiamas atitinkamas skaičius kartotinių bandinių su nesodrintomis nuosėdomis ir vandeniu virš nuosėdų, kad sugerties tarpsnio pabaigoje apdorotos kirmėlės galėtų būti perneštos iš skirtųjų apdorotų indų į neapdorotus indus. Suminio apdorotų kartotinių bandinių skaičiaus turėtų pakakti sugerties ir šalinimo tarpsniams.
50. Arba kirmėlės, kurias numatyta imti šalinimo tarpsniui, gali būti veikiamos viename dideliame inde su sodrintomis nuosėdomis iš tos pačios partijos, kuri naudojama sugerties kinetikai. Reikėtų įrodyti, kad bandymo sąlygos (pvz., nuosėdų gylis, nuosėdų ir vandens santykis, įkrova, temperatūra, vandens kokybė) yra palyginamos su sugerties tarpsniui skirtų kartotinių bandinių sąlygomis. Sugerties tarpsnio pabaigoje iš šio indo turėtų būti paimti vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai analizei atlikti ir pakankamas skaičius didelių kirmėlių, kurios neturi neseniai įvykusio dalijimosi požymių, turėtų būti atsargiai paimtas ir perneštas į kartotinių bandinių indus, paruoštus šalinimo tarpsniui (pvz., dešimt organizmų vienam kartotinio bandinio indui).
51. Jei nenaudojamas joks tirpiklis, išskyrus vandenį, biologinei ir fono analizei reikėtų turėti ne mažiau kaip 9 kartotinius neigiamus kontrolinius bandinius (ne mažiau kaip 3, paimtus pradžioje, 3 – sugerties tarpsnio pabaigoje ir 3 – šalinimo tarpsnio pabaigoje). Jei bandomajai cheminei medžiagai įterpti naudojama soliubilizavimo priemonė, reikėtų turėti tirpiklio kontrolinius ėminius (ne mažiau kaip 3, paimtus pradžioje, 3 – sugerties tarpsnio pabaigoje ir 3 – šalinimo tarpsnio pabaigoje). Šiuo atveju reikėtų turėti ne mažiau kaip 4 kartotinius neigiamus kontrolinius bandinius (be tirpiklio) ėminiams imti sugerties tarpsnio pabaigoje. Šiuos kartotinius bandinius biologiskai galima palyginti su tirpiklio kontroliniais ėminiais, kad būtų gauta informacija apie galimą tirpiklio įtaką bandymo organizmams. Išsami informacija pateikta 3 priedėlyje.

Vandens kokybės matavimo dažnumas

52. Sugerties ir šalinimo tarpsniu reikėtų matuoti bent šiuos vandens virš nuosėdų kokybės parametrus:

Temperatūra	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ėminių ėmimo dieną ir viename kontrolinio ėminio inde kartą per savaitę ir sugerties bei šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; taip pat galima užrašyti aplinkos terpės temperatūrą (aplinkos oro ar vandens vonios) arba reprezentacinio bandymo indo, pvz., nepertraukiamai arba kas valandą;
Ištirpusio deguonies kiekis	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ir viename kontrolinio ėminio inde ėminių ėmimo dieną; išreiškiamas mg/l ir % ASV (oro soties vertės);
Tiekiamo oro kiekis	tikrinamas bent kartą per dieną (darbo dienomis) ir prireikus reguliuojamas;
pH	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ėminių ėmimo dieną ir viename kontrolinio ėminio inde kartą per savaitę ir sugerties bei šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje;
Suminis vandens kietumas	mažiausiai viename apdorotame inde ir viename kontrolinio ėminio inde sugerties ir šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l CaCO_3 ;
Suminis amoniako kiekis	mažiausiai viename apdorotame inde ir viename kontrolinio ėminio inde sugerties ir šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l NH_4^+ , arba NH_3 arba suminio amoniako N.

Kirmėlių, nuosėdų ir vandens ėminių ėmimas ir analizė*Ėminių ėmimo grafikas*

53. Ėminių ėmimo 28 dienų sugerties tarpsniu ir 10 dienų šalinimo tarpsniu grafikų pavyzdžiai pateikti 3 priedėlyje.
54. Vandens ir nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti imami iš bandymo kamerų prieš dedant kirmėles ir sugerties bei šalinimo tarpsniais. Bandymo metu bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nustatoma kirmėlėse, nuosėdose ir vandenyje, kad būtų galima stebėti bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymą bandymo sistemos terpėse.
55. Kirmėlių, nuosėdų ir vandens ėminiai imami mažiausiai šešis kartus sugerties, taip pat šalinimo tarpsnio metu.
56. Ėminiai imami tol, kol nustatoma pastovioji būseną (stabilizavimasis) (žr. 1 priedėlį) arba 28 dienas. Jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 dienas, pradedamas šalinimo tarpsnis. Pradedant šalinimo tarpsnį, numatytosios kirmėlės pernešamos į kartotinių bandinių kameras su neapdorotomis nuosėdomis ir vandeniu (taip pat žr. 17 ir 18 pastraipas).

Ėminių ėmimas ir paruošimas

57. Vandens ėminiai gaunami dekantuoju, siurbiant arba pipete paimant tūrį, kurio pakaktų bandomosios cheminės medžiagos kiekiui ėminyje nustatyti.
58. Likęs vanduo virš nuosėdų atsargiai dekantuojamas arba išsiurbiamas iš bandymo kameros (-ų). Nuosėdų ėminius reikėtų imti atsargiai, kuomet mažiau trikdančiomis kirmėlėmis.
59. Imant nuosėdų ėminį, iš kartotinio bandinio indo pašalinamos visos kirmėlės, pvz., nuosėdos suspenduojamos virš jų esančiame vandenyje, kiekvieno kartotinio bandinio indo turinys išpilamas į negilų padėklą ir kirmėlės surenkamos minkštu plieniniu pincetu. Kirmėlės nedelsiant plaunamos vandeniu negiliame stikliniame arba plieniniame padėkle. Vandens perteklius pašalinamas. Kirmėlės atsargiai pernešamos į prieš tai pasvertą indą ir pasveriamos. Kirmėlės numarinamos užšaldant (pvz., $\leq -18^\circ\text{C}$). Reikėtų užrašyti kokonių ir (arba) jauniklių buvimą ir skaičių.

60. Paprastai kirmėlės reikėtų pasverti ir numarinti iš karto paėmus ėminių be virškinimo trakto turinio plovimo tarpsnio, kad būtų gauta padidinta BAF vertė, į kurią būtų įtrauktas užterštas virškinimo trakto turinys, ir būtų išvengta kūno likučių nuostolių virškinimo trakto turinį plaunant tik vandeniu (8). Nemanoma, kad cheminės medžiagos, kurių $\log K_{ow}$ yra didesnis nei 5, gerokai išsiplautų virškinimo trakto turinio plovimo tik vandeniu tarpsniu, bet cheminių medžiagų, kurių $\log K_{ow}$ yra mažesnis kaip 4, nuostoliai gali būti gerokai didesni (47).
61. Šalinimo tarpsniu kirmėlės išleidžia savo virškinimo trakto turinį į švarias nuosėdas. Tai reiškia, kad matuojant prieš pat šalinimo tarpsnį, įtraukiamos užterštos virškinimo trakto nuosėdos, o praėjus 4–24 h nuo šalinimo tarpsnio pradžios, didesnioji užteršto virškinimo trakto turinio dalis, kaip manoma, būtų pakeista švariomis nuosėdomis (11)(47). Tokiu atveju galima laikyti, kad koncentracija šio ėminio kirmėlėse yra koncentracija audiniuose po virškinimo trakto turinio išleidimo. Siekiant atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimą šalinimo tarpsniu dėl praskiedimo neužterštomis nuosėdomis, virškinimo trakto turinio masę galima įvertinti pagal šlapių kirmėlių masės ir kirmėlių pelenų masės santykį arba sausų kirmėlių masės ir kirmėlių pelenų masės santykį.
62. Jei specifinio tyrimo tikslas yra išmatuoti biologinį įsisavinamumą ir tikruosius bandymo organizmų audiniuose esančius likučius, reikėtų paimti bent vieną apdorotų gyvūnų poėminį (pvz., iš trijų papildomų kartotinių bandinių indų), kurį geriau imti esant pastoviai būsenai, jį plauti švariame vandenyje 6 h (47) ir prieš analizę dar kartą pasverti. Tuomet šio poėminio kirmėlių masės ir koncentracijos kūne duomenis galima palyginti su vertėmis, gautomis neplautoms kirmėlėms. Pašalinimui matuoti skirtų kirmėlių nereikėtų plauti prieš jas pernešant į švarias nuosėdas, kad gyvūnams sukeliama papildoma stresas būtų kuo mažesnis.
63. Vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminius pageidautina analizuoti iš karto po paėmimo (t. y. per 1–2 dienas), kad būtų išvengta skaidymo ar kitų nuostolių ir būtų galima apskaičiuoti apytikrius sugerties bei šalinimo greičius bandymo eigoje. Be to, atliekant analizę iškart, nepavėluojama nustatyti, kad pasiekta pastovioji būsena.
64. Jei analizuoti iš karto neįmanoma, ėminius reikėtų laikyti reikiamomis sąlygomis. Prieš tyrimo pradžią reikia gauti informaciją apie konkrečios bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir tinkamas laikymo sąlygas (pvz., laikymo trukmę ir temperatūrą, ekstrahavimo procedūras ir kt.). Jei tokios informacijos nėra ir manoma, kad ji yra būtina, lygiagrečiai galima bandyti kontrolinius sodrintų audinių ėminius stabilumui laikymo sąlygomis nustatyti.

Analizės metodo kokybė

65. Kadangi visa procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai cheminei medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrio, bandymo keliu tikrinama, ar tam tikram metodui pakanka cheminės analizės preciziškumo ir atkuriamumo, taip pat bandomosios cheminės medžiagos atgavimo iš vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminių. Taip pat patikrinama, ar kontrolinių ėminių kameroje bandomoji cheminė medžiaga neaptinkama didesnės nei foninė koncentracijos. Prireikus daromos C_w , C_s ir C_a verčių pataisos dėl atgavimo laipsnio ir kontrolinių ėminių foninių verčių. Visą bandymą ėminiai apdorojami taip, kad būtų kuo mažesnis užteršimas ir nuostoliai (pvz., dėl bandomosios cheminės medžiagos adsorbcijos ant ėminių ėmimo įtaiso).
66. Reikėtų užrašyti ir ataskaitoje pateikti bandomosios cheminės medžiagos suminį atgavimo laipsnį ir jos atgavimo iš kirmėlių, nuosėdų, vandens ir iš gaudyklių su absorbentais, jei naudojamos išgaravusiai bandomajai cheminei medžiagai sulaikyti, laipsnį.
67. Kadangi rekomenduojama naudoti žymėtąsias chemines medžiagas, galima atlikti jų suminio aktyvumo (t. y. pradinės medžiagos ir skaidymo produktų) analizę. Tačiau, jei analizė įmanoma, naudingos informacijos gali suteikti pradinės medžiagos ir jos skaidymo produktų kiekybinis nustatymas esant pastoviai būsenai arba sugerties tarpsnio pabaigoje. Jei numatoma atlikti tokius matavimus, ėminiams turėtų būti taikomos tinkamos ekstrahavimo procedūros, kad būtų galima atskirai nustatyti pradinės medžiagos kiekį. Jei aptiktų skaidymo produktų aktyvumo, išmatuoto esant pastoviai būsenai arba sugerties tarpsnio pabaigoje, procentinė dalis yra didelė (pvz., > 10 %), tokius skaidymo produktus rekomenduojama identifikuoti (5).

68. Dėl mažos atskiro gyvūno biomasės dažnai neįmanoma nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kiekviename atskiroje kirmėlėje, išskyrus atvejus, kai kaip bandomųjų gyvūnų rūšis naudojama *Branchiura sowerbyi* (vienos kirmėlės šlapio kūno masė yra 40–50 mg) (11). Todėl priimtinas atskirų gyvūnų, paimtų iš tam tikro bandymo indo, sujungimas į vieną grupę, bet jis neriboja statistinių procedūrų, kurias galima taikyti duomenims. Jei tam tikra statistinė procedūra ir galia yra svarbūs veiksniai, į bandymą reikėtų įtraukti reikiamą bandymo gyvūnų ir (arba) kartotinių bandinių kamerų skaičių, kad būtų įmanoma suderinti su norimu jungimu į grupes, procedūra ir galia.
69. BAF rekomenduojama išreikšti kaip suminės šlapio kūno masės, suminės sauso kūno masės funkciją ir, jei reikia (pvz., ypač lipofilinių cheminių medžiagų), kaip lipidų kiekio ir nuosėdų TOC funkciją. Reikėtų taikyti tinkamus lipidų kiekio nustatymo metodus (48)(49). Kaip standartinį metodą (48) galima rekomenduoti ekstrahavimo chloroformu ir (arba) metanolio būdą (50). Tačiau siekiant išvengti chlorintųjų tirpiklių, būtų galima taikyti tarplaboratoriniame tyrime patikrintą Bligh & Dyer metodo (50) modifikaciją, aprašytą (51). Kadangi skirtingais metodais gaunamos nevienodos vertės (48), būtina išsamiai aprašyti taikytą metodą. Jei įmanoma, t. y., jei yra pakankamai kirmėlių audinio, lipidų kiekis nustatomas tame pačiame ėminyje arba ekstrakto, kuris buvo gautas bandomosios cheminės medžiagos analizei, nes lipidus dažnai tenka pašalinti iš ekstrakto prieš jo analizę chromatografiniu metodu (5). Tačiau patogiu naudoti aklimatizuotus kontrolinius gyvūnus lipidų kiekiui nustatyti bent sugerties tarpsnio pradžioje arba, pageidautina, jo pabaigoje, pvz., trijuose ėminiuose.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

70. Bandomosios cheminės medžiagos sugerties kreivė gaunama bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, sugerties tarpsniu nustatytą kirmėlėse ir ant jų, brėžiant aritmetinėje skalėje kaip laiko funkciją. Jei kreivė pasiekia pastoviąją būseną, apskaičiuojamas pastoviosios būsenos BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ pastaviosios būsenos arba 28 dieną (virdurkis)}}{C_a \text{ pastaviosios būsenos arba 28 dieną (virdurkis)}}$$

71. Nustatomas kinetinis biologinio kaupimosi faktorius (BAFK) kaip k_s/k_e santykis. Pašalinimo konstanta (k_e) paprastai nustatoma pagal šalinimo kreivę (t. y. bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kirmėlėse šalinimo tarpsniu grafiką). Tada pagal sugerties kreivės kinetiką apskaičiuojama sugerties greičio konstanta k_s . Pageidautinas BAFK bei greičio konstantų k_s ir k_e nustatymo metodas yra kompiuteriniai netiesiniai parametrų įvertinimo metodai (žr. 2 priedėlį). Jei šalinimas yra akivaizdžiai ne pirmosios eilės, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (25)(27)(52).
72. Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius (BSAF) nustatomas BAFK normalizuojant pagal kirmėlių lipidų kiekį ir nuosėdų suminį organinės anglies kiekį.

Rezultatų aiškinimas

73. Rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, jei išmatuos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės yra arti taikomo analizės metodo aptikimo ribos.
74. Aiškiai apibrėžtos sugerties ir šalinimo kreivės yra biologinio kaupimosi duomenų geros kokybės rodiklis. Paprastai tinkamai suplanuotų tyrimų BAF verčių pasiklivimo ribos turėtų būti ne didesnės kaip 25 % (5).

Bandymo ataskaita

75. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

- fizikinė būseną ir fizikinės cheminės savybės, pvz., log K_{ow} tirpumas vandenyje;
- cheminio identifikavimo duomenys; bandomosios cheminės medžiagos šaltinis, naudojamo tirpiklio identifikavimo duomenys ir koncentracija;
- jei naudojama žymėtoji cheminė medžiaga, nurodoma tiksli žymėtojų atomų padėtis, savitasis aktyvumas ir su priemaisiomis susijęs aktyvumas.

Bandomųjų gyvūnų rūšis

- mokslinis pavadinimas, veislė, šaltinis, galimas pradinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, dydžio intervalas ir kt.

Bandymo sąlygos

- taikytos bandymo procedūros (pvz., statinės, pusiau statinės arba pratekamosios);
- naudojamo apšvietimo tipas bei charakteristikos ir dienos šviesos trukmė (-ės);
- bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius, medžiaga ir matmenys, vandens tūris, nuosėdų masė ir tūris, vandens tūrio pasikeitimo sparta (pratekamųjų arba pusiau statinių procedūrų, naudotas aeravimas prieš bandymą ir jo metu, kartotinių bandinių skaičius, vieno kartotinio bandinio kirmėlių skaičius, bandymo koncentracijos verčių skaičius, sugerties ir šalinimo tarpsnių trukmė, ėminių ėmimo dažnumas);
- bandomosios cheminės medžiagos paruošimo ir įterpimo metodas, taip pat konkretaus metodo pasirinkimo priežastys;
- nominaliosios bandymo koncentracijos vertės;
- dirbtinio vandens ir nuosėdų sudedamųjų dalių šaltinis arba, jei naudojama natūrali terpė, vandens ir nuosėdų kilmė, pradinio apdorojimo aprašymas, bandymo gyvūnų išgyventi ir (arba) dauginis naudojamoje terpėje gebos įrodymo rezultatai, nuosėdų charakteristikos (porų vandens pH ir amoniako koncentracija (natūralios nuosėdos), organinės anglies kiekis (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis), vandens procentinė dalis ir kiti atlikti matavimai) ir vandens charakteristikos (pH, kietumas, laidis, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro koncentracija (jei matuojama) ir visi kiti atlikti matavimai);
- dirbtinių nuosėdų nominalioji masė ir sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis); natūralių nuosėdų sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis);
- bandymo kamerų vandens kokybė, kurią apibūdina temperatūra, pH, amoniako koncentracija, suminis kietumas ir ištirpusio deguonies koncentracija;
- išsami informacija apie vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminių apdorojimą, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos ruošimo, laikymo, sodrinimo, ekstrahavimo procedūrų duomenis, ir bandomosios cheminės medžiagos bei lipidų kiekio analizės procedūras (ir preciziškumą) ir atgavimo laipsnius.

Rezultatai

- kontrolinių kirmėlių ir kirmėlių kiekvienoje bandymo kameroje gaištamumas ir visi kiti pastebėti subletalūs veiksniai, įskaitant nenormalų elgesį (pvz., nuosėdų vengimas, išmatų granulių buvimas ar nebuvimas, reprodukcijos nebuvimas);
- nuosėdų ir bandymo organizmų (naudingų normalizavimui) sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis);
- kirmėlių lipidų kiekis;
- kreivės, kurios rodo bandomosios cheminės medžiagos kirmelėse sugerties ir šalinimo kinetiką, ir pastoviosios būsenos pasiekimo trukmė;
- visų ėminių ėmimo dienų C_a , C_s ir C_w (nurodant standartinį nuokrypį ir intervalą, jei tinka) (C_a , išreikštą $g\ kg^{-1}$ viso sauso ir šlapio kūno masės, C_s , išreikštą $g\ kg^{-1}$ sausų ir šlapų nuosėdų masės, ir C_w , išreikštą $mg\ l^{-1}$). Jei reikia žinoti biotos-nuosėdų kaupimosi faktorių (BSAF; apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) (pvz., kad būtų galima palyginti dviejų arba kelių bandymų su skirtingą lipidų kiekį turinčiais gyvūnais rezultatus), C_a reikėtų papildomai išreikšti $g\ kg^{-1}$ organizmo lipidų kiekio, o C_s reikėtų išreikšti $g\ kg^{-1}$ nuosėdų organinės anglies (OC);

- papildomai ataskaitoje galima pateikti BAF (išreikštą kg šlapių nuosėdų kg^{-1} šlapių kirmėlių), nuosėdų sugerties greičio konstantą k_s (išreikštą g šlapių nuosėdų kg^{-1} šlapių kirmėlių d^{-1}) ir šalinimo greičio konstantą k_e (išreikštą d^{-1}); BSAF (išreikštą kg nuosėdų OC kg^{-1} kirmėlių lipidų kiekio);
- nepašalintieji likučiai (NER) šalinimo tarpsnio pabaigoje;
- jei matuojama: bandymo gyvūnuose aptiktos pradinės cheminės medžiagos, skaidymo produktų ir surištų likučių procentinė dalis (t. y. bandomosios cheminės medžiagos, kurios negalima pašalinti įprastiniais ekstrahavimo metodais, procentinė dalis);
- duomenų statistinei analizei taikyti metodai.

Rezultatų įvertinimas

- rezultatų atitikties tinkamumo kriterijams, išvardytiems 21 pastraipoje;
 - netikėti ar neįprasti rezultatai, pvz., nevisiškas bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas iš bandymo gyvūnų; tokiais atvejais naudingos informacijos gali suteikti kokio nors parengiamojo tyrimo rezultatai.
-

1 priedėlis

Apibrėžtys ir vienetai

Dirbtinės nuosėdos, arba sukurtosios, atkurtosios ar sintetinės nuosėdos – tai mišinys medžiagų, naudojamų natūralių nuosėdų fiziniams komponentams modeliuoti.

Biologinis kaupimasis yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje. Biologinis kaupimasis vyksta dėl biologinio koncentravimo ir biologinio amplifikavimo procesų (žr. toliau).

Biologinio kaupimosi faktorius (BAF) bet kuriuo sugerties tarpsnio momentu, atliekant šį biologinio kaupimosi bandymą, yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandymo organizme arba ant jo (C_a , išreikšta $g\ kg^{-1}$ sauso arba šlapio kūno masės), padalyta iš cheminės medžiagos koncentracijos supančioje terpėje (C_s , išreikšta $g\ kg^{-1}$ sausų arba šlapų nuosėdų masės). Susiejant su C_a ir C_s vienetais, BAF vienetai yra $kg\ nuosėdų\ kg^{-1}\ kirmėlių$ (15).

Biologinio kaupimosi faktoriai, apskaičiuoti tiesiogiai, kaip kinetinės nuosėdų sugerties greičio konstantos ir šalinimo greičio konstantos (k_s ir k_e , žr. toliau) santykis, vadinami kinetiniais biologinio kaupimosi faktoriais (BAF_k).

Biologinis koncentravimas yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje vien tik dėl jos sugerties per kūno paviršių palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje.

Biologinis amplifikavimas yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija maiste arba grobyje iš esmės tik dėl jos sugerties iš užteršto maisto arba grobio. Dėl biologinio amplifikavimo bandomoji cheminė medžiaga gali būti pernešama arba gali kauptis mitybos tinkluose.

Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius (BSAF) – tai pagal lipidus normalizuota bandomosios cheminės medžiagos pastovioji koncentracija bandymo organizme arba ant jo, padalyta iš pagal organinę anglį normalizuotos cheminės medžiagos pastoviosios koncentracijos nuosėdose. Tada C_a išreiškiamas $g\ kg^{-1}$ organizmo lipidų kiekio, o C_s – $g\ kg^{-1}$ nuosėdų organinės anglies kiekio.

Kondicionavimo laikotarpis skirtas tam, kad būtų stabilizuotas nuosėdų mikroorganizmų komponentas ir pašalintas, pvz., iš nuosėdų komponentų susidaręs amoniakas; jis vykdomas prieš nuosėdų sodrinimą bandomąja chemine medžiaga. Po kondicionavimo vanduo virš nuosėdų paprastai išpilamas lauk.

Bandomosios cheminės medžiagos **šalinimas** – jos netektis bandymo organizme dėl aktyvių arba pasyvių procesų, kurie vyksta neatsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos buvimą ar nebuvimą supančioje terpėje.

Šalinimo tarpsnis – laikotarpis po bandymo organizmų pernešimo iš užterštos terpės į bandomosios cheminės medžiagos neturinčią terpę, per kurį tiriamas cheminės medžiagos šalinimas iš bandymo organizmų (ar netektis).

Šalinimo greičio konstanta (k_e) – skaitinė vertė, kuri apibrėžia bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimo bandymo organizme ir (arba) ant jo greitį po bandymo organizmų pernešimo iš terpės su bandomąja chemine medžiaga į jos neturinčią terpę; k_e išreiškiama d^{-1} .

Pusiausvirinimo laikotarpis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp kietosios fazės, porų vandens ir vandens virš nuosėdų; jis tęsiasi nuo nuosėdų sodrinimo bandomąja chemine medžiaga iki bandymo organizmų įdėjimo.

Oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{ow}) – cheminės medžiagos tirpumo n-oktanolioje ir vandenyje pusiausvyros santykis, kartais išreiškiamas kaip P_{ow} . K_{ow} logaritmas ($\log K_{ow}$) naudojamas kaip cheminės medžiagos biologinio kaupimosi vandens organizmuose potencialo rodiklis.

Organinės anglies ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) – cheminės medžiagos koncentracijos nuosėdų organinės anglies frakcijoje ir (arba) ant jos ir cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje pusiausvyros santykis.

Vanduo virš nuosėdų – vanduo, užpildytas ant nuosėdų bandymo inde.

Pastovioji būseną (stabilizavimasis) – pusiausvyra tarp sugerties ir šalinimo procesų, vykstančių vienu metu ekspozicijos tarpsnio metu. BAF, gauto kiekvienai ėminių ėmimo dienai, kaip laiko funkcijos grafike pastovioji būseną pasiekama, kai kreivė tampa lygiagrečiai laiko ašiai, trijų nuoseklių, ne mažiau kaip kas dvi dienas paimtų ėminių BAF analizės duomenys skiriasi ne daugiau kaip $\pm 20 \%$ ir nėra reikšmingų statistinių skirtumų tarp trijų ėminių ėmimo laikotarpių. Jei bandomosios cheminės medžiagos sugeriamos lėtai, tinkamesnis intervalas būtų septynios dienos (5).

Porų vanduo arba intersticinis vanduo yra vanduo, užimantis erdvę tarp nuosėdų arba dirvožemio dalelių.

Nuosėdų sugerties greičio konstanta (k_s) – skaitinė vertė, kuri apibrėžia bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos didėjimo bandymo organizme ir (arba) ant jo greitį dėl sugerties iš nuosėdų fazės. k_s išreiškiamas g nuosėdų kg^{-1} kirmėlių d^{-1} .

Sodrintos nuosėdos – nuosėdos, į kurias įdėta bandomoji cheminė medžiaga.

Pastoviosios būsenos biologinio kaupimosi faktorius (BAF_{ss}) yra BAF, gautas pastoviai būsenai, kuris reikšmingai nekinta ilgą laiko tarpą, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje (C_s , išreikšta g kg^{-1} šlapių arba sausų nuosėdų) šiuo laikotarpiu yra pastovi.

Sugerties arba ekspozicijos tarpsnis – laikotarpis, kai bandymo organizmai veikiami bandomąja chemine medžiaga.

2 priedėlis

Sugerties ir šalinimo parametrų skaičiavimas

Pagrindinė biologinio kaupimosi bandymo vertinamoji baigtis yra biologinio kaupimosi faktorius BAF. BAF galima apskaičiuoti dalijant bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo organizme C_a iš bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nuosėdose C_s , esant pastoviai būsenai. Jei sugerties tarpsniu pastovioji būsena nepasiekama, tokiu pat būdu skaičiuojamas 28 dienos BAF. Tačiau reikėtų pažymėti, ar BAF pagrįstas ar ne pastoviosios būsenos koncentracijos vertėmis.

Tinkamiausias kinetinio biologinio kaupimosi faktoriaus (BAF_k), nuosėdų sugerties greičio konstantos (k_s) ir šalinimo greičio konstantos (k_e) gavimo būdas yra kompiuteriniai netiesiniai parametrų įvertinimo metodai. Jei yra sugerties tarpsnio vidutinių kaupimosi faktorių laikinė seka ($AF =$ kiekvienos ėminių ėmimo datos C_a vidutinės vertės / kiekvienos ėminių ėmimo datos C_s vidutinės vertės), pagrįsta šlapių kirmėlių ir nuosėdų mase, modelio lygtis yra:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [1 \text{ lygtis}]$$

čia $AF(t)$ – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kirmėlėse ir jos koncentracijos nuosėdose santykis tam tikrame sugerties tarpsnio laiko taške (t), šios kompiuterinės programos apskaičiuoja BAF_k , k_s ir k_e vertes.

Kai pastovioji būsena pasiekama sugerties tarpsniu (t , y. $t = \infty$), 1 lygtį galima supaprastinti į:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e} \quad [2 \text{ lygtis}]$$

čia

k_s = sugerties audiniu greičio konstanta [g nuosėdų kg^{-1} kirmėlių d^{-1}]

k_e = šalinimo greičio konstanta [d^{-1}]

Tada $k_s/k_e \times C_s$ yra apytikrė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlių audinyje esant pastoviai būsenai ($C_{a,ss}$).

Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorių (BSAF) reikėtų skaičiuoti taip:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

čia f_{oc} – nuosėdų organinės anglies dalis, pagrįsta sausų nuosėdų mase, o f_{lip} – kirmėlių lipidų dalis, abi vertės pagrįstos sausos arba šlapios medžiagos mase.

Jei yra koncentracijos verčių laikinė seka, šalinimo kinetiką galima modeliuoti naudojant tokias modelio lygtis ir kompiuterinį skaičiavimą, pagrįstą netiesinio parametrų įvertinimo metodu.

Numatytuoju pradžios tašku rekomenduojama naudoti išmatuotą kūno likučio vidutinę vertę sugerties tarpsnio pabaigoje. Sugerties tarpsniui sumodeliuotą ar įvertintą vertę reikėtų naudoti tik tada, kai, pvz., apskaičiuota vertė reikšmingai skiriasi nuo sumodeliuoto kūno likučio. Taip pat žr. 50 pastraipą apie šalinimo tarpsniui skirtų kirmėlių alternatyvią pradinę ekspoziciją; manoma, kad taikant šį būdą kirmėlių po pradinės ekspozicijos ėminiai 0 šalinimo tarpsnio dieną yra tikrasis kūno likutis, kad būtų galima pradėti šalinimo kinetikos tyrimą.

Jei duomenų taškai nubrėžti laiko atžvilgiu rodo pastovų eksponentinį bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos gyvūnuose mažėjimą, šalinimo laikinei eigai aprašyti galima naudoti vieno skyriaus modelį (3 lygtis):

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [3 \text{ lygtis}]$$

Kartais šalinimo procesai vyksta dviem tarpsniais, kai iš pradžių C_a mažėja staigiai, vėliau bandomųjų cheminių medžiagų netektis šalinimo tarpsniu lėtėja (8)(19)(25)). Dviejų tarpsnių buvimą galima paaiškinti darant prielaidą, kad organizmą sudaro du skyriai, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga šalinama skirtingu greičiu. Tokiais atvejais reikėtų nagrinėti specialiąją literatūrą (15)(16)(17)(25).

Dviejų skyrių šalinimas aprašomas, pvz., šia lygtimi (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [4 \text{ lygtis}]$$

A ir B atitinka skyrių dydį (suminio audinio likučio procentais) ir A yra greitos cheminės medžiagos netekties skyrius, o B – lėtos bandomosios cheminės medžiagos netekties skyrius. A ir B suma yra lygi 100 % viso gyvūno skyriaus tūrio esant pastoviai būsenai. k_a ir k_b yra atitinkamos šalinimo greičio konstantos [d^{-1}]. Jei dviejų skyrių modelis atitinka šalinimo duomenis, sugerties greičio konstantą k_s galima nustatyti taip (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [5 \text{ lygtis}]$$

Vis dėlto šias modelių lygtis reikėtų taikyti atsargiai, ypač, kai atliekant bandymą vyksta bandomosios cheminės medžiagos biologinio įsisavinamumo pokyčiai (42).

Kitaip nei pagal pirmiau aprašytas modelių lygtis, kinetika (k_s ir k_e) taip pat gali būti skaičiuojama vienu veiksmu, taikant pirmojo laipsnio kinetikos modelį kartu visiems sugerties ir šalinimo tarpsnių duomenims. Metodas, kuriuo būtų galima atlikti jungtinį sugerties ir šalinimo tarpsnių greičio konstantų skaičiavimą, aprašytas (55), (56) ir (57) nuorodose.

Nepašalintuosius likučius (NER) reikėtų skaičiuoti kaip antrinę vertinamąją baigtį, vidutinės koncentracijos kirmėlėse (C_a) šalinimo tarpsnio 10 dieną ir pastoviosios būsenos (sugerties tarpsnio 28 dieną) vidutinės koncentracijos kirmėlėse (C_a) santykį dauginant iš 100:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ šalinimo pabaigoje (vidurkis) } \times 100}{C_a \text{ pastoviosios būsenos (vidurkis)}}$$

3 priedėlis

28 dienų biologinio kaupimosi bandymo ėminių ėmimo grafiko pavyzdys

a) Sugerties tarpsnis (įskaitant 4 dienų pusiausvirinimo tarpsnį)

Diena	Veiksmai
– 6	Ruošiama durpių suspensija nuosėdoms; suspensija kondicionuojama 48 h;
– 4	Nuosėdos arba jų frakcija sodrinama; sumaišomos visos nuosėdų sudedamosios dalys; imami apdorotų ir tirpiklio kontroliniai nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; virš nuosėdų įpilama vandens; inkubuojama bandymo sąlygomis (pusiausvirinimo tarpsnis);
–3/–2	Bandymo organizmai atskiriami nuo kultūros ir aklimatizuojami;
0	Matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); išimami kartotinių bandinių indai, iš kurių paimami vandens ir nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; kirmėlės atsitiktinai paskirstomos į bandymo kameras; paliekama pakankamai kirmėlių poėminių analizės foninėms vertėms nustatyti; tikrinamas oro tiekimas, jei naudojama uždaroji bandymo sistema;
1	Išimami kartotinių bandinių indai ėminiams paimti; tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys, vandens kokybė (žr. 56 pastraipą); imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;
2	Tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys ir temperatūra;
3	Kaip 1 dieną;
4–6	Kaip 2 dieną;
7	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
8–13	Kaip 2 dieną;
14	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
15–20	Kaip 2 dieną;
21	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
22–27	Kaip 2 dieną;
28	Kaip 1 dieną; matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); sugerties tarpsnio pabaiga; paliekama pakankamai kirmėlių poėminių analizės foninėms vertėms, šlapio ir sauso kūno masei bei lipidų kiekiui nustatyti; šalinimo tarpsniui skirtos kirmėlės pernešamos (be virškinimo trakto turinio plovimo) iš po ekspozicijos likusių kartotinių bandinių indų į indus su švariomis nuosėdomis; iš tirpiklio kontrolinių indų imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai; imami gaudyklių, jei įrengtos, tirpalų ėminiai.
	Veiksmų prieš ekspoziciją (pusiausvirinimo tarpsnio) grafiką reikėtų sudaryti atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes. Prireikus paruoštos nuosėdos 7 dienas kondicionuojamos kartu su vandeniu virš nuosėdų 20 °C ± 2 °C temperatūroje; šiuo atveju nuosėdos ruošiamos anksčiau!
	Aprašytus 2 dienos veiksmus reikėtų atlikti kasdien (bent darbo dienomis).

b) Šalinimo tarpsnis

Diena	Veiksmai
– 6	Ruošiama durpių suspensija nuosėdoms; suspensija kondicionuojama 48 h;
– 4	Sumaišomos visos nuosėdų sudedamosios dalys; imami apdorotų ir tirpiklio kontroliniai nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; virš nuosėdų įpilama vandens; inkubuojama bandymo sąlygomis;
0 (28 sugerties tarpsnio diena)	Matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); kirmėlės iš po ekspozicijos likusių kartotinių bandinių indų pernešamos į indus su švariomis nuosėdomis; po 4–6 h kartotinių bandinių indai išimami ir paimami vandens, nuosėdų bei kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; kirmėlės atsitiktinai paskirstomos į bandymo kameras;
1	Išimami kartotinių bandinių indai ėminiams paimti; tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys, vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;
2	Tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys ir temperatūra;
3	Kaip 1 dieną;
4	Kaip 2 dieną;
5	Kaip 1 dieną;
6	Kaip 2 dieną;
7	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
8–9	Kaip 2 dieną;
10	Kaip 1 dieną; šalinimo tarpsnio pabaiga; matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); iš tirpiklio kontrolinių indų imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai; imami gaudyklių, jei įrengtos, tirpalų ėminiai.
	Nuosėdos prieš šalinimo tarpsnio pradžią turėtų būti ruošiamos taip pat, kaip prieš sugerties tarpsnį.
	Aprašytus 2 dienos veiksmus reikėtų atlikti kasdien (bent darbo dienomis).

4 priedėlis

Kai kurios tinkamo skiedimo vandens fizikinės ir cheminės charakteristikos

SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 µg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

REKOMENDUOTO ATKURTOJO VANDENS SUDĖTIS

(a) Kalcio chlorido tirpalas

11,76 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(b) Magnio sulfato tirpalas

4,93 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(c) Natrio hidrokarbonato tirpalas

2,59 g NaHCO_3 ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(d) Kalio chlorido tirpalas

0,23 g KCl ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Distiliuoto ar dejonizuoto vandens savitasis laidis neturėtų būti didesnis kaip $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Sumaišoma po 25 ml kiekvieno nuo (a) iki (d) tirpalo ir skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu. Kalcio ir magnio jonų koncentracijos šiuose tirpaluose suma yra 2,5 mmol/l.

Ca:Mg jonų santykis yra 4:1, o Na:K jonų – 10:1. Šio tirpalo rūgšties neutralizavimo talpa $K_{s4,3}$ yra 0,8 mmol/l.

Skiedimo vanduo aeruojamas tol, kol pasiekama deguonies soties koncentracija, paskui prieš naudojant vanduo maždaug dvi dienas laikomas ir naudojamas be papildomo aeravimo.

Tinkamo skiedimo vandens pH turėtų būti nuo 6 iki 9.

5 priedėlis

Dirbtinės nuosėdos. ruošimo ir laikymo rekomendacijos

Kitaip nei reikalaujama bandymo metode C.8 (40), rekomenduojamas dirbtinių nuosėdų durpių kiekis vietoj 10 % sausos masės turi būti 2 %, siekiant atitikti nuo mažo iki vidutinio natūralių nuosėdų organinės medžiagos kiekį (58).

Dirbtinių nuosėdų sausų sudedamųjų dalių procentinė dalis:

Sudedamoji dalis	Charakteristika	Sausų nuosėdų %
Durpės	Kiminių durpės, suskaidymo laipsnis: „vidutinis“, išdžiovintos ore, jokių matomų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: ≤ 2 mm, bet > 50 % dalelių turėtų būti $50\text{--}200\ \mu\text{m}$	76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	22 ± 1
Maisto šaltinis	<i>Folia urticae</i> , <i>Urtica</i> sp. (didžiosios dilgėlės) lapų milteliai, smulkiai sumalti (dalelių dydis $\leq 0,5$ mm), arba <i>Urtica</i> sp. lapų miltelių ir alfa celiuliozės mišinys (1:1); pagal farmacijos standartus, skirti žmonių vartojimui; papildoma sausos nuosėdos	0,4–0,5 %
Kalcio karbonatas	CaCO_3 , milteliai, chemiškai grynas, papildoma sausos nuosėdos	0,05–1
Dejonizuotas vanduo	Savitasis laidis $\leq 10\ \mu\text{S/cm}$, papildoma sausos nuosėdos	30–50

Jei manoma, kad gali būti didesnė amoniako koncentracija, pvz., jei žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra nitrifikavimo inhibitorius, galbūt būtų naudinga 50 % daug azoto turinčių dilgėlių miltelių pakeisti celiulioze (pvz., α -celiuliozės milteliais, chemiškai gryni, dalelių dydis $\leq 0,5$ mm).

Paruošimas

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai (grūdelių dydis $\leq 0,5$ mm, jokių matomų augalų liekanų). Iš reikiamo durpių miltelių kiekio ruošama suspensija, ant sausų nuosėdų užpilant reikiamą dejonizuoto vandens tūrį (nustatyta, kad, norint gauti maišomą durpių suspensiją, vandens tūris turi būti $11,5 \times$ sausų durpių masės (8)) ir maišant didelio našumo homogenizavimo įtaisu.

Šios suspensijos pH vertė, lygi $5,5 \pm 0,5$, nustatoma CaCO_3 . Švelniai maišoma suspensija kondicionuojama ne trumpiau kaip dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje, kad nusistovėtų pH ir būtų sukurta stabili mikroorganizmų populiacija. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas CaCO_3 iki $6,0 \pm 0,5$. Durpių suspensija maišoma su kitomis sausomis sudedamosiomis dalimis, atsižvelgiant į sodrinimui pasirinktą jų dalį. Įpilamas trūkstamas dejonizuoto vandens tūris, kad būtų gautos homogenizuotos nuosėdos. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas CaCO_3 nuo 6,5 iki 7,5. Tačiau, jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, galbūt būtų naudinga nuosėdų pH vertę nustatyti mažesnę kaip 7,0 (pvz., nuo 6,0 iki 6,5). Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, prieš sodrinant dirbtines nuosėdas bandomąja chemine medžiaga, jas galima kondicionuoti septynias dienas tomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnio aukštis kaip bandymo induose), t. y. ant jų būtų užpilamas vanduo, kuris būtų aeruojamas. Pasibaigus šiam kondicionavimo laikotarpiui, vanduo virš nuosėdų turėtų būti pašalintas ir išpiltas. Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti (pvz., 3 ėminiai).

Toliau sodrintas kvarcinis smėlis maišomas su nuosėdomis, kad būtų gauta kiekviena apdorojimo koncentracija, nuosėdos paskirstomos į kartotinių bandinių indus ir ant jų užpilama bandymo vandens (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnio aukštis kaip bandymo induose). Paskui indai inkubuojami tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą. Taip pradedamas pusiausvirinimo laikotarpis. Vandenį virš nuosėdų reikėtų aeruoti.

Pasirinktas maisto šaltinis turėtų būti įdėtas prieš nuosėdų sodrinimą bandomąja chemine medžiaga arba jo metu. Jį galima sumaišyti pradžioje su durpių suspensija (žr. pirmiau). Tačiau per didelio maisto šaltinio skaidymo prieš bandymo organizmų įdėjimą, pvz., ilgo pusiausvirinimo laikotarpio atveju, galima išvengti, kuo labiau trumpinant laikotarpį tarp maisto įdėjimo ir ekspozicijos pradžios. Siekiant užtikrinti, kad būtų pakankamas maisto sąlytis su bandomąja chemine medžiaga, maisto šaltinį reikėtų sumaišyti su nuosėdomis ne vėliau nei nuosėdų sodrinimo bandomąja chemine medžiaga dieną. Išimties gali būti daromos, jei dėl pusiausvirinimo laikotarpio trukmės vyksta per didelis maisto mikrobiologinis skaidymas prieš įdedant bandymo organizmus. Imami nuosėdų ėminiai, kad būtų nustatyta sausa nuosėdų masė ir suminė organinė anglis (pvz., 3 sodrintų arba kontrolinių nuosėdų ėminiai).

Sausų komponentų (durpių, smėlio, kaolino) masė turėtų būti pateikta ataskaitoje g ir visos sausos medžiagos masės procentais.

Vandens, įpilamo į sausus komponentus ruošiant nuosėdas, tūrį taip pat reikėtų pateikti ataskaitoje visos sausos medžiagos masės procentais (pvz., 100 % sausos medžiagos masės + 46 % vandens reiškia, kad į 1 000 g sausos medžiagos įpilama iš viso 460 ml vandens ir gaunama 1 460 g šlapių nuosėdų).

Laikymas

Sausus dirbtinių nuosėdų komponentus galima laikyti sausoje, vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštas šlapias nuosėdas (toliau naudoti tik kultūrai) galima laikyti nuo 2 iki 4 savaičių nuo paruošimo dienos $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir tamsoje (8).

Bandomąja chemine medžiaga sodrintas nuosėdas reikia panaudoti iš karto, išskyrus atvejus, kai turima informacija rodo, kad tam tikras nuosėdas galima laikyti, nedarant įtakos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumui ir biologiniam išsavinamumui. Sodrintų nuosėdų ėminius galima laikyti iki analizės ir tomis sąlygomis, kurios rekomenduotos konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai.

6 priedėlis

Mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšys, rekomenduojamos biologinio kaupimosi bandymams***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Mažašerė žieduotoji kirmėlė paprastas tubifeksas (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) gyvena gleivėmis išsklotuose gėlo vandens nuosėdų urveliuose. Šiuose vamzdeliuose kirmėlės gyvena galva žemyn, rydamos nuosėdų daleles įsisavinančius susijusius mikroorganizmus ir organinius likučius. Užpakalinė dalis paprastai vingiuoja vandenyje virš nuosėdų, kad galėtų kvėpuoti. Nors ši rūšis gyvena įvairių tipų nuosėdose visame šiaurės pusrutulyje, *Tubifex tubifex* labiau mėgsta palyginti smulkių dalelių nuosėdas (59). Šios rūšies tinkamumas ekotoksikologiniams bandymams aprašytas, pvz., (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Kultūros auginimo metodai

Kirmėlės turi būti laikomos pastovioje laboratorijos kultūroje, kad turimo *Tubifex tubifex* kiekio pakaktų biologinio kaupimosi bandymams atlikti. Kaip *T. tubifex* auginimo kultūra rekomenduojama sistema, kurią sudaro dirbtinės nuosėdos iš dirbtinio dirvožemio pagal bandymo metodą C.8 (40) ir atkurtasis vanduo pagal bandymo metodą C.1 (8).

Kultūrai galima naudoti indus iš stiklo arba nerūdijančiojo plieno, kurių aukštis nuo 12 iki 20 cm. Į kiekvieną kultūros indą dedamas sluoksnis šlapių dirbtinių nuosėdų, paruoštų kaip aprašyta 5 priedėlyje. Nuosėdų sluoksnio gylis turėtų būti toks, kad kirmėlės galėtų natūraliai įsirausti į jį (*T. tubifex* būtinas minimalus gylis – 2 cm). Į sistemą įpilama atkurtojo vandens. Reikia imtis priemonių, kad nuosėdos būtų drumsčiamos kuo mažiau. Vandens sluoksnį reikėtų nestipriai aeruoti (pvz., 2 burbuliukai per sekundę oro, filtruoto per 0,45 µm filtrą) per Pastero pipetę, įstatytą 2 cm virš nuosėdų paviršiaus. Rekomenduojama kultūros temperatūra 20 °C ± 2 °C.

Kirmėlės dedamos į kultūros sistemą esant maksimaliai įkrovai 20 000 gyvūnų/m² nuosėdų paviršiaus. Esant didesnei įkrovai, gali sumažėti augimo sparta ir reprodukcijos laipsnis (43).

Dirbtinių nuosėdų kultūroje auginamas kirmėlės reikia maitinti. Papildomai galima maitinti smulkiai sumaltu žuvų maistu, pvz., TetraMin® (8); Klerks 1994, asmeninis pranešimas. Maitinimo dažnumas turėtų užtikrinti pakankamą augimą ir reprodukciją ir kuo mažesnę amoniako kaupimąsi ir grybelių augimą kultūroje. Maitinti galima du kartus per savaitę (pvz., 0,6–0,8 mg cm² nuosėdų paviršiaus). Praktinė patirtis parodė, kad tolygiai paskirstyti maistą nuosėdų paviršiuje būtų lengviau, jei maistas į kultūros auginimo indus būtų duodamas kaip dejonizuotame vandenyje homogenizuota suspensija.

Siekiant, kad nesikaupytų amoniakas, reikėtų naudoti pratekamąją sistemą arba vandenį virš nuosėdų keisti rankiniu būdu bent kartą per savaitę. Pradinių kultūrų nuosėdas reikėtų keisti kas tris mėnesius.

Kirmėlės iš kultūros galima imti sijoiant kultūros nuosėdas per 1 mm sietą, jei bandymui reikia tik suaugusių gyvūnų. Kokonams sulaikyti reikia 0,5 mm akučių, kirmėlių jaunikliams – 0,25 mm akučių sieto. Sietus galima dėti į atkurtąjį vandenį, nusijojus nuosėdas. Kirmėlės iškrenta iš sieto ir jas galima paimti iš vandens minkštu plieniniu pincetu arba pipete su liepsna poliruotais kraštais.

Bandymui pradėti arba naujoms kultūros auginti naudojamos sveikos ir aiškiai identifikuotos *Tubifex tubifex* kirmėlės (pvz., (64)). Ligotos arba sužeistos kirmėlės, taip pat grybelių hifais užkrėsti kokonai turi būti išmesti.

Kultūrą auginant sinchronizuotai, galima gauti tam tikro amžiaus kirmėles per tinkamą laiko tarpą, kai jų reikia. Indai su nauja kultūra ruošiami pasirinktais laiko tarpais (pvz., kas dvi savaites), pradedant nuo tam tikro amžiaus gyvūnų (pvz., kokonų). Šiame dokumente aprašytomis sąlygomis kirmėlės išauga per 8–10 savaičių. Kultūrą galima surinkti, kai kirmėlės padeda naujus kokonus, pvz., po dešimties savaičių. Paimti suaugusių kirmėlių ėminiai gali būti naudojami bandymams, o kokonai gali būti naudojami naujai kultūrai auginti.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) yra taip pat visame pasaulyje paplitęs gėlo vandens nuosėdų gyvūnas, plačiai naudojamas atliekant toksikologinius bandymus. Informacijos apie biologiją, kultūros auginimo sąlygas ir rūšies jautrumą galima gauti iš (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* taip pat galima auginti dirbtinėse nuosėdose, rekomenduotose *T. tubifex* pagal (8), taikant tam tikrus apribojimus. Kadangi gamtoje *L. variegatus* labiau mėgsta stambesnes nuosėdas nei *T. tubifex* (59), laboratorijos kultūros su *T. tubifex* naudojamomis dirbtinėmis nuosėdomis gali išnykti, praėjus nuo 4 iki 6 mėnesių. Praktinė patirtis parodė, kad *L. variegatus* galima laikyti pratekamosios sistemos smėlio substrate (pvz., kvarcinio smėlio, smulkaus žvyro), kaip mitybos šaltinį naudojant žuvų maistą, ir kelis metus neatnaujinti substrato. Pagrindinis *L. variegatus* privalumas palyginti su kitomis vandens mažasėrių žieduotųjų kirmėlių rūšimis – greita reprodukcija, todėl laboratorijose auginamų populiacijų biomasa didėja labai greitai (1)(6)(9)(10).

Kultūros auginimo metodai

Lumbriculus variegatus kultūros auginimo sąlygos išsamiai aprašytos Phipps ir kt. (1993) (10), Brunson ir kt. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Trumpa šių sąlygų santrauka pateikta toliau.

Kirmėlės galima auginti dideliuose akvariumuose (57–80 l) 23 °C temperatūroje, esant dienos šviesos trukmės santykiui 16 h šviesos: 8 h tamsos (100–1 000 liuksų) ir naudojant kasdien atnaujinamą gamtinį vandenį (45–50 l vienam akvariumui). Substratas ruošiamas supjaustant nebalintojo rudo popieriaus rankšluosčius į juostas, kurias kelias sekundes galima mirkyti kultūros vandenyje, kad būtų gautas mažų popieriaus gabaliukų substratas. Šį substratą galima tiesiogiai naudoti *Lumbriculus* kultūros akvariumuose, padengiant juo indo dugną, arba laikyti užšaldytą dejonizuotame vandenyje, kad būtų galima naudoti vėliau. Inde paklotas naujas substratas paprastai išsilaiko maždaug du mėnesius.

Kiekviena kirmėlių kultūra pradedama auginti imant 500–1 000 kirmėlių ir 3 kartus per savaitę maitinama 10 ml suspensijos, turinčios 6 g vaivorykštinio upėtakio pradinio maisto, vandens atnaujinimo arba pratekamosios sistemos sąlygomis. Statinės arba pusiau statinės kultūrų maitinimo dažnumas turėtų būti mažesnis, kad neaugtų bakterijos ir grybeliai. Maistą ir popierinį substratą reikėtų analizuoti dėl medžiagų, kurios turi būti naudojamos biologinio kaupimosi bandymuose.

Šiomis sąlygomis kultūros gyvūnų skaičius paprastai padvigubėja per maždaug 10–14 d.

Lumbriculus variegatus galima paimti iš kultūros, pvz., substratą pernešant į atskirą stiklinę tankiu tinklu arba gyvūnus pernešant stikline pipete, turinčia liepsna poliruotą plačią angą (maždaug 5 mm skersmens). Jei substratas pernešamas kartu į šią stiklinę, ji su kirmėlėmis ir substratu paliekama per naktį pratekėjimo sąlygomis, kuriomis substratas pašalinamas iš stiklinės, o kirmėlės pasilieka indo dugne. Kirmėlės galima pernešti į naujai paruoštos kultūros indus arba toliau apdoroti prieš bandymus, kaip aprašyta (1) ir (6). Reikėtų vengti sužeisti kirmėles arba sukelti jų autotomiją, pvz., jiems paimti naudojant pipetės su liepsna poliruotais kraštais arba nerūdijančiojo plieno pincetus.

Problema, į kurią reikia ypač atsižvelgti, kai *L. variegatus* naudojamos biologinio kaupimosi nuosėdose bandymams, yra reprodukcijos būdas (architomija su paskesniu morfalaksiju). Vykstant šiai belytei reprodukcijai, gaunami du fragmentai, kurie tam tikrą laikotarpį nesimaitina tol, kol neauga galva arba uodega (pvz., (36)(37)). Tai reiškia, kad nuosėdų ir teršalų įsisavinimas *L. variegatus* juos ryjant gali vykti ne visą laiką kaip tubifeksų atveju, kurie nesidaugina fragmentacijos būdu.

Todėl reikėtų atlikti sinchronizaciją, kad nevaldoma reprodukcija ir regeneracija, o vėliau didelis bandymo rezultatų svyravimas būtų kuo mažesnis. Toks svyravimas gali būti tada, kai kurie gyvūnai fragmentavosi, todėl tam tikrą laikotarpį nesimaitina ir yra mažiau veikiami bandomąja chemine medžiaga, palyginti su kitais gyvūnais, kurių fragmentacija bandymo metu nevyksta, pvz., (38). Nuo 10 iki 14 dienų prieš bandymo pradžią kirmėlės reikėtų dirbtinai fragmentuoti (sinchronizavimas) (65). Reikėtų naudoti dideles kirmėles, kurios, pageidautina, neturėtų neseniai vykusios fragmentacijos ženklų. Šias kirmėles galima padėti ant stiklinės plokštelės į kultūros vandens lašą ir

perpjauti per kūno vidurinę sritį skalpeliu. Reikėtų žiūrėti, kad gautos galinės dalys būtų panašaus dydžio. Galinės dalis reikėtų įdėti į kultūros indą su tuo pačiu substratu, kuris naudojamas kirmėlėms auginti, ir atkurtuoju vandeniu, kad būtų regeneruotos jų galvos, ir laikyti iki ekspozicijos pradžios. Naujų galvų regeneravimą rodo sinchronizuotai gautų kirmėlių išsirausimas į substratą (regeneruotų galvų buvimą galima patvirtinti apžiūrint reprezentatyvųjį poėminį po dviejų okuliarų mikroskopu). Manoma, kad tada bandymo organizmai yra panašios fiziologinės būsenos. Tai reiškia, kad, bandymo metu vykstant sinchronizuotų kirmėlių regeneravimui morfotaksio keliu, iš esmės visus gyvūnus, kaip manoma, vienodai veikia sodrintos nuosėdos. Sinchronizuotas kirmėlės reikėtų maitinti tada, kai jos pradeda išsirausti į substratą arba 7 dieną po perpjovimo. Maitinimo režimas turėtų būti palyginamas su įprastinėmis kultūromis, bet sinchronizuotas kirmėlės patariama maitinti iš to paties šaltinio, kuris turi būti naudojamas atliekant bandymą. Kirmėlės reikėtų laikyti 20 °C ± 2 °C bandymo temperatūroje. Bandymams reikėtų naudoti regeneruotas sveikas išaugusias panašaus dydžio kirmėles, kurios aktyviai plaukia arba šliaužia nuo švelnaus mechaninio prisilietimo. Reikėtų vengti sužeisti kirmėles arba sukelti jų autotomiją, pvz., joms paimti naudojant pipetes su liepsna poliruotais kraštais arba nerūdijančiojo plieno pincetus.

Dėl specifinio šios rūšies reprodukcijos būdo kirmėlių *Lumbriculus variegatus* skaičius bandymo metu, jei yra tinkamos sąlygos, turėtų padidėti (6). Reikėtų užrašyti, jei biologinio kaupimosi bandymo metu *L. variegatus* reprodukcija nevyksta, ir į tai turėtų būti atsižvelgta aiškinant bandymo rezultatus.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae*, *Oligochaeta* (tinkamumas nepatvirtintas tarplaboratoriniu tyrimu)**

Branchiura sowerbyi gyvena rezervuarų, ežerų, tvenkinių ir upių įvairių tipų nuosėdose, anksčiau – tropikų zonose. Taip pat jų galima rasti šiaurės pusrutulio šilto vandens telkiniuose. Tačiau jų yra daugiau dumblo ir molio nuosėdose, turinčiose didelį organinių medžiagų kiekį. Be to, kirmėlės gyvena nuosėdų sluoksnyje. Netgi užpakalinė kirmėlių dalis yra paprastai išsiraususi į nuosėdas. Šią rūšį lengva identifikuoti pagal žiaunų lapelius užpakalinėje kūno dalyje. Suaugusios kirmėlės gali būti 9–11 cm ilgio ir jų šlapio kūno masė yra 40–50 mg. Kirmėlių reprodukcijos laipsnis yra didelis, populiacija, esant toliau aprašytoms temperatūros ir maitinimo sąlygoms (Aston ir kt., 1982, (65)) padvigubėja mažiau kaip kas 2 savaites. *B. sowerbyi* buvo naudojamos atliekant toksiškumo ir biologinio kaupimosi tyrimus (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair ir kt. 1996, (67)).

Kultūros auginimo metodai

Branchiura sowerbyi auginimo sąlygos apibendrintos toliau (pateikė Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, ir Carla J. Roghair, RIVM, Nyderlandai).

Specialus bandymo organizmų auginimo būdas nebūtinas. Organizmus galima auginti naudojant neužterštas natūralias nuosėdas (31). Praktinė patirtis parodė, kad iš natūralių nuosėdų ir smėlio gauta terpė pagerina kirmėlių būklę palyginti su vien natūraliomis nuosėdomis (32)(67). Kultūrai auginti tinka 3 l stiklinės su 1 500 ml nuosėdų ir vandens terpės, sudarytos iš 375 ml natūralių neužterštų nuosėdų (apie 10 % suminės organinės anglies; apie 17 % dalelių yra ≤ 63 μm), 375 ml švaraus smėlio (M32) ir 750 ml atkurtojo arba vandentiekio vandens, iš kurio pašalintas chloras (31)(32)(67). Taip pat galima naudoti popierinius rankšluosčius kaip auginimo substratą, tačiau tuomet populiacija didėja lėčiau palyginti su natūraliomis nuosėdomis. Pusiausios statinių sistemų vandens sluoksnis stiklinėje lėtai aeruojamas, o vandenį virš nuosėdų reikėtų keisti kas savaitę.

Pradedama nuo 25 jaunų kirmėlių kiekvienoje stiklinėje. Po dviejų mėnesių dideli sliekai ištraukiami iš nuosėdų pincetu ir dedami į naują stiklinę su šviežiai pagaminta nuosėdų ir vandens terpe. Pirmiau naudotoje stiklinėje taip pat yra kokonų ir jaunų kirmėlių. Taip iš vienos stiklinės galima gauti 400 jaunų kirmėlių. Suaugusias kirmėles galima naudoti reprodukcijai ne trumpiau kaip vienus metus.

Kultūras reikėtų laikyti nuo 21 iki 25 °C temperatūroje. Temperatūros kitimas turėtų būti mažesnis kaip ± 2 °C. Embrionų vystymosi nuo padėtų kiaušinėlių iki jauniklis palieka kokoną trukmė yra maždaug trys savaitės 25 °C temperatūroje. Buvo nustatyta, kad 25 °C temperatūroje iš vienos išgyvenusios *B. sowerbyi* kirmėlės dumblo gaunama nuo 6,36 (31) iki 11,2 (30) kiaušinėlių. Kiaušinėlių skaičius kokone yra nuo 1,8 iki 2,8 (66)(69) arba iki 8 (68).

Ištirpusį deguonį, vandens kietumą, temperatūrą ir pH reikėtų matuoti kas savaitę. Žuvų maistą (pvz., TetraMin®) galima dėti kaip suspensiją du arba tris kartus per savaitę iki soties. Kirmėlės iki soties taip pat galima maitinti atšildytomis salotomis.

Pagrindinis šios rūšies privalumas – tai didelė atskiro gyvūno biomasė (šlapio kūno masė yra maždaug 40–50 mg vienam gyvūnui). Todėl šią rūšį galima naudoti atliekant nežymėtų bandomųjų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi bandymus. Ją galima veikti *T. tubifex* ar *L. variegatus* naudojamose sistemose, imant po vieną gyvūną vienam kartotinio bandinio indui (11). Tačiau kartotinių bandinių skaičių tokiu atveju reikėtų padidinti, nebent būtų naudojamos didesnės kameros (11). Taip pat turi būti patikslintas su šios rūšies įsirausimo elgesiu susijęs tinkamumo kriterijus.

NUORODOS

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Šio priedo C.13 skyrius. Biologinis koncentravimas. Dinaminis bandymas su žuvimis.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja medžiaga.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhring, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Šie šio priedo skyriai:
- A.4 skyrius. Garų slėgis
 - A.5 skyrius. Paviršiaus įtemptis
 - A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje
 - A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. Kratomos kolbos metodas
 - A.24 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. HPLC metodas
 - C.7 skyrius. Skaidymas. Abiotinis skaidymas. Hidrolizė kaip pH funkcija
 - C.4 A-F skyriai. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas
 - C.19 skyrius. Adsorbcijos koeficiento (K_{oc}) nustatymas dirvožemyje ir nuotekų dumble aukštos skyrimo galios skysčių chromatografija (HPLC)
 - C.29 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas. CO₂ sandariuose induose (viršutinės erdvės tyrimas)
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Šio priedo C.1 skyrius. Ūmus toksiškumas žuvims.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (40) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hoofman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenberg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ.* No. 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.“
-